

**ÇAY BİTKİSİNE AŞILANAN BAZI
MİKROORGANİZMALARIN BÜYÜME VE
ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

İbrahim CEBECİ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Mustafa ERAT**

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇAY BİTKİSİNE AŞILANAN BAZI MİKROORGANİZMALARIN
BÜYÜME VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

İbrahim CEBECİ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**ÇAY BİTKİSİNE AŞILANAN BAZI MİKROORGANİZMALARIN BÜYÜME
VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mustafa ERAT danışmanlığında, İbrahim CEBECİ tarafından hazırlanan bu çalışma 21/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (✓/...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mustafa ERAT

İmza

Üye : Prof. Dr. Ramazan ÇAKMAKÇI

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.07.2014 tarih ve 33/1045 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇAY BİTKİSİNE AŞILANAN BAZI MİKROORGANİZMALARIN BÜYÜME VE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İbrahim CEBECİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ERAT

Farklı bölgelerden izole edilmiş ve tanılanmış on adet bakteri ve 3 adet biyokimyasal ajan, Fener 3 çay klonuna aşılanarak yetiştirildi. Çay bitkisinin gelişme parametreleri ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla, bitki boyu, gövde çapı, yaprak alanı, yaş yaprak ağırlığı, kuru yaprak ağırlığı, dal+yaprak ağırlığı, klorofil içeriği, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Uygulanan tüm kimyasal ve biyolojik ajanlar, büyüme parametrelerine istatistiksel olarak anlamlı pozitif etkiye sahipti. Glutatyon redüktaz aktivitesi, *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki tüm ajanlar tarafından +%53 ile +%94 arasında değişen oranda etkilendi. Glutatyon S-transferaz aktivitesi ise tüm ajanlar tarafından pozitif etkilenmekle beraber, en yüksek artışı *Bacillus lentus* 29/6 ile gösterdi. Pentoz fosfat yolu enzimlerinden glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine *Bacillus lentus* 29/6 nın dışındaki tüm ajanlar anlamlı etkiye sahip idi. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ise *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki tüm ajanlar tarafından istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi.

Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar organik tarımda yararlanılabilecek özelliklere sahiptirler.

2014, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çay, Organik tarım, Enzim, antioksidan

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS SOME MICROORGANISMS INOCULATED INTO TEA ON GROWTH AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES

İbrahim CEBECİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applicatin Science
Department of Chemistry
Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ERAT

Ten bacteria isolated from differet regions and defined and then three biochemical agents were inoculated into Fener 3 tea clone and grown. The growth parameters and some antioxidant enzyme activities of the tea were determined. For this purpose, plant length, stem diameter, leaf dimension, fresh leaf weight, dry leaf weight, branche+leaf weight, chlorophill content, glutahione reductase, glutathione S-transferase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and 6-phophogluconate dehydrogenase enzyme activities were determined. All chemical and biological agents inoculated into the plant had a statistically significant positive effect on the growth parameters. Glutathione reductase activity was significantly affected by all agents ranging from 53% to + 94% + except *Bacillus pumilus* 39/4 and *Bacillus lentus* 29/6. Although glutathione S-tansferaz activity was affected positively by all agents, the highest increase was observed by *Bacillus lentus* 29/6. All agents, except for *Bacillus lentus* 29/6, made a significant impact on the enzyme activities of glucose 6-phosphate dehydrogenase which is one of pentose phosphate metabolic pathway enzymes. All agents, except for *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus pumilus* 39/4, and *Bacillus lentus* 29/6 also made a significant impact on the enzyme activities of the 6-phosphogluconate dehydrogenase.

The results obtained show that the microorganisms used in the research have the required qualities to be used in organic farming.

2014, 65 pages

Keywords: Tea, Organic farming, Enzyme, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Erzurum Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında bana her türlü desteğini esirgemeyen başta Hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ERAT'a,

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimini esirgemeyen Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ramazan ÇAKMAKÇI'ya ve ekibine,

Son olarak ta eğitim hayatım süresince maddi ve manevi her türlü destek sağlamaktan kaçınmayan çok kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim CEBECİ

Temmuz, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Organik Tarım.....	1
1.1.1. Tanım.....	1
1.1.2. Organik tarımın önemi.....	1
1.1.3. Organik tarımın temel ilkeleri.....	2
1.1.4. Organik tarımda temel yöntemler.....	2
1.1.4.a. Tohumluk seçimi.....	2
1.1.4.b. Bitki besleme ve toprak ıslah maddeleri.....	2
1.1.4.c. Tarımsal mücadele maddeleri.....	3
1.1.5. Organik tarımın avantajları ve dezavantajları.....	3
1.1.5.a. Avantajları.....	3
1.1.5.b. Dezavantajları.....	3
1.2. Organik Tarımda Yararlı Mikroorganizmalar.....	4
1.3. Çay Bitkisi.....	5
1.3.1. Yeşil çayın kimyasal yapısı.....	6
1.4. Enzimler.....	8
1.4.1. Tanım.....	8
1.4.2. Enzim aktivitesini etkileyen unsurlar.....	8
1.4.2.a. Enzim konsantrasyonu.....	8
1.4.2.b. Substrat konsantrasyonu.....	9
1.4.2.c. Sıcaklık.....	9
1.4.2.d. pH değeri.....	10
1.4.2.e. Substrat yüzeyi.....	10

1.4.2.f. Su	11
1.4.2.g. İnhibitörler	11
1.4.3. Enzimlerin yapıları	13
1.4.4. Enzimlerde özgülük.....	13
1.4.5. Enzimlerde anahtar kilit modeli	14
1.4.6. Kofaktör ve Koenzim	15
1.4.6.a. Kofaktör	15
1.4.6.b. Koenzim	15
1.4.7. Enzimlerin biyolojik işlevi	16
1.5. Bazı Antioksidan Enzimler	16
1.5.1. Glutasyon redüktaz (GR)	16
1.5.2. Glutasyon S-transferaz (GST)	17
1.5.3. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD).....	18
1.5.4. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD)	19
1.5.4.a. Pentoz fosfat yolu	19
1.5.4.b. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD)	20
1.5.4.c. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) yapısı	20
1.6. Çalışmanın Amacı	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	28
3.1. Materyaller	28
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	28
3.1.2. Kullanılan malzemeler	28
3.1.3. Kullanılan cihazlar	28
3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	29
3.1.4.a. Enzim ekstraksiyonu tampon çözeltisi	29
3.1.4.b. Aktivite çözeltilerinin hazırlanması	29
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Deneme deseni ve deneme konuları	31
3.2.2. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması ve uygulanması.....	31
3.2.3. Araştırmada kullanılan bakteriler ve özellikleri	32
3.2.4. Çay bitkilerinde gelişme ve verim parametrelerin incelemesi	33

3.2.4.a. Bitki boyu (Gövde boyu).....	33
3.2.4.b. Gövde çapı (Gövde kalınlığı).....	33
3.2.4.c. Yaprak alanı.....	34
3.2.4.d. Yaş yaprak ağırlığı	34
3.2.4.e. Kuru yaprak ağırlığı.....	34
3.2.4.f. Dal+yaprak ağırlığı	34
3.2.4.g. Yaprak klorofil ölçümü	34
3.2.5. Enzim ekstraksiyonun hazırlanması	35
3.2.6. Glutasyon redüktaz (GR) için aktivite ölçümü.....	35
3.2.7. Glutasyon S-transferaz (GST) için aktivite ölçümü	36
3.2.8. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) için aktivite ölçümü.....	37
3.2.9. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) için aktivite ölçümü	38
3.2.10. Protein tayini (Comassie- Brilliant Blue G-250).....	38
3.2.11. Standart grafik elde edilişi.....	39
3.2.12. İstatistik analizleri	39
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	41
4.1. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Bitki Boyu ve Gövde Çapı Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	41
4.2. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Yaprak Alanı, Yaş Yaprak ve Kuru Yaprak Ağırlığı Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	41
4.3. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Dal+Yaprak Ağırlığı ve Klorofil İçeriği (SPAD Değeri) Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	42
4.4. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonunda Büyüme Faktörleri Üzerine Etkileri.....	43
4.5. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	45
4.6. Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....	45
4.7. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri.....	46
4.8. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki büyüme parametreleri, GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerine Ait Grafikler	47

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACCD	: Aminsiklopropan karboksilat deaminaz
CDNB	: 1 kloro-2,4 dinitro benzen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EIS	: Enzim-Substrat + İnhibitör kompleksi
EÜ	: Enzim ünitesi
F	: F cetveli
G6P	: Glukoz-6-fosfat
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
K	: Kuvvetli
KO	: Kareler Ortalaması
K ⁺	: Çok kuvvetli
K _M	: Maksimum hızın yarısına karşılık substrat konsantrasyonu
kob	: Mililitredeki canlı bakteri sayımı
Lsn	: Lisin
M	: Molarite
MA	: Molekül ağırlığı
mM	: Milimolar
N	: Analiz sayısı
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (indirgenmiş form)
ÖS	: Önemlilik Derecesi
p	: Probabilite değeri
R5P	: Riboz 5- fosfat
Ru5P	: Ribuloz 5-fosfat
RNA	: Rübönükleik asit
SD	: Standart Sapma
S ² \bar{X}_1	: Her iki analizin varyansını ifade eder
T	: Kritik değer

Tris	: Trihidroksimetil aminometan
V_E	: Enzimin Hacmi
V_{max}	: Maksimum hız
V_T	: Toplam Hacim
Z	: Zayıf
Z^+	: Çok zayıf
$\Delta OD/dak$: Dakikada absorpsiyon farkı
μl	: Mikro litre
μmol	: Mikro mol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.....	9
Şekil 1.2. Substrat konsantrasyonunun enzim hızına etkisi.....	9
Şekil 1.3. Sıcaklığın enzim hızına etkisi.....	10
Şekil 1.4. pH'ın enzim hızına etkisi.....	10
Şekil 1.5. Substrat yüzeyinin enzim hızına etkisi	11
Şekil 1.6. İnhibitör- Substrat-Enzim Etkileşimi.....	11
Şekil 1.7. Enzimlerde anahtar kilit modeli	14
Şekil 1.8. İnsan eritrosit glutatyon redüktazının yapısı.....	17
Şekil 1.9. Glutatyon S-transferazın katalizlediği reaksiyon.....	18
Şekil 1.10. Glutatyon S-transferazın yapısı	18
Şekil 1.11. Glukoz 6-fosfat dehidrogenazın yapısı	19
Şekil 1.12. 6-fosfoglukonat dehidrogenazın yapısı	21
Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	46
Şekil 4.2. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların bitki boyu üzerindeki etkileri	48
Şekil 4.3. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların gövde çapı üzerindeki etkileri	48
Şekil 4.4. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların yaprak alanı üzerindeki etkileri ...	49
Şekil 4.5. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların yaş yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri	50
Şekil 4.6. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların kuru yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri	50
Şekil 4.7. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların dal+yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri	51
Şekil 4.8. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların klorofil içeriği üzerindeki etkileri	51
Şekil 4.9. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların GR aktivitesi üzerindeki etkileri	52
Şekil 4.10. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların GST aktivitesi üzerindeki etkileri.....	52

Şekil 4.11. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların G6PD aktivitesi üzerindeki etkileri.....	53
Şekil 4.12. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların 6PGD aktivitesi üzerindeki etkileri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Genç çay sürgünlerindeki önemli bileşenlerin yaklaşık yüzdeleri	7
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bakterilerin özellikleri.....	33
Çizelge 3.2. Glutasyon radüktaz için aktivite çözeltileri.....	35
Çizelge 3.3. Glutasyon S-Transferaz için aktivite çözeltileri.....	36
Çizelge 3.4. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz için aktivite çözeltileri	37
Çizelge 3.5. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz için aktivite çözeltileri	38
Çizelge 4.1. Fener 3 çay klonu bitki boyu ve gövde çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçları	41
Çizelge 4.2. Fener 3 çay klonu yaprak alanı, yaş yaprak ve kuru yaprak ağırlığı değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	42
Çizelge 4.3. Fener 3 çay klonu dal+yaprak ağırlığı ve klorofil içeriği (SPAD değeri) değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	42
Çizelge 4.4. Mineral gübre, biyolojik gübre ve farklı bakteri uygulamalarının fener 3 çay klonunda büyüme faktörleri üzerine etkileri.....	44
Çizelge 4.5. Fener 3 çay klonu GR ve GST değerlerine ait varyans analiz sonuçları	45
Çizelge 4.6. Fener 3 çay klonu G6PD ve 6PGD değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	45
Çizelge 4.7. Mineral gübre, biyolojik gübre ve bakteri uygulamaların fener 3 çay klonunda GR, GST, G6PD ve 6PGD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	47

1. GİRİŞ

Her canlı gibi insanlar da hayatlarını devam ettirebilmesi için enerjiye bu enerjiyi de elde etmek için beslenmeye ihtiyacı vardır. İlk olarak bu beslenme avcılık toplayıcılık gibi faaliyetlerden karşılanmıştır. Daha sonralardan tarım faaliyetleri ortaya çıkmıştır. Tarım faaliyetlerinde ilk olarak doğadan temin edilen tohum, fide, fidan gibi girdilerle başlanmış diğer girdiler olarak hava, su, hayvansal gübreler kullanılmıştır (Sürmeli 2003). Klasik tarım metotlarından sonra yani 1700'lü yıllardan sonra kimyasal gübre kullanımı toprakların kimyasal ve biyolojik dengesinin bozulmasına neden olmuştur. Bunun üzerine bu olumsuz durumları ortadan kaldırmak için kimyasal bileşenler geliştirilmiştir. Bu bileşenler verimliliği artırarak küreselleşen dünyada kitle üretimi ve ucuz maliyet dalgasında kimyasal kullanımını iyice artırmıştır.

1.1. Organik Tarım

1.1.1. Tanım

Doğanın dengesini bozmadan bitkisel ve hayvansal üretimi yapmak için yapay kimyasal maddeler kullanmanın yerine uygun ekolojiler seçerek yani kültürel önlemler, biyolojik mücadele ve organik kökenli girdiler kullanılarak yapılan tarım şeklidir (Yüksel 2008).

Organik tarımın amacı; hava, su ve toprağı kirletmeden insan, bitki ve hayvan sağlığını korumaktır.

1.1.2. Organik tarımın önemi

Organik tarım yönteminde çevreye ve toprağı olumsuz etki yapan kimyasal gübre, ilaçlama ve hormon gibi dış girdiler kullanılmaz. Organik tarım hava, su, toprak ve çevreyi korumak için belli kurallar dahilinde yapılır.

Üretim esnasındaki denetlemeler eksiksiz yapılır. İnsan sağlığına ve çevreye zarar verebilecek bazı atıklar uygun şekilde uzaklaştırılarak hastalıkların oluşumu ve yayılımı engellenir. Tarım arazilerinin çölleşmesi ve arazi alanının azalması engellenir (Anonim 2011).

1.1.3. Organik tarımın temel ilkeleri

Organik tarım için temel olarak 4 ilke benimsenir. Bunlar;

Toprakta tamamen parçalanmayan ve atık olarak kalan kimyasal bileşen kullanmama, hiç bir şekilde kimyasal gübre kullanmama, genetiğiyle oynanmamış tohum kullanma, ürün etiketlenmesini ve sertifikasını yaptırma (Sürmeli 2003).

1.1.4. Organik tarımda temel yöntemler

1.1.4.a. Tohumluk seçimi

Bu tarımda kullanılacak olan tohumlar yine organik olarak yetiştirilen ürünlerden alınmalıdır. Kesinlikle tohumun genetiğiyle oynanmamalıdır. Tohumun melez ya da hibrit olması onun organik olma özelliğini bozmaz (Sürmeli 2003).

1.1.4.b. Bitki besleme ve toprak ıslah maddeleri

Toprağın verimliliğini artırmak için kullanılmasına izin verilen bazı maddeler ahır gübresi, kompost, pit ve torflar, tarım kireci, leonardit, organik atıklar, fosfat kayası ve perlittir (Sürmeli 2003).

1.1.4.c. Tarımsal mücadele maddeleri

Bitkilerde zararlı madde ve mantarların neden olduğu hastalıkları temizlemek için kullanılan bileşenler bordo bulamacı, sütleğen otu suyu (yılan otu, balık otu), arap sabunu, tütün suyu, çiğ süt ve sarımsak suyu dur (Sürmeli 2003).

1.1.5. Organik tarımın avantajları ve dezavantajları

1.1.5.a. Avantajları

Çiftçiler tarafından kullanılan sentetik kimyasallar çok az veya hiç kullanılmamaktadır. Bu nedenle ekolojik tarıma geçiş kolaylaşabilir.

- Gelirlerde ürüne bağlı olarak artış gözlenir.
- Kimyasal gübre kullanılmadığından bu tarım yönteminden tasarruf edilir.
- Üreticinin tüm ürünlerini alması garanti altına alınır.
- Ekolojik ürünlerin dış satım fiyatı diğer ürünlere göre daha yüksektir.
- İhraç edilen bu ürünler daha önce hiç ulaşmadığı tüketicilere de ulaşır.
- Organik tarım modeli ziraat mühendisleri için yeni istihdam sahaları oluşturmaktadır (Anonim 2009).

1.1.5.b. Dezavantajları

Hızla gençleşen nüfus, tüketim düzeyinin ve çeşitliliğinin sürekli artması ve çevredeki ülkelerin hemen hemen hepsinin tarımsal ürün talep eden özellikleri sebebiyle organik tarımın (verimde meydana gelebilecek azalma nedeniyle) kısa sürede gelişmesi zor görünmektedir.

Organik tarım metodunda bitkisel üretimde meydana gelen sorunların sebebi arazilerin birbirine çok yakın, küçük ve parçalı olmasıdır. Bu sebepten dolayı organik üretimi

olumsuz etkiler. Çünkü organik ürünler, tarım yapılan bir yerde veya çevresinde üretim yapılan klasik tarım modelindeki kullanılan kimyasallardan etkilenir.

Bu organik ürünler pazarlamalarda daha yeni ve belirsiz konudur. Bu nedenle yeterli tarımsal yayımlar ve yeterli elemanların bulunmaması dezavantajdır (Anonim 2009).

1.2. Organik Tarımda Yararlı Mikroorganizmalar

Organik atık ve kalıntıları parçalayan, atmosfer azotunu fiksedan, bitki hastalıklarını ve toprak kökenli patojenleri bastıran, pestisitlerin zararlı etkisini yok eden, besin maddesi döngüsünü artıran ve bitki gelişimini teşvik eden vitamin, hormon ve enzim gibi biyoaktif maddeleri üretenler yararlı mikroorganizmalar olarak sınıflandırılırlar. Bitki gelişimini teşvik edici mikroorganizmalar başta organik ve iyileştirilmiş olmak üzere tarımda biyolojik gübre olarak kullanılmıştır.

Fotosentez bakterileri, yararlı mikroorganizmalar içinden en etkili olanı ve diğer yararlı mikroorganizmalara destek veren yaşamlarını kendi kendilerine sürdüren bakterilerdir. Bu bakteriler, güneş ışınlarını ve toprağın ısınısını enerji kaynağı olarak kullanarak; kök salgılarından, organik maddeden veya zararlı gazlardan (örneğin, hidrojen sülfür) yararlı maddeler sentezlerler. Yararlı maddeler ise nükleik asitler, aminoasitler, biyoaktif maddeler ve şekerlerden oluşmaktadır ve bunların tümü bitkilerin gelişmesini ve büyümesini teşvik etmektedir. Bu yararlı maddeler doğrudan bitkiler tarafından emilirler ayrıca bakterilerin daha da çoğalması için büyüme ortamı sağlarlar. Bu yüzden, topraktaki fototropik bakterilerin artışı diğer yararlı mikroorganizmalara olumlu etki yapacaktır. Örneğin, fototropik bakterilerin salgıladığı azotlu bileşiklerin (aminoasitler) varlığından dolayı kök çevresinde VA (*vesicular-arbuscular*) mikoriza artmıştır (Anonim 2007a). VA mikoriza, topraktaki fosfatların çözünürlüğüne pozitif etki yaparak normalde bitkilerin alımı için çözeltide olmayan fosfatları çözeltilmeye geçmesini sağlar. VA mikoriza, *Rhizobium* ve azot fiksedan azoto bakterileriyle birlikte bulunabilir ve baklagillerin havadaki azottan faydalanma süresini artırır.

Laktik asit bakterisi, mayaların ve fotosentez bakterilerinin oluşturduğu şekerler ve diğer karbohidratlardan laktik asit oluşumunu sağlar. Bununla birlikte, laktik asit kuvvetli olarak istenmeyen bakteri arındırıcısıdır. Pestisitlerin etkisini azaltır, lignin ve selüloz gibi ve diğer organik maddelerin bozulmasını artırır, bu maddeleri toprağa hiçbir zarar vermeden uzaklaştırır ve bitki hastalıklarına neden olan popülasyonları engeller (Anonim 2007a).

Fotosentez bakterileriyle birlikte yaşayan bakteriler ve mantarlar arasında bir yapıya sahip olup fotosentez bakterileri ve organik madde tarafından elde edilen aminoasitlerden istenmeyen bakteri ve zararlı mantarların etkisini azaltan antimikrobiyal maddeler üretirler. Böylece, toprağın kalitesini artırır (Anonim 2007a).

Aspergillus ve *Penicillium* gibi küfler diğer yararlı mikroorganizmalar gibi organik maddelerin hızla bozulmasına yol açarak böcek kurtçuklarını engelleyen ve kötü kokuları gidermesini sağlayan ester ve antimikrobiyal maddeler üretir (Anonim 2007a).

Toprakta yararlı mikroorganizmalar arttıkça, yerli etkin uygulamaların popülasyonu da giderek artar. Böylece, mikro flora zenginleşir ve topraktaki mikrobiyal ekosistemler iyi dengelenir. Zararlı uygulamaların artışı önlenir. Böylelikle topraktan kaynaklanan hastalıklar etkisizleştirilir (Anonim 2007a).

Mayalar, bitkilerin büyümeleri için gerekli olan antimikrobiyal ve faydalı maddeler sentezlerler, aktif bir şekilde hücre ve kök bölünmesini tetikleyen hormonlar ve enzimler gibi biyoaktif maddeler üretirler ve laktik asit bakterilerine ve aktinomisetlere büyüme ortamı sağlar (Anonim 2007a).

1.3. Çay Bitkisi

Latince adı (*Camellia Sinensis*) olup (*theaceae*) ailesindedir. Çayın yaprağının olgun oluşu çayın çeşidine göre değişir. Yaprığın uzunluğu 3,8-25 cm arasında değişir. Çayın

dış görünüşüne göre üç çeşidi vardır. Bunlar Çin çayı, Assam çayı ve Kamboçya çayıdır. Türkiye’de çayın bütün bu çeşitleri yetişebilir. Türkiye’de çay Doğu Karadeniz bölgesinde yetişmektedir. Aslında Doğu Karadeniz de yetişen bu çaylar Çin çayları olarak bilinir (İçen 2008).

Çayın kökeni Çin’de başlamıştır. Önce Hindistan, Japonya daha sonra Seylan, Güney-Doğu Asya, Pakistan, İran ve Rusya’ya, 1900-1915 arası Kenya, Tangonika, Rodezya, Nyazaland, Uganda, Mozambik gibi Afrika ülkelerine yayılmıştır (Kaçar 1991). Türkiye’ye 1924 yılında Rusya’dan getirilen tohumlarla çay yetiştirilmeye başlanmıştır. Daha sonra üretim artmış ve yaklaşık yılda 77 bin hektar alanda 2 milyon ton yaş çay yaprağı (217 bin ton kuru çay yaprağı) elde edilmiştir (Anonim 2007b). Türkiye %6’lık çay üretimiyle dünyada 5. sıradadır. Kişi başına 2,2 kg’ı aşan yıllık tüketim ile Hindistan, Çin, Rusya, İngiltere, İrlanda, Irak ve Kuveyt’ten sonra gelmektedir (Owuar and Chavanji 1986).

1.3.1. Yeşil çayın kimyasal yapısı

Çay yapraklarında bulunan kimyasal bileşenler iklime, ışığı görme açısına ve toprağın verimliliğine göre değişir.

Çizelge 1.1. Genç çay sürgünlerindeki önemli bileşenlerin yaklaşık yüzdeleri (Hilton 1973; Kirk and Othmer 1983)

Bileşen	% Miktarı (Kuru madde üzerinden)
<u>Soğuk suda çözünenler</u>	
Flavanoller : Epigallokateşin gallat	9-13
Epigallokateşin	3-6
Epikateşin gallat	3-6
Epikateşin	1-3
Gallokateşin	1-2
Kateşin	1-2
Flavonoller ve flavonol glikozitler	3-4
Flavandioller (Leucoantosiyamidler)	2-3
Fenolik asitler	4
Fenolik maddeler toplamı	30
Kafein	3-4
Aminoasitler	4
Karbonhidratlar	4
Organik asitler	0.5
<u>Sıcak suda kısmen çözünenler</u>	
Polisakkaritler: Nişasta	2.5
Diğerleri	12
Protein	15
İnorganik maddeler	5
<u>Suda çözünmeyenler</u>	
Selüloz	7
Lignin	6
Lipidler	3
Pigmentler	0.5
Uçucu maddeler	0.01-0.02

Fenolik maddeler (polifenol) çayın en önemli bileşenlerinden biridir. Flavanoller, flavonoller ve flavonol glikozitler, flavandioller ve fenolik asitlerden oluşur. Çayın işlenmesi sırasında önemli ve miktarca en fazla bulunan flavanoller kateşinler ve gallokateşinler ile beraber bunların gallatları oluşturmaktadır. Çay yaprağı yaşlandıkça polifenol miktarında azalma gözlenir.

Çayın aranan bir içecek olmasının bir önemli nedeni de içerdiği alkaloid maddelerdir. Çaydaki alkaloid miktarı ilk 1827'de Oudry tarafından bulunmuştur (Anonim 2007a). Kuru çayın yaklaşık %15-23'ü proteinler ve aminoasitlerden oluşmuştur. Çayda bulunan bu proteinlerin çoğunluğu suda çözünmezler. Yaygın olan aminoasitlerin yanı sıra çaya özgü olarak *theanin* bulunmuştur.

Çayın %4'ünü oluşturan karbohidratlar sakkaroz, fruktoz, maltoz, glikoz, arabinoz, riboz, rafinoz ve ramnoz gibi şekerlerden oluşmuştur.

Klorofil çayda %5 oranında bulunmuştur.

1.4. Enzimler

1.4.1. Tanım

Kimyasal tepkimelerin hızını artıran biyomoleküllere denir (Smith 1997). Hemen hemen enzimlerin hepsi proteindir. Enzimin ürüne dönüştürdüğü maddeye substrat denir. Bir canlı hücrelerinde meydana gelen reaksiyonların yaklaşık hepsi enzime ihtiyaç duyar. Yani her reaksiyonun kendine ait enzimi vardır. Enzimlerde katalizörler gibi tepkime sonucunda tükenmezler ve reaksiyon dengesini değıştirmezler. Enzimler katalizörlerden ayıran en önemli özelliklerinden biride sipesifik olmasıdır. Enzim aktivitesine etki eden aktivatör ve inhibitör denen kavramlar vardır. Aktivatör enzimin aktivitesini artırırken inhibitör enzim aktivitesini azaltır. Ayrıca bu aktivite sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, aktivatör - inhibitör konsantrasyonu ve basınç gibi etkenlerden etkilenir.

1.4.2. Enzim aktivitesini etkileyen unsurlar

1.4.2.a. Enzim konsantrasyonu

Enzim aktivitesi, diğere şartların sabit tutulması koşuluyla enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Anonim 2007c).



Şekil 1.1. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (Anonim 2007c)

1.4.2.b. Substrat konsantrasyonu

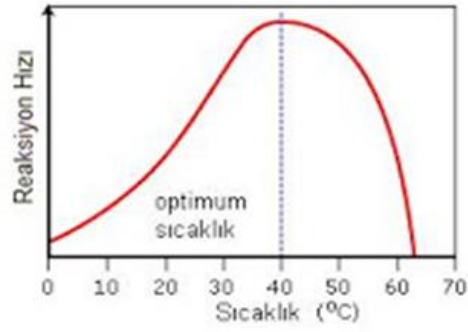
Enzim miktarı sabit tutulduğunda substrat miktarı artırılırsa enzim hızı yani aktivitesi artar. Tepkime hızı en yüksek noktaya ulaştığında enzim hızı sabit kalır. Optimum substrat konsantrasyon değerleri üzerindeki substrat derişimleri enzim hızına pozitif katkı sağlamazlar (Anonim 2007c).



Şekil 1.2. Substrat konsantrasyonunun enzim hızına etkisi (Anonim 2007c)

1.4.2.c. Sıcaklık

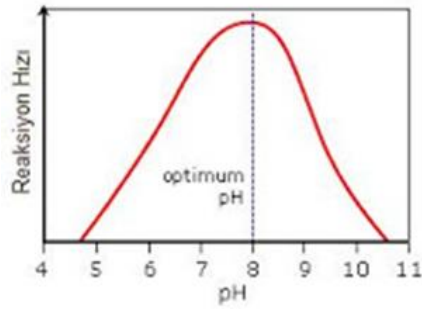
Sıcaklık artırıldığında enzim hızında artma gözlemlenir. Sıcaklık belli bir seviyeye geldiğinde enzim hızında ani düşmeler olur. Çünkü proteinler türlerine göre farklı sıcaklıklarda denatüre olurlar. Enzim hızının maksimum olduğu nokta optimum sıcaklığı verir (Anonim 2007c).



Şekil 1.3. Sıcaklığın enzim hızına etkisi (Anonim 2007c)

1.4.2.d. pH değeri

pH ortamın asit veya baz oluşunu açıklar. 0-14 arasında değişir. Her enzimin kendine ait aktif olduğu farklı pH aralıkları vardır. Enzim aktivitesinin maksimum olduğu pH noktası o enzimin optimum pH'sını verir (Anonim 2007c).



Şekil 1.4. pH'nın enzim hızına etkisi (Anonim 2007c)

1.4.2.e. Substrat yüzeyi

Enzimler etkilerini substratın dış yüzeyinden başlayarak gerçekleştirdikleri için, substrat yüzeyinin artışıyla enzim aktivitesi arasında doğru orantı vardır (Anonim 2007c).



Şekil 1.5. Substrat yüzeyinin enzim hızına etkisi (Anonim 2007c)

1.4.2.f. Su

Bir reaksiyonun gerçekleşmesi için moleküllerin birbirine çarpışması gerekir yani taneciklerin hareket kabiliyetini artıran bir ortam olması gerekir. Bu hareketli ortamı da su sağlar. Enzimlerde aktivitelerini gösterebilmeleri için sulu ortama ihtiyaç duyarlar. Ortamın suyu %15'in altına düşerse enzimler çalışmazlar (Anonim 2007c).

1.4.2.g. İnhibitörler



Şekil 1.6. İnhibitör- Substrat-Enzim Etkileşimi (Anonim 2007c)

İnhibitörler enzim aktivitesine negatif etki yapan bileşiklerdir. Buna inhibisyon denir. İki çeşit inhibisyon vardır;

Dönüşümsüz inhibisyon

İnaktif olan enzimin bir daha aktif olmama durumudur.

Dönüşümlü inhibisyon

İnaktif olan enzimin koşullar sağlandığında tekrar aktif olma durumudur. Dört çeşidi vardır;

- Yarışmalı inhibisyon
- Yarı yarışmalı inhibisyon
- Yarışmasız inhibisyon
- Karışık inhibisyon

Yarışmalı inhibisyon

Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör substratla yarışma halindedir. İkisi de enzimin bir aktif bölgesine bağlanmak ister. Hangisinin konsantrasyonu ve bağlanma ilgisi büyükse aktif bölgeye o bağlanır. Bu tip inhibisyonlarda V_{max} değeri değişmezken K_M değeri artar. Burada;

V_{max} enzim aktif bölgesinin tamamının substratla dolduğu andaki hızdır.

K_M ise V_{max} 'in yarısının olduğu substrat konsantrasyonudur.

Yarı yarışmalı inhibisyon

İnhibitör enzime değil enzim-substrat kompleksine bağlanır. Oluşan EIS (Enzim-substrat+ inhibitör) inaktif olur.

Yarışmasız inhibisyon

Burada enzimin iki aktif bölgesi vardır substrat ve inhibitör ayrı ayrı yerlere bağlandığından yarışmasızdırlar. Burada K_M değişmezken V_{max} azalır.

Karışık inhibisyon

Bu tür inhibisyon yarı yarışmalı olana benzer, ama enzim-inhibitör-substrat (EIS) kompleksinde kısmî enzim aktivitesi vardır.

1.4.3. Enzimlerin yapıları

Enzimler genelde küresel yapıda olup 62-2500 adet aminoasite kadar yapıları mevcuttur (Chen *et al.* 1992). Az sayıda RNA temelli enzimler de vardır. Bunların en bilindik olanı ribozomdur. Bunlara RNA enzimi ya da ribozim adı verilir. Çoğu enzimler substratından çok daha büyüktürler. Enzimin 3-4 aminoasit kadar çok küçük bir bölümü katalizle doğrudan ilişkilidir (Anonymous 2007). Bu küçük bölgeye aktif bölge denir.

Çoğu proteinler gibi enzimlerde uzun aminoasit zincirinden meydana gelip bu zincirler katlanıp enzime üç boyutlu yapı görüntüsüne kazandırır ve her aminoasit zinciri özgül yapı özelliği oluşturur. Genelde enzimler ısı ve kimyasal etmenlere maruz kaldığında denatüre olurlar. Bir enzimin denatüre olması demek üç boyutlu yapısının açılması ve inaktif olması demektir. Bu denatürasyon enzimin türüne göre dönüşümlü ve dönüşümsüz olabilir. Dönüşümlü denatürasyona renatürasyon denir.

1.4.4. Enzimlerde özgülük

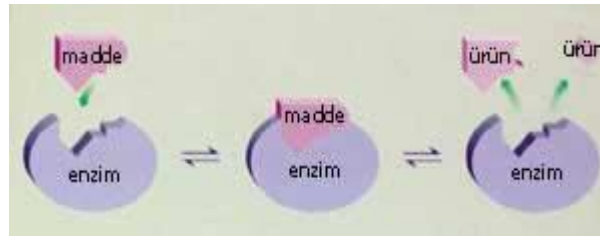
Enzimler hangi reaksiyonu katalizleyeceği ve hangi substrata etki edeceği konusunda özgüldürler. Enzim ve substrat şekil, yük ve hidrofilik/hidrofobik bakımından birbirinin

tamamlayıcısıdır. Enzimler ilaveten stereoizomerik, yönsel ve kimyasal özgüllük de gösterebilirler (Jaeger and Eggert 2004).

En yüksek seviyede özgüllük ve doğruluk gösteren enzimlerin "prova okuma" mekanizmaları vardır. DNA polimeraz gibi bir enzim, birinci aşamada bir reaksiyonu katalizler, ikinci aşamada da sentezlenen ürünün doğru olup olmadığını kontrol eder (Hubscher and Shevelev 2002). Bu iki adımlı süreç sayesinde ortalama hata oranı çok çok az olur; yani 100 milyon reaksiyonda 1'den az olur (Berg *et al.* 2002). Zenkin *et al.* (2006)'e göre benzer prova-okuma mekanizmaları RNA polimeraz, aminoasit tRNA sentetaz ve ribozomlarda da mevcuttur.

1.4.5. Enzimlerde anahtar kilit modeli

Enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve ya bu tepkimeye hangi substratın girmesi bakımından seçici davranırlar. Fischer (1894)'e göre bunun nedeni, enzim ve substratının geometrik şekilleri bakımından birbirinin tamamlayıcısı olmasıdır. Bu "anahtar kilit" modeli olarak adlandırılmıştır. Bu model enzim özgüllüğünü açıklasa bile geçiş halinin enzim tarafından stabilizasyonunu açıklamaz. "Anahtar ve kilit" modeli yetersiz sayılmakta ve bunun yerine "indüklenmiş uyum" modeli en yaygın olarak kabul edilen enzim-substrat-koenzim şeklidir.



Şekil 1.7. Enzimlerde anahtar kilit modeli

Koshland (1958) anahtar ve kilit modelinin bir değişik versiyonunu ileri sürmüştür. Enzimler göreceli olarak esnek yapıdadır. Bundan dolayı substrat enzimle etkileşirken

aktif bölgenin şekli devamlı substrat tarafından değiştirilmiştir (Koshland 1958). Bunun sonucu olarak, substrat sadece hareketsiz bir aktif bölgeye bağlanmaz, aynı zamanda aktif bölgeyi oluşturan aminoasit yan zincirleri biçim alarak enzimin katalitik işlevini yerine getirmesini sağlar. Bazı durumlarda, örneğin glikozidazlarda, substrat molekülünde aktif merkezle etkileşirken durumunu biraz değiştirmiştir (Vasella *et al.* 2002). Substrat tamamen aktif merkezle etkileşene kadar aktif merkez şeklini değiştirir ve o noktada şeklin ve yükün en son hali belirlenmiş olur.

1.4.6. Kofaktör ve Koenzim

1.4.6.a. Kofaktör

Bazı enzimler reaksiyonu katalizlemek için ek bir faktöre gerek duymazlar bunlara basit enzim denir. Fakat diğer enzimlerin aktivite göstermeleri için, kofaktör denen, protein olmayan moleküllere ihtiyaç duyarlar (De Bolster 1997). Kofaktörler inorganik veya organik bileşiklerdir. Organik kofaktörler ya prostetik grupturlar, bunlar enzime sıkıca bağlıdır ya da koenzimdir, bunlar tepkime sırasında enzimin aktif bölgesinden salınırlar. NADH, NADPH, FAD ve ATP koenzimler arasındadırlar. Bu moleküller enzimler arasında kimyasal grupları taşırlar (De Bolster 1997). Örneğin karbonikanhidraz kofaktör içeren enzimdir. Kofaktöre ihtiyaç duyan fakat bunlara bağlı olmayan enzimlere apoenzim veya apoprotein denir. Kofaktörüyle birlikte olan apoenzime holoenzim denir.

1.4.6.b. Koenzim

Koenzimler kimyasal grupları bir enzimden diğer enzime aktaran küçük organik moleküllerdir (Wagner and Folkers 1964). Bunlara örnek olarak vitaminler riboflavin, tiamin, ve folik asit verilebilir. Vitaminler vücutta üretilemezler ve dışarıdan alınması gerekir.

1.4.7. Enzimlerin biyolojik işlevi

Enzimlerin canlılar üzerinde çok çeşitli işlevleri vardır. Bunlara örnek olarak; sinyal iletimi ve diğer işlevlerin düzenlenmesinde kinaz ve fosforilaz (Hunter 1995), hareketi sağlamak için miyozin, aktif taşıma yapan iyon pompaları sayımı için ATPaz (Berg *et al.* 2001), ateş böceklerin ışık üretimi için lisuferaz gibi enzimler rol oynar (Meighen 1991). Enzimlerin bir başka önemli işlevi de nişasta ve protein gibi büyük moleküllerin amilaz ve proteaz gibi enzimlerle parçalanarak ince bağırsaktan emilimini sağlar. Canlılardaki metabolik olaylar çok hızlı olmalıdır bu da ancak enzimler tarafından sağlanır.

1.5. Bazı Antioksidan Enzimler

Antioksidan enzimlerin diğer bir adı oksidoredüktaz enzimlerdir. Yani indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

1.5.1. Glutatyon redüktaz (GR)

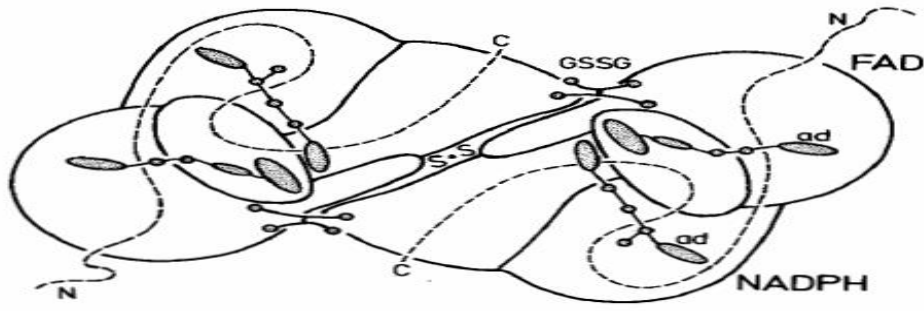
Glutatyon redüktaz (E.C.1.8.1.7), oksidoredüktaz enzim sınıfındandır (Angelucci *et al.* 2008). Yükseltgenmiş glutatyonun NADPH sayesinde indirgenmesini katalizleyen, metal içermeyen bir flavoproteindir (Can 2010). Bu enzimin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Glutatyon redüktazın yapısal özellikleri şunlardır;

İnsan eritrosit GR'si 478 aminoasitten meydana gelmektedir. Birbiriyle bağlantılı iki alt birimi vardır. Alt birimler moleküler eksenini çaprazlayan bir disülfür bağı ile kovalent bağı olarak birbirine bağlanmaktadır (Pai and Schulz 1983). (NH₂-) esnek olan ucu on

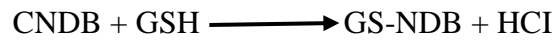
sekiz aminoasitten oluşmaktadır. Polipeptit zincirinin diğer kısmı geometrik olarak düzenlenmiş 4 bölgeden (domain) oluşmaktadır. Zincir boyunca uzanan baştaki ilk birinci bölge FAD'yi ikinci bölge ise NADPH'yi bağlar; iki alt birim arasında yer alan üçüncü bölge GSSG'nin ürüne dönüştüğü bölgeyi gösterir ve son olarak da dördüncü bölge bahsedilen bu üç bölge arasında da merkezi bir bölge olduğu düşünülmektedir (Douglas 1987).



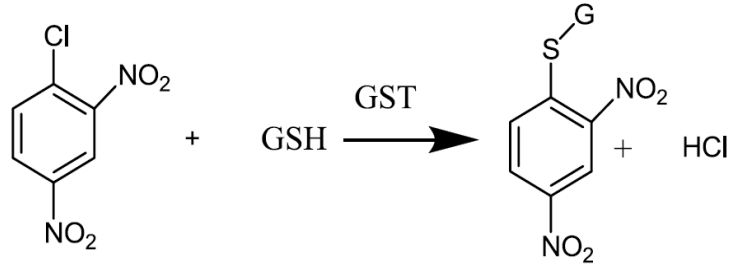
Şekil 1.8. İnsan eritrosit glutatyon redüktazının yapısı (Pai and Schulz 1983)

1.5.2. Glutatyon S-transferaz (GST)

İlk olarak 1879 yılında Meister ve ark. tarafından köpek idrarının izole edilmesiyle dolaylı olarak bulunan Glutatyon S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzimleri hücreyi sitotoksik ve genotoksik streslere karşı koruyabilen çok yönlü polimorfik bir izoenzim sınıfıdır (Habdous *et al.* 2002). Bu enzimin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;

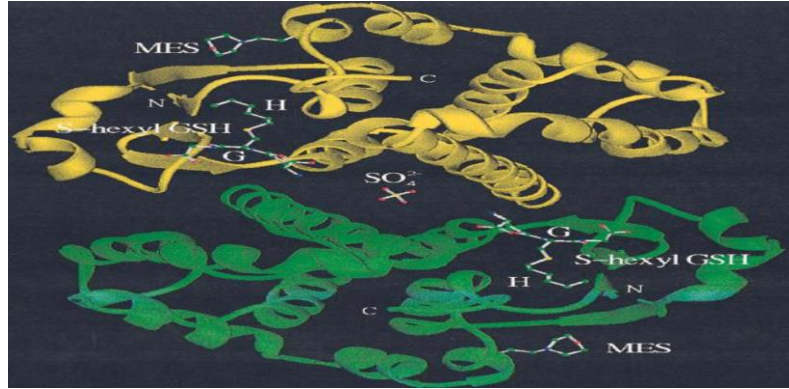


CNDB (1-cloro 2,4-dinitrobenzen)



Şekil 1.9. Glutatyon S-transferazın katalizlediği reaksiyon

Alt birimlerinin moleküler ağırlıkları 23-27 kda arasında değişir (Güven 2003). Homodimer ve heterodimer olarak dimerik protein yapısına sahiptirler (Güven 2003). Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. Her bir GST monomerinin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birbirine bağlayan iki bölgeden meydana gelmektedir. N-terminal bölge bir β -tabaka ve üç α -heliks yapısında sahip yaklaşık 80 aminoasitten oluşan GSH'ın bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanmaları için ihtiyaç duyulan H bölgesinden oluşmaktadır, C-terminal bölge kalan 5 veya 6 α -heliks yapısındaki aminoasidi içerir (Tuna 2008).



Şekil 1.10. Glutatyon S-transferazın yapısı (Oakley *et al.* 1997)

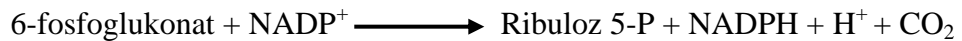
1.5.3. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat; NADP⁺ oksidoredüktaz, (E.C.1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir (Shannon *et al.* 2000). Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;

biyosentezi ve stereoid biyosentezi gibi diğer indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılır. Bu farkı mümkün kılmak için NADH ve NADPH kullanımı ve üretiminde içerilen sipesifik enzimler için yüksek kofaktör olmalıdır. Hem metabolik oksidasyon hem de indirgeyici hücreler için $[NAD^+]/[NADH]$ ve $[NADP^+]/[NADPH]$ oranları sırasıyla yaklaşık 1000 ve 0,01 de tutulmalıdır. Pentoz fosfat yolu NADPH ve riboz 5-fosfat için önemli bir kaynaktır. Nükleik asit ve nükleotitlerin sentezi için hücreye Ribuloz 5- fosfat (Ru5P) sağlar (Cook 2002).

1.5.4.b. 6-fosfoglukanat dehidrogenaz

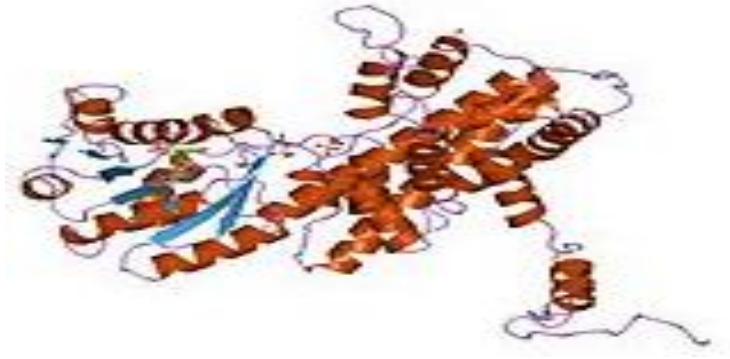
Cook (2002)' a göre 6-fosfoglukanat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44) çoğu türlerinde her birinin alt birimi için molekül ağırlığı 51000 Da' dur. 6-fosfoglukanat dehidrogenaz pentoz fosfat yolunun üçüncü adımında vardır. Bu enzim $NADP^+$ 'nın $NADPH$ 'a indirgenmesiyle 6- fosfoglukanat'dan Ribuloz 5 fosfat ve CO_2 üretimini katalizleyen enzimidir. Bu enzim oksidatif dekarboksilaza bağlı olunan piridin nükleotidin sınıfına aittir. Bu enzim sınıfları CO_2 ve keton üreten β -hidroksiasitin oksidatif dekarboksilasyonu katalizlemek için kofaktör olarak NAD^+ ve $NADP^+$ piridin nükleotidlerinden birini kullanır. Malik enzim gibi bu sınıf enzimlerin çoğu sipesifik reaksiyonları katalizlemek için divalent metal iyonunun varlığı gereklidir (Hsu and Lardy 1967). Metal iyonu, orta ketonun dekarboksilasyonun da içerilen Levis asidi olarak görev yapması amaçlanmıştır (Cook 2002). 6PGD enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir;



1.5.4.c. 6-fosfoglukanat dehidrogenazın yapısı

Son zamanlarda X-Ray çalışmalarda 6PGD nin bir apoenzim olduğunun yanı sıra ikili enzim-substrat kompleksinden ibaret olduğu da bulunmuştur. *Schizosaccharomyces pombe* hariç çoğu 6PGD homodimer yapısındadır. Her bir monomer üç domain içerir. İlk domain bir den yüz yetmiş altı ya kadar rezidü uzunluğunda bir $\beta\alpha\beta$ domainidir. Bu

proteinleri bağlayan tipik bir dinükleotiddir. İkinci domain C-terminus de açıkça ikincil yapısı olmaksızın kuyruğuyla 177 den 434 uzunluğunda bir helikal yapıdadır. Bu kuyruk karşıt alt birimin yerlerini aktifleştirmesine katkıda bulunur. Enzim-substrat kompleksi, kimyasal reaksiyonun yanı sıra 6PG'nin bağlayıcı rezidülerini belirlemeye yardım eder. Fonksiyonel iki üyesi vardır. Lys (Lizin) 183 ve Asn (Asparagin) 187 6PG'nin 3 hidroksi grubunda ki mesafesini hidrojen bağıyla bağlar. Asn 187 iyonlaşmadığından dolayı uygun şekilde pozisyonu olan Lys 183 temel için en iyi üyedir (Cook 2002).



Şekil 1.12. 6-fosfoglukonat dehidrogenazın yapısı (Adams *et al.* 1994)

1.6. Çalışmanın Amacı

Bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan temel besin elementlerinden olan azot ve fosfor, çeşitli nedenlerle topraktan uzaklaştırıldığından azotlu ve fosforlu gübrelemeye sürekli ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek verim için kaçınılmaz bir faktör olan besin maddesi gereksiniminin karşılanmasında kimyasal gübrelerin kullanılması ülkemizde her geçen yıl artış göstermektedir. Ancak kimyasal gübrelerin üretimi yüksek maliyet gerektirdiği gibi üretim süreçlerinde yenilenemeyen kaynakların tüketimine ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (Çakmakçı ve Erdoğan 2012). Konvansiyonel tarımda girdi maliyetlerinin artmasına rağmen, ulaşılabilecek sınırlara varıldığından, verim düşmeye başlamıştır. Kimyasal gübrelerin küresel azot dengesi, yeraltı sularının kirlenmesi, kimyasal kirlenme riskinin artması ve atmosferik azot oksitler başta olmak üzere sera gazlarının artması gibi birçok olayda olumsuz etkileri bulunmaktadır

(Çakmakçı 2005; Çakmakçı ve Erdoğan 2012). Azot gübresi üretimi ve kullanımı ile birlikte artan çevre tahribi alternatif teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmakta, gübre azotuna çevresel olarak kabul edilebilir biyolojik kaynakların araştırılması, adaptasyonu, geliştirilmesi ve benimsenmesini önemli bir hedef haline getirmektedir.

Bu çalışmada farklı bölgelerden izole edilerek tanılanan bazı biyolojik ve kimyasal gübrelere yanı sıra bakterilerin ayrı ayrı fener 3 çay klonuna aşılansarak bitki gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Büyüme teşvik edici özelliklerinin tespiti için, bitki boyu, gövde çapı, yaprak alanı, kuru ve yaş yaprak ağırlıkları, dal+yaprak ağırlığı ve klorofil içeriği ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca bu araştırmada özellikle antioksidan enzimlerden, glutatyon metabolizması enzimleri olan glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz ile pentoz fosfat yolu enzimlerinden glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfo glukonat dehidrogenaz enzim aktiviteleri belirlenerek, uygulamaların bitki büyümesi üzerindeki etkilerinin biyokimyasal mekanizmaları hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Bakterilerin kullanımıyla bitki antioksidan enzim aktivitesi artırılabilirse bitkisel gelişme ile birlikte bitkilerin stres koşullarına dayanıklılığı artırılabilir. Bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin antioksidan ve pentoz fosfat yolu enzimleri üzerine etkileriyle birlikte farklı stres koşullarına dayanıklılığını bakteriler kullanılarak artırıp artırılmayacağı üzerine araştırma yapmaktır. Antioksidan savunma sistemi üzerine bakterilerin etki etmesi durumunda gelecekte stres koşulları altında bitki gelişimini teşvik edici bakteri aşılansaların önemini artıracak ve yeni bir araştırma ve uygulama alanı ortaya çıkacaktır. Bu nedenlerle bu araştırmada bitki gelişimini teşvik edici bakteriler kullanılarak çay fidanlarında gelişme parametrelerine ilave olarak yaprak enzim aktivitelerini değiştirip değiştirmediğini araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Organik tarımın geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması sürecine katkıda bulunmak amacıyla çay bitkisi üzerinde gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızın farklı tarım ürünleri üzerindeki benzerlerini görmek mümkündür.

Singh *et al.* (2007)'in yaptığı çalışmada, farklı organik düzenleyiciler (*Actinomyces*, bakteri, mantar ve BGA) kullanarak pirinç verimi üzerindeki etkilerini incelemiştir. İlgili mikroorganizmaları tek tek ya da birleştirerek uygulamış ve pirinç verimi üzerinde kontrole kıyasla %114 ile 117 oranında artış gözlemiştir. Pirinç bitkisine uygulanan mikroorganizmalar, hastalık ve böcek saldırısından da koruma sağlamıştır. Bu mikroorganizmalar vasıtasıyla elde edilen organik gübrenin uygulandığı pirinçlerde dehidrogenaz ve fosfataz enzim aktivitelerinde önemli artışlar belirlenmiştir. Topraktaki organik karbon ve fosfor içerikleri kimyasal gübre uygulamanın yanı sıra organik tarım metotları da uygulandığında kontrole kıyasla önemli derecede artış belirlemiştir.

Pirinç bitkisi üzerine ilgili mikroorganizmaları birleştirerek muamele ettiğinde Mn, Fe, Zn ve Cu içeriğinde de artış gözlenmiştir (Singh *et al.* 2007).

Basinskiene *et al* (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada geleneksel tarım ve organik tarımla yetiştirilen bazı tahıllarda hidrolitik (α -amilaz, endoksilaz, proteaz) enzimlerin aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 2009 yılı boyunca hasat edilen 3 çeşit yulaf, 6 çeşit arpa, 3 çeşit çavdar 4 çeşit te buğday alınmıştır. Tahıllarda organik uygulamalar ve klasik uygulamalarda olmak üzere sırasıyla, α -amilaz aktivitesi 224 ten 1335 e kadar ve 814 den 1546 ya kadar, endoksilaz aktivitesi 0,13 ten 0,65 e, ve 0,06 dan 0,15 e kadar ve proteaz aktivitesi ise 4,89 dan 4,95 e ve 4,87 den 4,95 e kadar değiştiği belirlenmiştir. Bu veriler organik buğday, çavdar, yulaf klasik tarımla kıyaslandığında α -amilaz aktivitesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca çavdar, arpa ve yulafta klasik tarıma kıyasla endoksilaz aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aksine

arpadaki α -amilaz aktivitesi ve buğdaydaki endoksilaz aktivitesi zıt yönde gelişmiştir. Aynı uygulamalarda proteaz aktivitesinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Domates bitkisinde yapılan başka bir araştırmaya göre, organik tarım ile geleneksel tarım koşullarında C vitamini ve fenolik madde içeriklerine bakılmıştır. Ancak organik uygulamaların C vitamini üzerinde olumlu etkileri gözlenmemiştir. Enzim aktiviteleri bakımından değerlendirildiğinde, organik uygulamalarla elde edilen domates meyvelerindeki fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enzim aktiviteleri klasik uygulamalarla elde edilen meyvelerdeki aktiviteden %139 daha yüksek çıkmıştır. Lipid peroksidaz (LPO) ve Süper oksit dismutaz (SOD) aktiviteleri de organik tarım uygulamalarıyla elde edilen domateslerde %60'lara kadar yüksek çıkmıştır (Aurelice *et al* 2013).

Gurdeep and Sudhakara (2013)'in yaptığı çalışmada, PSBs (Fosfat çözücü bakteri) ve RP (fosfat kaya) gübresini kullanarak toprağın fizikokimyasal özelliklerini nasıl değiştirdiğini ve mısır ile buğday bitkisinin gelişimini nasıl etkilediğini incelemişlerdir. RP gübresinin yanı sıra fosfat çözücü bakterilerin aşılınması organik sahada mısır ve buğday verimini önemli derecede artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu uygulamalar toprağın uzun süreli verimliliğini sağlamış, organik tarımda etkili sürdürülebilir bir maliyet düşüşü ve olumlu bir üretim performansı sağlamıştır.

Çayın ilk üretim ve kullanımı Çin'de başlamıştır. Önce Hindistan, Japonya daha sonra Seylan, Güney-Doğu Asya, Pakistan, İran ve Rusya'ya, 1900-1915 arası Kenya, Tangonika, Rodezya, Yeni Zelanda, Uganda, Mozambik gibi Afrika ülkelerine yayılmıştır (Kaçar 1991).

Çalışmamızda aktivitelerini belirlediğimiz enzimlerden glutatyon redüktaz (E.C.1.8.1.7) enzimi çok sayıda kaynaktan izole edilmiş karakterize edilmiş ve aminoasit dizisi belirlenmiştir. İnsan eritrositlerinden ve E. coli bakterisinden elde edilen GR'nin yapısı X-Ray ile belirlenmiştir. Bu gözlemler sonucu bu enzimin dimerik olduğu ve alt birimlerin hepsinde FAD olduğu saptanmıştır (Danielson *et al.* 1999).

Glutasyon S-transferaz (GST) (E.C.2.5.1.18), ise glutasyon (GSH) ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması ile gerçekleşen merkaptürik oluşumundaki ilk basamağın katalizini sağlayan çok fonksiyonlu bir enzimdir (Andersson *et al.* 1988).

Pentoz fosfat yolu enzimlerinden glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, pentoz fosfat yolunun ilk ve kontrol enzimidir (Mehta *et al.* 2000). Bu enzim ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, D-G6P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6,4 ve 28°C'de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7,4'te ise yaklaşık 1,5 dakikadır (Levy 1979).

6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi ise pentoz fosfat metabolik yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizler ve 6-fosfoglukonat'ın ribuloz 5-P'a dönüşüm reaksiyonunu gerçekleştirir. Bu reaksiyon esnasında NADPH ve CO₂ oluşur. Oluşan NADPH'ler; aminoasit, lipit, nükleotid, hücre duvarı ve diğer hücre bileşenleri oluşması hücrel redoks potansiyelinin sürdürülmesi ve oksidatif strese karşı hücreyi korumak için gerekli indirgeyici güç olarak kullanılmaktadır (Korber 1992; Barrett and Le Page 1993).

Oksidatif pentoz fosfat yolu (OPPP) bitki metabolizması ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ile birlikte OPPP ana düzenleyici enzimi olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz üzerinde önemli role sahiptir. G6PD ve 6PGD aktivitesi nitrojen asimilasyonu için indirgeyici güç sağlamaktadır (Bowhser *et al.* 1989; Turpin *et al.* 1997). OPPP'nin temel düzenleyici enzimi G6PD olmakta ve döngüdeki ilk reaksiyonu katalize etmekte (Esposito *et al.* 2011) ve nitrat redüksiyonu için NADPH sağlamaktadır (Savidov *et al.* 1998). Bu reaksiyon indirgeyici güç olarak azot asimilasyonu (Nehaus and Emes 2000), oksidatif ve kuraklık stresi (Chen *et al.* 2004) ve patojen enfeksiyonu gibi bir dizi süreçte rol oynamaktadır.

Antioksidan enzimlerinden glutatyon redüktaz NADPH'a bağılı okside glutatyonun indirgenmiş glutatyona katalize eden flavoproteindir (Medici *et al.* 2004). Glutatyon redüktaz enzimi askorbat ve GSH'ın yeniden üretiminde rol oynamakta (Tanaka *et al.* 1994) ve enzimlerin oksidasyonunu önlemek süretiyle düşük ve yüksek sıcaklıklara karşı bitkileri korumaktadır (Mohaana *et al.* 1990). Antioksidan savunma sisteminde anahtar rol oynayan bu enzim düşük sıcaklık, oksijen düzeyi, hava kirliliğı, ağır metaller, yüksek ışık intensitesi, magnezyum noksanlığı ve kuraklık gibi çevresel stres koşullarına toleranslıdır (Tanaka *et al.* 1994; Chen *et al.* 2004). Glutatyon S-transferaz enzimi antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır (Taulavuori *et al.* 2004). GST bir çok stres koşullarında hücrelerin zarar görmesini engelleyen hayati öneme sahiptir (Ferrat *et al.* 2003). GST bitkilerin düşük sıcaklık, ağır metal ve oksidatif stresten korunmasında rol oynamaktadır (Anderson and Davis 2004; Ali *et al.* 2005). GR ve GST enzimleri stres koşullarına adaptasyonunda önemli role sahiptirler (Rios- Gonzales *et al.* 2002).

Bitkide stres koşullarına dayanıklılığın artırılması önemli bir araştırma alanı olduğu gibi, bitkilerin stres koşullarına adaptasyonunda antioksidan enzimlerinin büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Oral vd 2007; Çakmakçı 2009). Nitekim glutatyon metabolizmasının kilit enzimi olan glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz enzimleri serbest radikal hasarına karşı hücreleri korumakta, stres koşullarında hücrelerin zarar görmesini engellemekte, enzimlerin oksidasyonunu önlemek süretiyle düşük ve yüksek sıcaklıklara karşı bitkileri korumakta, antioksidan savunma sisteminde anahtar rol oynamakta, düşük sıcaklık, oksijen düzeyi, hava kirliliğı, ağır metaller, yüksek ışık intensitesi, magnezyum noksanlığı ve kuraklık gibi çevresel stres koşullarına dayanıklılıkla ilgili bulunmaktadır (Çakmak ve Römheld 1997; Anderson and David 2004; Gong et al. 2005). Bakteriler bazı enzimlere etki ederek bitkilerde moleküler düzeyde bazı fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Strese karşı bitki dayanıklılığının artırılması için alternatif bir yaklaşım ise bitki antioksidan enzimlerinin bakteriler kullanılarak artırılmasıdır (Çakmakçı vd 2007; Çakmakçı 2009). Nitekim bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin antioksidan ve pentoz fosfat yolu enzimleri üzerine etkisinin ele alındığı önceki bazı araştırmalarda bitki gelişimini teşvik edici ve

indol asetik asit üretici bakteri aşulamalarının buğday ve ıspanakta kök ve gövde ağırlığını artırdığı, azot ve fosfor beslenmesini teşvik ettiği, bitkilerin yapraklarında oksidatif pentoz fosfat yolu (G6PD ve 6PGD) ve antioksidan (GR ve GST) enzimleri ile birlikte bitki gelişimini artırabileceği ortaya konmuştur (Çakmakçı *et al.* 2007, 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Na₂SO₄ (Sodyum Sülfat), HCl (Hidroklorik asit), Tris, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), NaOH (Sodyum hidroksit), NaN₃ (Sodyum azid), KOH (Potasyum hidroksit), GSSG (Glutasyonun yükseltgenmiş formu), GSH (Glutasyonun indirgenmiş formu), NADP⁺ (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat), NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat indirgenmiş formu), 6PG (6-fosfoglukonat), G6P (Glukoz 6-fosfat), KH₂PO₄ (Potasyum fosfat), CDNB (1,kloro 2,4-dinitro benzen), Coomassie brillant blue G-250 ve PVP (Polivinil poliprolidan).

3.1.2. Kullanılan malzemeler

Beher, erlen, tüpler, tüplük, mezür, pipet, havan ve bar ependor tüpü, steril şırınga.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Santrifüj	: Hettrich Zentrifugen
pH-metre	: HANNA H1 8314 membrane
Karıştırıcı	: IKA [®] RH Basic2
Spektrofotometre	: Beckman Coulter DU [®] 730 Life Science UV/VIS
Hassas Terazî	: Denver
Krolofil metre	: Chlorophyll meter, SPAD-502, Minolta, Japan
Digital Kumpas	: Herdened

3.1.4. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.4.a. Enzim ekstraksiyonu tampon çözeltisi

3,028 g Tris, 14,204 g Na₂SO₄ ve 1 g NaN₃ hassas terazide tartılarak alınmıştır bir beherin içine konulmuştur sonra behere yaklaşık 950 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra behere pH metre daldırılmıştır. pH 8,5 olana kadar HCl eklenilmiştir. En sonunda son hacim saf su ile 1 l'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.b. Aktivite çözeltilerinin hazırlanması

0,1 M Tris-HCl 2 mM EDTA pH 7,0 500 ml tampon çözeltisi: 6,057 g Tris ve 0,292 g EDTA hassas terazide tartılıp ikisi de bir beher içerisine konulmuştur sonra behere 450 ml kadar saf su ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra beherin içine pH-metre daldırılıp ortamın pH'sı 7,0 olana kadar HCl damla damla ilave edildikten sonra son hacmi 500 ml olana kadar saf su ile tamamlanmıştır.

10 mM GSSG 20 ml çözeltisi: 0,123 g GSSG terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 20 ml saf suda çözülmüştür.

2 mM NADPH 20 ml çözeltisi: 0,033 g NADPH terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 20 ml Tris-HCl ve EDTA pH 7,0 olan tamponda çözülmüştür.

50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,5 500 ml tampon çözeltisi: 3,028 g Tris, 0,145 g EDTA hassas terazide tartılıp ikisi de bir beher içerisine konularak sonra behere 450 ml kadar saf su ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra beherin içine pH-metre daldırılıp ortamın pH'sı 7,5 olana kadar HCl damla damla ilave edildikten sonra son hacmi 500 ml olana kadar saf su ile tamamlanmıştır.

4 mM NADP⁺ 40 ml çözeltisi: 0,122 g NADP⁺ terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 40 ml Tris-HCl ve EDTA pH 7,5 olan tamponda çözülmüştür.

12 mM 6PG 20 ml çözeltisi: 0,0821 g 6PG terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 20 ml saf suda çözülmüştür.

12 mM G6P 20 ml çözeltisi: 0,0806 g G6P terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 20 ml saf suda çözülmüştür.

0,1 M Potasyum Fosfat pH 6,5 500 ml tampon çözeltisi: 6,804 g KH₂PO₄ hassas terazide tartılıp ikisi de bir beher içerisine konulmuştur sonra behere 450 ml kadar saf su ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra beherin içine pH-metre daldırılıp ortamın pH sı 6,5 olana kadar KOH damla damla ilave edildikten sonra son hacmi 500 ml olana kadar saf su ile tamamlanmıştır.

1 mM CDNB 50 ml çözeltisi: 0,0101 g CDNB terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 50 ml etanolde çözülmüştür.

20 mM GSH 20 ml çözeltisi: 0,123 g GSH terazide tartılıp şişeye konulmuştur. 20 ml potasyum- fosfat pH 6,5 tamponunda çözülmüştür.

Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi: 2 g Coomassie brilliant blue G- 250, 50 ml %95'lik etanolde çözülmüştür. Bu çözeltiliye 100 ml %95'lik fosforik asit ilave edilmiştir. Çözelti hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Süzgeç kâğıdından geçirilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deneme deseni ve deneme konuları

Deneme Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü Rize Atatürk Çay ve Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsüne bağlı Hayrat Deneme istasyonunda sekilerde iki yaşlı Fener 3 çay klonunda köklendirilmiş çay fidanları ile kurulmuştur. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Denemede toplam 14 uygulama: (1) Kontrol (bakteri aşılması ve mineral gübre uygulanmamış), (2) NPK 400 mg/kg kompoze (25-5-10) toprak veya 100 mg N, 9 mg P ve 33 mg K kg/toprak), (3) N (303 mg/kg toprak veya 100 mg N kg/toprak olacak şekilde); (4) Ticari Biyolojik gübre; (5) *Bacillus atrophaeus* RC55, (6) *Pseudomonas putida* 3/10, (7) *Paenibacillus polymyxa* RC05, (8) *Bacillus pumilus* 39/4, (9) *Bacillus lentus* 29/6, (10) *Bacillus megaterium* RC07; (11) *Bacillus subtilis* RC63, (12) *Pseudomonas fluorescens* T26, (13) *Bacillus subtilis*, 3/3 ve (14) *Pseudomonas fluorescens* RC77 uygulamaları beşer tekerrürlü olacak şekilde eşit miktarda toprakla doldurulmuş saksılara tesadüfi olarak dağıtılmıştır. Mineral gübre elenmiş toprağın saksılara doldurulma aşamasında uygulanmıştır. Bakteri aşılama taşıyıcılar fidan dikimi esnasında bitki kök bölgesine uygulanmıştır. Bakteri kombinasyonlarının hazırlanmasında bakterilerin azot fiksetme, fosfat çözme, aminosiklopropan karboksilat deaminaz aktivitesi, kullandıkları karbon kaynakları ve gram negatif ve pozitif olma özellikleri de dikkate alınmıştır.

3.2.2. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması ve uygulanması

Bakteri süspansiyonları fidan dikimi esnasında bitki kök bölgesine uygulanmıştır. Fidanların bakteri aşılama Daldırma ve Enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Dikim esnasında inokulasyon (aşılama) köklenmiş çay fidan köklerinin 60 dakika bütünüyle bakteri süspansiyonu içine daldırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dikim sonrası 5 ml bakteri süspansiyonu (10^9 cfu ml⁻¹ seyreltilmiş) steril şırınga kullanılarak kök rizosferinin orta kısmına enjekte edilerek aşılama tekrarlanmıştır. Süspansiyonlar ve biyolojik gübre hazırlanırken suşlar saf kültür olarak NB ortamında 28°C'de

geliştirilmiş ve 10^8 CFU/ml konsantrasyonda sıvı taşıyıcı içinde formülasyon için kullanılmıştır. Biyoreaktörde tamamen organik maddelerden oluşan ve buharla sterilizasyonu yapılan taşıyıcı sıvıya 1:10 oranında karıştırılarak aşılama yapılmıştır. Bu taşıyıcı formülasyonun içeriği; su, çeşitli organik maddeler (yosun, peynir altı suyu vb bitkisel maddeler) ve içeriğindeki bakteri izolatını koruyucu ve homojenizasyonunu sağlayıcı çeşitli maddelerden (karboksimetilseluloz, kalsiyum karbonat) oluşmuştur. Bakteri aşılması yapılan organik sıvı taşıyıcı biyoreaktörde yine optimum gelişme koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Mililitredeki canlı bakteri sayımları (kob) da yapılarak bakteri konsantrasyonunun 1×10^8 hücre/ml'yi geçtiği süre olan 48 saatin sonunda tamamen steril koşullarda paketleme yapılarak sıcaklığı 5°C olan soğuk odada muhafaza edilerek kullanılmıştır.

3.2.3. Araştırmada kullanılan bakteriler ve özellikleri

Araştırmada kullanılan bakterilerden *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Pseudomonas fluorescens* RC77 ve *Bacillus subtilis* 3/3 yabancı ahududu rizosfer toprağından (Çakmakçı *et al.* 2007; Çakmakçı vd 2008), *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus megaterium* RC07 buğday (Çakmakçı *et al.* 2006), *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 çavdardan (Çakmakçı *et al.* 2010) Prof. Dr. Ramazan Çakmakçı tarafından izole edilmiş ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde Kültür koleksiyonunda muhafaza edilmiştir. Bu izolatların fosfor çözüme ve serbest azot fiksasyon özellikleri önceden test edilmiş ve farklı araştırmalarda kullanılmıştır. Bakteri özellikleri (Çizelge 3.1.)'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan bakterilerin özellikleri

Strain No	MIS Tanı Sonucu	Gram reaksiyon	Oksidaz Test	Katalaz Test	N-free Ortamda Gelişme	Sükroz Test	NBRIP-BPB Ort. Gelişme	Amilaz Test	ACCD
Kontrol	<i>Bakteri ve gübresiz</i>								
NPK									
N									
MFLU	<i>Biyolojik Gübre</i>								
55/6	<i>Bacillus atrophaeus</i>	+	-	K+	K+	+	+	+	4
3/10	<i>Pseudomonas putida</i>	-	K+	+	K+	K+	+	-	2
RC05	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	+	+	+	-	+	K+	2
39/4	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	K+	+	-	+	-	2
29/6	<i>Bacillus lentus</i>	+	-	K+	+	Z+	K+	-	3
RC07	<i>Bacillus megaterium</i>	+	Z+	K+	+	-	K+	-	3
RC63	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	K+	K+	-	Z+	+	3
T26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	+	+	+	-	2
R3/3	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	K+	8
RC 77	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	K+	K+	+	-	2

3.2.4. Çay bitkilerinde gelişme ve verim parametrelerinin incelenmesi

3.2.4.a. Bitki boyu (Gövde boyu)

Kök boğazından itibaren en üstteki dalın ucuna kadar olan yükseklik ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.4.b. Gövde çapı (Gövde kalınlığı)

Gövde çapı fidanların kök boğazından 5 cm yukarıdaki kalınlık kumpas ile ölçülerek belirlenmiştir. Gövde çapı ölçümünde bitkide kök boğazının yakınından dallanma olması durumunda çap dallanmanın başladığı noktadan ölçüm yapılmıştır.

3.2.4.c. Yaprak alanı

Önce fidanlardan ortalama büyüklükteki yapraklar alınıp alanları hesaplanmıştır, daha sonra bunların ortalaması alınmıştır. Yaprak alanı ölçümü yaprak alan ölçer ile yapılmıştır.

3.2.4.d. Yaş yaprak ağırlığı

Denemeler her bir yetiştirme mevsiminin sonunda fidanlar eşit yüksekliklerden budanarak fidanlara ait yapraklar tartılarak toplam yaş yaprak ağırlığı belirlenmiştir.

3.2.4.e. Kuru yaprak ağırlığı

Yaş yaprak verimi tartılarak belirlenen numuneler darası önceden belirlenmiş kağıt torbalar içinde etüvde 65-70 °C'yi aşmayan sıcaklıkta kurutularak kuru yaprak ağırlığı belirlenmiştir.

3.2.4.f. Dal+yaprak ağırlığı

Araştırmanın yürütüldüğü yetiştirme mevsiminin sonunda fidanlar eşit yüksekliklerden budanarak, kök akzama dışında kalan toplam yaş ve kuru dal+yaprak ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.4.g. Yaprak klorofil ölçümü

Yaprak klorofil içeriği klorofil ölçer (chlorophyll meter, SPAD-502, Minolta, Japan) kullanılarak üstten aşağı 3 ve 4. yapraklarda her bir yaprakta 4 ölçüm yapılarak belirlenmiştir (Neufeld *et al.* 2006; Yıldırım *et al.* 2009).

3.2.5. Enzim ekstraksiyonunun hazırlanması

Her bir çay numunesinden 2 g, sıvı azotta dondurularak toz haline getirilmiştir ve %1 PVP (Polivinil poliprolidan) katılmıştır. Sonra üzerine 0,05 M Tris-HCl 1 mM EDTA 0,1 M Na₂SO₄ 1 g NaN₃ den oluşan pH 7,3 500 ml ekstraksiyon tamponu eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 25 dakikada 4°C 20.000 g santrifüj edilmiştir ve safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kabul edilmiştir. Bu ham ekstrakt enzim aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Enzim aktivitesine şu şekilde belirlenmiştir.

3.2.6. Glutasyon redüktaz için aktivite ölçümü

Çizelge 3.2. Glutasyon redüktaz için aktivite çözeltileri

Çözeltiler	Kontrol Küveti	Enzim küveti
0,1 M Tris-HCl 0,002 M EDTA pH= 7,0	900 µl	850 µl
10 mM GSSG	50 µl	50 µl
2 mM NADPH	50 µl	50 µl
Enzim Ekstraksiyonu	---	50 µl

Toplam hacmi 1 ml olan ölçüm küvetleri 850 µl 0,1 M Tris-HCl 2 mM EDTA pH 7,0 50 µl 20 mM GSSG, 50 µl 2 mM NADPH ve 50 µl enzim oluşturulmuş. Reaksiyon enzimin katılmasıyla başlatılmıştır. Aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak 25 °C'de 340 nm'deki absorbans azalışı 2,5 dakika boyunca kaydedilmesiyle belirlenmiştir. 1 enzim ünitesi ölçüm şartlarında 1 dakikada 1 µmol ürünün (NADPH) oluşması olarak tanımlanmıştır ve aktivite değerleri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD/dak}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E}$$

V_T : Toplam Hacim

V_E : Enzim Hacmi

EÜ : Enzim ünitesi

Δ OD/dak : Dakikadaki absorbands farkı

3.2.7. Glutasyon S-transferaz için aktivite ölçümü

Çizelge 3.3. Glutasyon S-transferaz için aktivite çözeltileri

Çözeltiler	Kontrol Küveti	Enzim küveti
0,1M KH ₂ PO ₄ pH= 6,5	930 µl	880 µl
20 mM GSH	50 µl	50 µl
1 mM CNDB	20 µl	20 µl
Enzim Ekstraksiyonu	---	50 µl

Toplam hacmi 1 ml olan ölçüm küvetleri 880 µl 0,1 M K-fosfat pH 6,5, 50 µl 20 mM GSH, 20 µl 1 mM CDNB (%1 etanol içinde) ve 50 µl enzimden oluşturulmuş. Reaksiyon enzimin katılmasıyla başlatılmıştır. Aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak 25°C’de 340 nm’deki absorbands artışının 2,5 dakika boyunca kaydedilmesiyle belirlenmiştir. 1 enzim ünitesi ölçüm şartlarında 1 dakikada 1 µmol ürünün (GS-DNB) oluşması olarak tanımlanmıştır ve aktivite değerleri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD/dak}{9,6} \times \frac{V_T}{V_E}$$

3.2.8. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz için aktivite ölçümü

Çizelge 3.4. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz için aktivite çözeltileri

Çözeltiler	Kontrol Küveti	Enzim küveti
50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH= 7,5	900 µl	850 µl
12 mM G6P	50 µl	50 µl
4 mM NADP ⁺	50 µl	50 µl
Enzim Ekstraksiyonu	---	50 µl

Toplam hacmi 1 ml olan ölçüm küvetleri 850 µl 50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,5, 50 µl 12 mM G6P, 50 µl 4 mM NADP⁺ ve 50 µl enzim oluşturulmuş. Reaksiyon enzimin katılmasıyla başlatılmıştır. Aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak 25°C'de 340 nm'deki absorbans artışının 2,5 dakika boyunca kaydedilmesiyle belirlenmiştir. 1 enzim ünitesi ölçüm şartlarında 1 dakikada 1 µmol ürünün (NADPH) oluşması olarak tanımlanmıştır ve aktivite değerleri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD/dak}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E}$$

3.2.9. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz için aktivite ölçümü

Çizelge 3.5. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz için aktivite çözeltileri

Çözeltiler	Kontrol Küveti	Enzim küveti
50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH= 7,5	900 µl	850 µl
12 mM 6PG	50 µl	50 µl
4 mM NADP ⁺	50 µl	50 µl
Enzim Ekstraksiyonu	---	50 µl

Toplam hacmi 1 ml olan ölçüm küvetleri 850 µl 50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,5, 50 µl 12 mM 6PG, 50 µl 4 mM NADP⁺ ve 50 µl enzim oluşturulmuş. Reaksiyon enzimin katılmasıyla başlatılmıştır. Aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak 25°C’de 340 nm’deki absorbans artışının 2,5 dakika boyunca kaydedilmesiyle belirlenmiştir. 1 enzim ünitesi ölçüm şartlarında 1 dakikada 1 µmol ürünün (NADPH) oluşması olarak tanımlanmıştır ve aktivite değerleri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD/dak}{6.22} \times \frac{V_T}{V_E}$$

3.2.10. Protein tayini (Comassie- Brilliant Blue G-250)

Hazırlanan Comassie- Brilliant Blue G-250 çözeltisi önceden numaralanmış tüplere 2,5 ml aktarılmıştır. Sonra bu tüplere 50 µl enzim çözeltisi ilave edilmiştir. 595 nm’de absorbans değerlerine bakılmıştır.

3.2.11. Standart grafik elde edilişi

Bu yöntemde standart protein olarak sığır serum albumini kullanılmıştır. Tayin işlemleri şöyle yapılmıştır 1 ml’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınarak saf su ile 0,1

mL'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 5 ml coomassie-blue reaktifi ilave edilerek karıştırılmıştır. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml Coomassie-blue reaktifinden oluşan karışım kullanılmıştır. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değeri okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde gösterilmiştir.

3.2.12. İstatistik analizleri

İstatistik bakımından çalışma sonuçlarının kantitatif bulguları SPSS programında ortalama değerler ve standart sapmalar bulunmuştur.

Aritmetik ortalama: Aritmetik ortalama formülü aşağıdaki gibidir;

$$\bar{X} = \frac{\sum X_1}{N}$$

Standart Sapma: Standart sapmaların formülü aşağıdaki gibidir;

$$SD = \pm \sqrt{\frac{\sum X_1^2 - \frac{(\sum X_1)^2}{N}}{N-1}}$$

't' testi: bulunan analiz değerlerinin ortalamalar arasında farkın önemli olup olmadığını anlamak için 't' testi yapılmıştır. 't' aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$S^2_{\bar{X}_1} = \frac{(N_1-1)S_1^2 + (N_2-1)S_2^2}{N_1 + N_2}$$

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{S^2_{\bar{X}_1} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

Sonuç olarak t değeri;

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

Probabilite (P) değeri: t hesabından serbestlik derecesine göre bulunan değerdir.

$P > 0,05$ olursa fark önemsiz,

$P < 0,05$ olursa fark önemli,

$P < 0,01$ olursa fark çok önemlidir.

Σ	: Toplam işareti
N	: Analiz sayısı
\bar{X}	: Her bir analizin ortalaması
SD	: Standart sapma
t	: Kritik değer
$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}$: Ortalama değerler arasındaki fark hatası
p	: Probabilite değer
$S^2 \bar{X}_1$: Her iki analizin varyansını ifade eder

4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

4.1. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Bitki Boyu ve Gövde Çapı Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Fener 3 çay klonunun bitki boyu ve gövde çapı değerleri hesaplanıp varyasyon analizi SPSS istatistik programında yapılmıştır. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi uygulamaların bitki boyu ve gövde çapına etkilerinin önemli olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Fener 3 çay klonu bitki boyu ve gövde çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O		F		Ö.S.
		Bitki boyu	Gövde çapı	Bitki boyu	Gövde çapı	
Uygulamalar	13	28,69	2,079	6,22	23,92	0,00
Hata	56	4,61	0,087			

4.2. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Yaprak Alanı, Yaş Yaprak ve Kuru Yaprak Ağırlığı Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Fener 3 çay klonunun yaprak alanı, kuru yaprak ağırlığı ve yaş yaprak ağırlığı değerleri hesaplanıp varyans analizi yapılmış ve bakteri uygulamalarının bu parametreler üzerindeki etkileri anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Fener 3 çay klonu yaprak alanı, yaş yaprak ve kuru yaprak ağırlığı değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O			F			Ö.S.
		Yaprak alanı	Yaş yaprak ağırlığı	Kuru yaprak ağırlığı	Yaprak alanı	Yaş yaprak ağırlığı	Kuru yaprak ağırlığı	
Uygulamalar	13	8,87	36,91	17,43	3,698	120,33	147,53	0,00
Hata	56	2,39	0,307	0,118				

4.3. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki Dal +Yaprak Ağırlığı ve Klorofil İçeriği (SPAD Değeri) Değerlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Fener 3 çay klonun dal+yaprak ağırlığı ve klorofil SPAD değerleri uygun metotlarla ölçülerek hesaplanıp varyans analiz değerlendirilmesi yapılmıştır. Uygulamalar dal+yaprak ağırlığı ve klorofil içeriği değerlerini önemli derecede etkilemiştir.

Çizelge 4.3. Fener 3 çay klonu dal+yaprak ağırlığı ve klorofil içeriği (SPAD değeri) değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O		F		Ö.S.
		Dal + yaprak ağırlığı	Klorofil (SPAD değeri) içeriği	Dal + yaprak ağırlığı	Klorofil (SPAD değeri) içeriği	
Uygulamalar	13	93,54	140,96	130,2	8,66	0,00
Hata	56	0,718	16,27			

4.4. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonunda Büyüme Faktörleri Üzerine Etkileri

Biri kontrol olmak üzere ayrı ayrı uygulamaların aşılandığı fener 3 çay klonu örneklerinin bitki boyu, gövde çapı, yaprak alanı, yaş yaprak ağırlığı, kuru yaprak ağırlığı, dal+yaprak ağırlığı ve klorofil (SPAD) içeriği değerleri kendi birimleri cinsinden ölçülüp istatistiki olarak SPSS programında hesaplanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre en yüksek bitki boyu *Bacillus subtilis* RC63, en yüksek gövde çapı biyolojik gübre uygulamasıyla elde edilmiştir. Yaprak alanı bakımından *Bacillus subtilis*, 3/3, biyolojik gübre ve NPK uygulamaları öne çıkmıştır. En yüksek yaş ve kuru yaprak ağırlığı *Bacillus subtilis* 3/3, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* RC63 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 aşılamalarıyla elde edilmiştir. En yüksek dal+yaprak ağırlığı ise *Pseudomonas fluorescens* RC77 bunu sırasıyla *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* RC63, *Bacillus subtilis*, 3/3 ve biyolojik gübre izlemiştir. Yaprak klorofil içeriği bakımından en etkin uygulama *Bacillus pumilus* 39/4 aşılması olurken bunu biyolojik gübre, NPK, *Pseudomonas fluorescens* T26 ve tek başına azot uygulaması izlemiştir.

Çizelge 4.4. Mineral gübre, biyolojik gübre ve farklı bakteri uygulamalarının fener 3 çay klonunda büyüme faktörleri üzerine etkileri

Uygulama	Bitki boyu (cm)	Gövde çapı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaş yaprak ağırlığı (g/fidan)	Kuru yaprak ağırlığı (g/fidan)	Dal+Yaprak ağırlığı (g/fidan)	Klorofil (SPAD değeri) içeriği
Kontrol	49,86±1,65 e	6,09±0,13 e	25,26±1,45 d	15,68±0,37 e	7,89±0,19 d	23,71±0,71 f	66,79±0,91 d
NPK	56,66±1,61 bc	7,27±0,46 b	28,82±1,97 ab	18,46±0,96 cd	8,83±0,46 c	27,59±1,43 e	82,27±7,37 a
N	55,02±1,74 cd	7,30±0,14 b	27,73±0,85 a-c	19,12±0,29 c	10,21±0,16 b	29,81±0,46 d	73,29±2,66 bc
Biyolojik gübre	58,28±1,85 ab	7,82±0,11 a	29,34±1,59 a	20,61±0,39 b	10,19±0,15 b	31,01±0,47 c	82,14±1,59 a
<i>Bacillus atrophaeus</i> RC55	54,38±1,97 cd	5,67±0,37 f	25,71±2,14 cd	14,91±0,80 e	7,11±0,43 e	23,88±0,82 f	66,75±3,65 d
<i>Pseudomonas putida</i> 3/10	54,95±3,08 cd	6,58±0,31 cd	26,99±1,75 b-d	15,15±0,93 e	7,06±0,43 e	23,12±1,44 f	71,47±3,11 b-d
<i>Paenibacillus polymyxa</i> RC05	53,39±2,92 d	6,69±0,55 c	25,27±2,89 d	14,95±0,33 e	7,00±0,44 e	22,98±0,82 f	68,36±6,20 cd
<i>Bacillus pumilus</i> 39/4	54,79±1,62 cd	7,37±0,36 b	27,48±1,03 a-d	17,96±0,36 d	8,12±0,16 d	26,66±0,55 e	82,78±3,22 a
<i>Bacillus lentus</i> 29/6	54,87±1,84 dc	6,28±0,18 de	27,33±1,28 a-d	14,96±0,71 e	6,87±0,32 e	23,03±1,04 f	71,95±2,73 b-d
<i>Bacillus megaterium</i> RC07	55,41±1,17 b-d	7,47±0,15 ab	26,87±1,19 b-d	18,15±0,39 d	10,32±0,18 b	28,98±0,74 d	71,80±5,69 b-d
<i>Bacillus subtilis</i> RC63	60,59±3,57 a	7,49±0,20 ab	26,68±0,62 b-d	21,14±0,39 b	11,13±0,48 a	32,56±0,71 b	73,46±0,62 bc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> T26	54,25±2,54 cd	7,49±0,17 ab	27,88±1,22 a-c	21,16±0,41 b	11,57±0,55 a	32,53±0,55 b	74,57±1,16 b
<i>Bacillus subtilis</i> , 3/3	55,19±1,60 dc	7,42±0,15 ab	29,43±0,49 a	22,01±0,51 a	11,46±0,30 a	32,15±0,88 a	72,51±6,83 b-d
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RC77	55,68±1,35 b-d	7,43±0,68 ab	27,51±1,45 a-d	21,33±0,19 ab	11,52±0,12 a	33,18±0,36 b	72,86±1,78 bc

Not: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar kendi grubunda önemli ($p < 0.05$) değildir. ± Standart hata,¹

4.5. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Fener 3 Çay Klonu GR, GST, G6PD ve 6PGD enzim aktiviteleri değerleri varyans analiz değerlendirilmesi SPSS istatistik programında yapılmıştır. Çizelge 4.5, Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi uygulamalar ölçülen enzim aktivitesi değerlerini önemli düzeyde artırmıştır.

Çizelge 4.5. Fener 3 çay klonu GR ve GST değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	K.O		F değeri		Ö.S.
		GR	GST	GR	GST	
Uygulama	13	1,145	0,654	33,22	6,84	0,00
Hata	56	0,034				

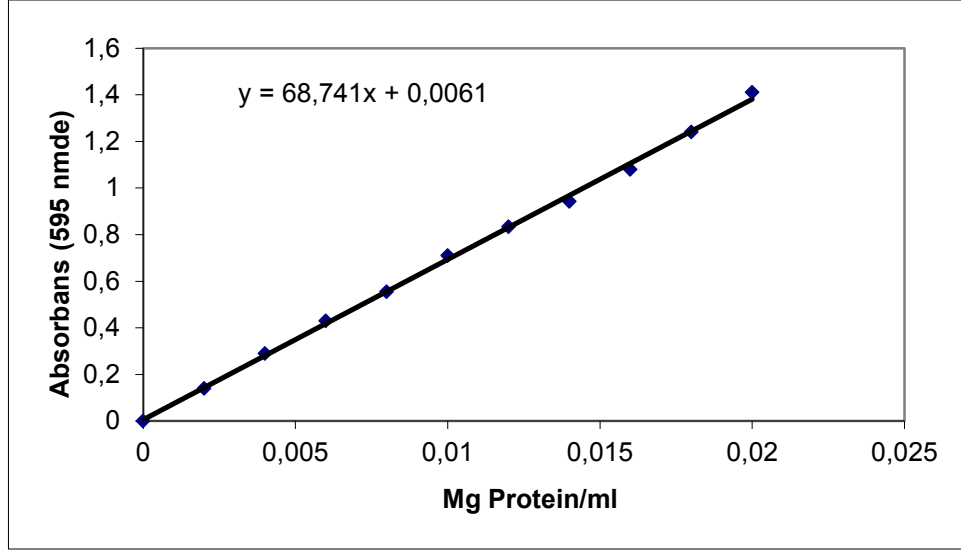
Çizelge 4.6. Fener 3 çay klonu G6PD ve 6PGD değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	K.O		F		Ö.S.
		G6PD	6PGD	G6PD	6PGD	
Uygulama	13	0,683	0,542	53,159	21,67	0,00
Hata	56	0,012	0,025			

4.6. Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafik

Proteinleri kantitatif olarak saptamak için Coomassie-brillant blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlanmıştır. Standart serum albumin çözeltileri ile hazırlanan homojenatlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre

belirlenmiştir. Standart çözeltideki miligram proteine karşılık gelen absorbans değerleri (Şekil 4.1)'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

4.7. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri

Biri kontrol olmak üzere ayrı ayrı bazı uygulamaların aşılandığı fener 3 çay klonu örnekleri spektrofotometrede 340 nm'de okunarak enzim aktiviteleri EÜ/mg protein olarak hesaplanmış olup istatistiki olarak SPSS programında hesaplanmıştır. Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi kontrole kıyasla *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalar yaprak GR aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Yaprak GST aktivitesi *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus subtilis* RC63 aşılanmaları ile kontrole kıyasla önemli oranda artırmıştır. Yaprak G6PD akktivitesi *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki tüm uygulamalarla önemli düzeyde artış gözlenmiştir. Çay yaprak 6PGD enzim aktivitesi ise başta *Pseudomonas putida* 3/10 olmak üzere *Pseudomonas fluorescens* T26, biyolojik gübre, *Pseudomonas fluorescens* RC77, *Bacillus subtilis*, 3/3, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, NPK ve N uygulamalar ile istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

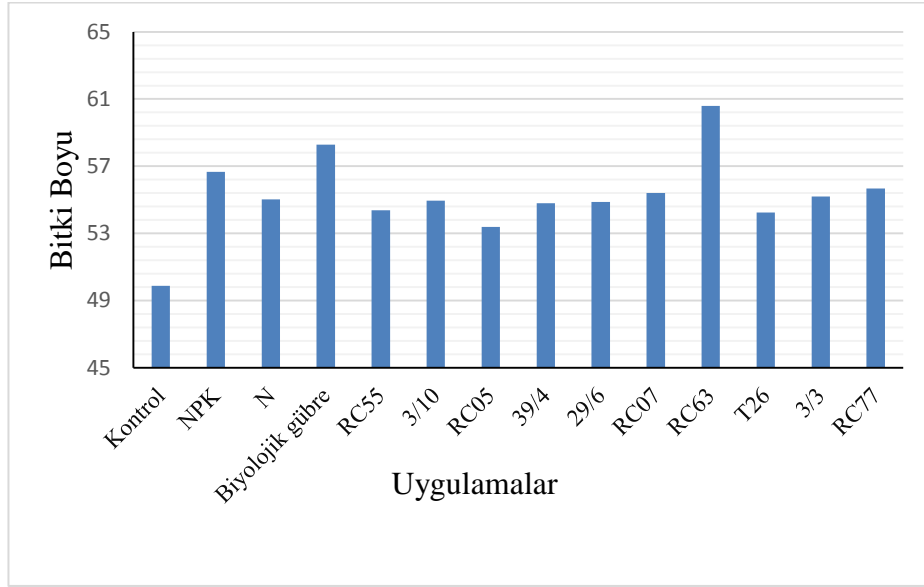
Çizelge 4.7. Mineral gübre, biyolojik gübre ve bakteri uygulamaların fener 3 çay klonunda GR, GST, G6PD ve 6PGD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulama	GR	GST	G6PD	6PGD
Kontrol	1,41±0,02 e	1,84±0,42 c	1,28±0,02 e	1,07±0,21 d
NPK	2,52±0,16 a-c	2,10±0,14 b-d	1,52±0,09 d	1,43±0,20 c
N	2,47±0,05 a-c	2,18±0,04 bc	1,60±0,03 d	1,41±0,04 c
Biyolojik gübre	2,62±0,08 ab	2,23±0,25 bc	1,88±0,04 c	1,84±0,04 ab
<i>Bacillus atrophaeus</i> RC55	2,71±0,50 ab	1,78±0,78 cd	2,17±0,12 b	1,19±0,39 d
<i>Pseudomonas putida</i> 3/10	2,74±0,09 a	2,00±0,10 b-d	2,05±0,03 b	2,04±0,10 a
<i>Paenibacillus</i> <i>polymyxa</i> RC05	2,62±0,14 ab	2,09±0,64 b-d	1,62±0,11 d	1,09±0,03 d
<i>Bacillus pumilus</i> 39/4	1,44±0,25 e	3,01±0,10 a	2,40±0,09 a	1,09±0,08 d
<i>Bacillus lentus</i> 29/6	1,47±0,08 e	2,73±0,06 e	1,26±0,25 e	1,12±0,20 d
<i>Bacillus megaterium</i> RC07	2,56±0,07 ab	2,20±0,06 bc	1,81±0,12 c	1,53±0,05 c
<i>Bacillus subtilis</i> RC63	2,28±0,05 cd	2,30±0,03 b	1,83±0,05 c	1,45±0,02 c
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> T26	2,17±0,05 d	2,20±0,11 bc	2,48±0,15 a	1,87±0,12 ab
<i>Bacillus subtilis</i> , 3/3	2,46±0,30 bc	1,70±0,08 d	2,06±0,05 b	1,58±0,12 c
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> RC77	2,16±0,06 d	1,81±0,07 cd	1,84±0,17 c	1,81±0,15 b

Not: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar kendi grubunda önemli ($p < 0.05$) değildir. ± Standart hata,²

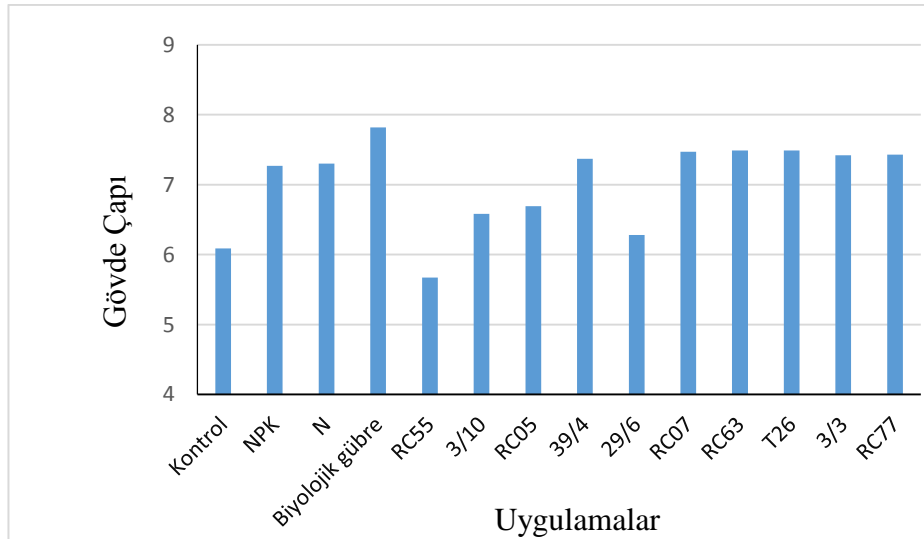
4.8. Bazı Uygulamaların Fener 3 Çay Klonundaki büyüme parametreleri, GR, GST, G6PD ve 6PGD Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerine Ait Grafikler

Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların çay numunesindeki bitki boyu değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Gübreler ve bakteriler kontrole göre kıyaslanmış ve en büyük artış *Bacillus subtilis* RC63 bakteri inokulasyonu ile elde edilmiştir (Şekil 4.2).



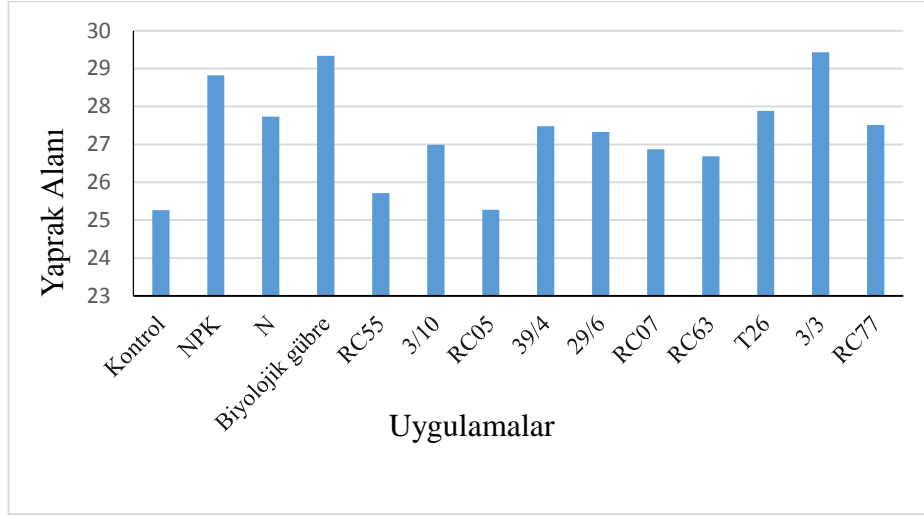
Şekil 4.2. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların bitki boyu üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların, çay numunesindeki gövde çapı değerlerine karşı grafiği aşağıda görülmektedir. Kontrole kıyasla en büyük artış biyolojik gübrede gözlenmiştir (Şekil 4.3).



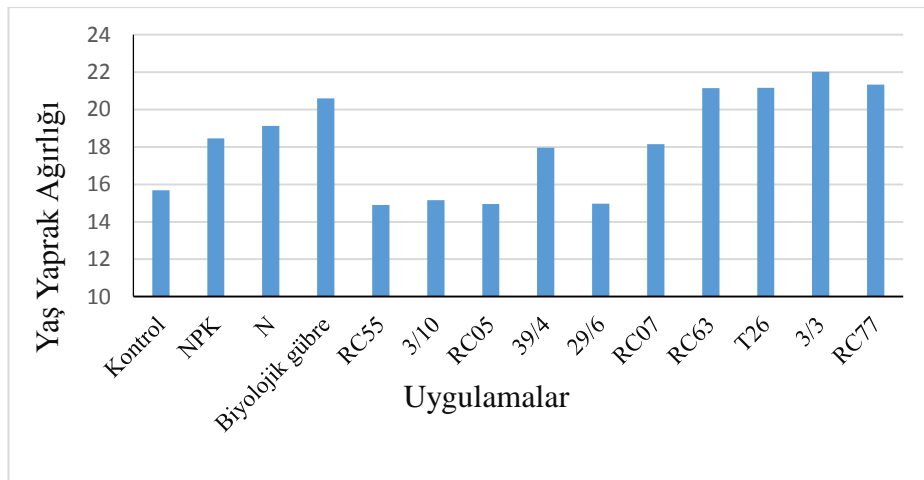
Şekil 4.3. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların gövde çapı üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşıl原因 bazı uygulamaların çay numunesindeki yaprak alanı değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Bu uygulamalarda kontrole kıyasla en büyük artışlar NPK, *Pseudomonas fluorescens*, biyolojik gübre ve *Bacillus subtilis* 3/3 te olmuştur (Şekil 4.4).



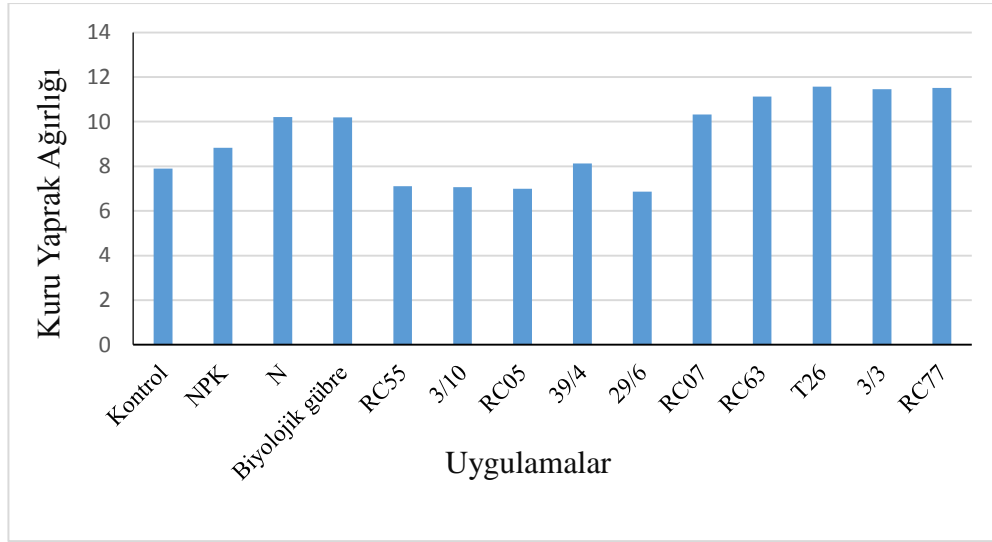
Şekil 4.4. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların yaprak alanı üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşıl原因 bazı uygulamaların çay numunesindeki yaş yaprak ağırlık değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Bu uygulamalar kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artış *Bacillus subtilis* 3/3 te olmuştur (Şekil 4.5).



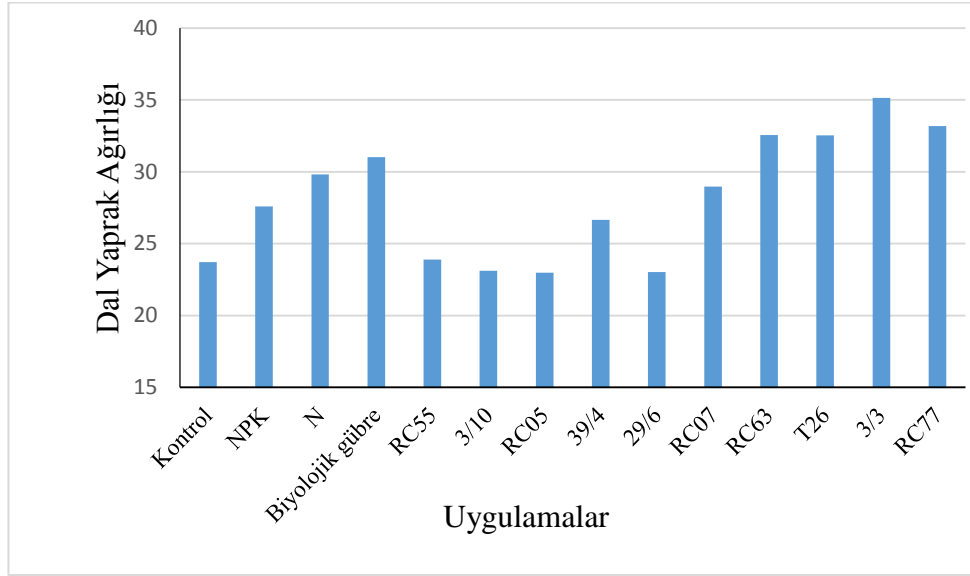
Şekil 4.5. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların yaş yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların çay numunesindeki kuru yaprak ağırlığı değerlerine karşı grafiği (Şekil 4.6)'deki gibi verilmiştir. Bu uygulamalar kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artışlar *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ile *Pseudomonas fluorescens* RC77 de gözlenmiştir.



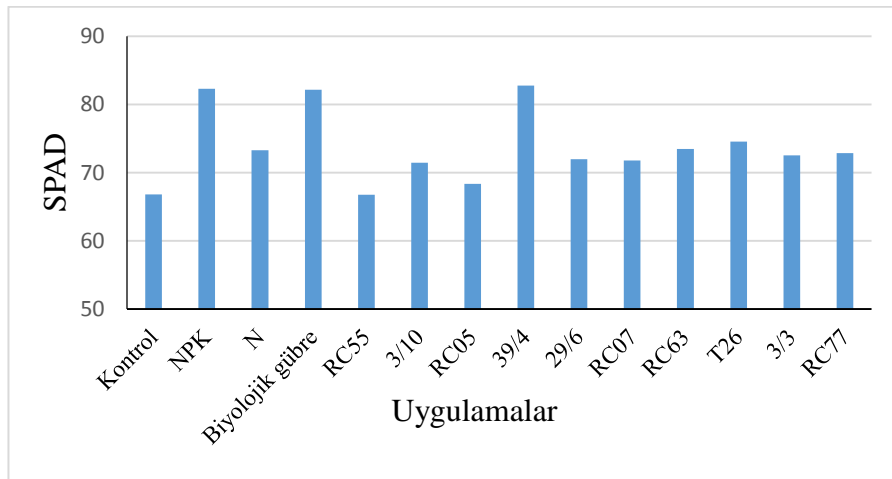
Şekil 4.6. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların kuru yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların çay numunesindeki dal+yaprak ağırlığı değerlerine karşı grafiği (Şekil 4.7)'de verilmiştir. Bu uygulamalar kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artışlar *Bacillus subtilis* 3/3, *Pseudomonas fluorescens* RC77, *Pseudomonas fluorescens* T26 ve *Bacillus subtilis* RC63 de görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların dal+yaprak ağırlığı üzerindeki etkileri

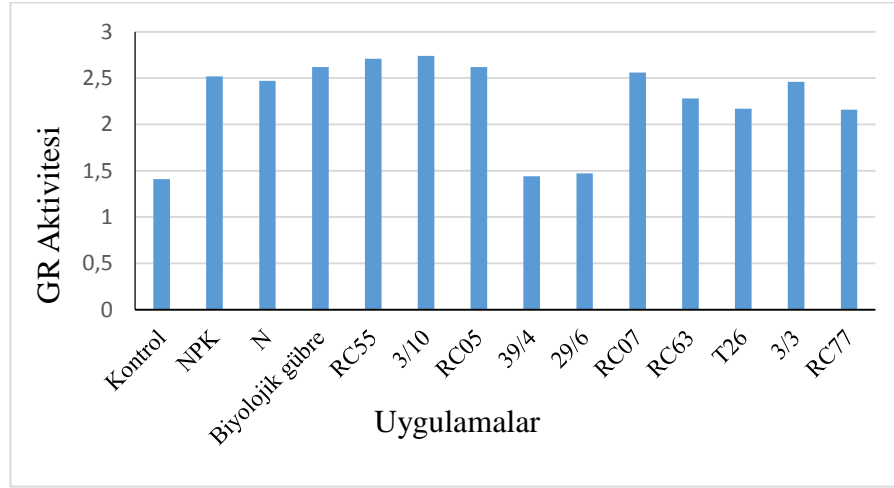
Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların çay numunesindeki klorofil (SPAD) içeriği değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Bu uygulamalar kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artış 'da *Bacillus pumilus* 39/6' da gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların klorofil içeriği üzerindeki etkileri

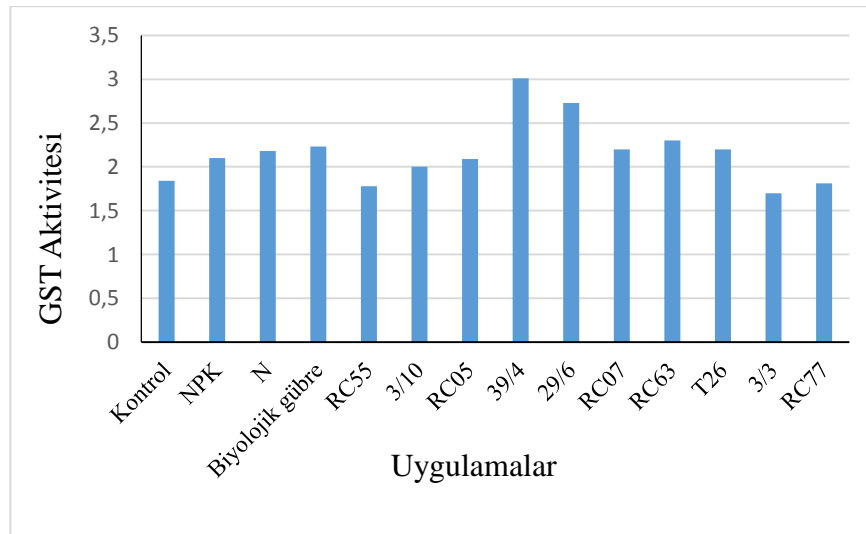
Fener 3 çayına aşılanan bazı uygulamaların çay numunesindeki GR aktivite değerlerine karşı grafiği (Şekil 4.9)'da verilmiştir. Bu uygulamalar kontrole göre kıyaslanmıştır. En

büyük artışlar NPK, biyolojik gübre, *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3, *Pseudomonas fluorescens* RC77 ve *Bacillus pumilus* 39/4 ile inokule edilen örneklerde gözlenmiştir.



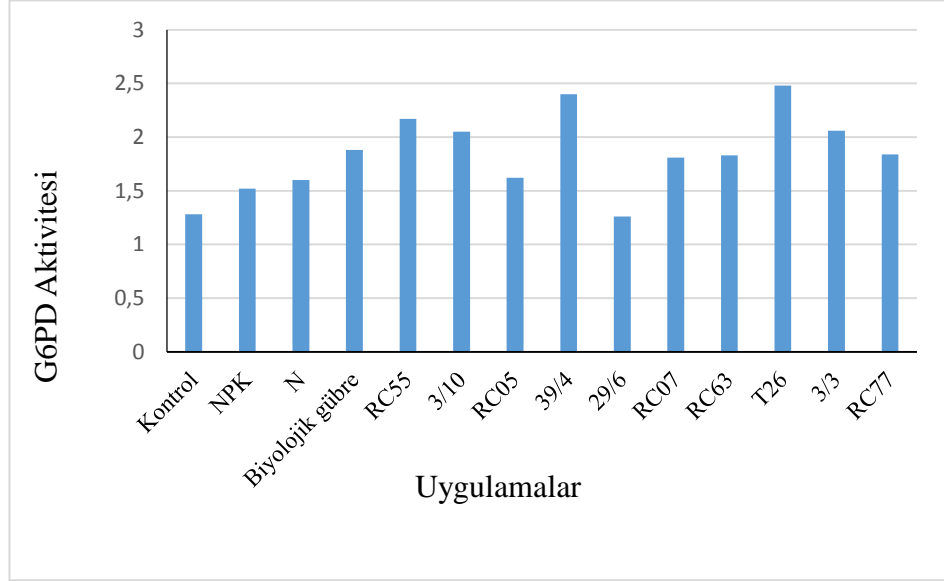
Şekil 4.9. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların GR aktivitesi üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılana uygulamaların çay numunesindeki GST aktivite değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Bu gübreler ve bakteriler kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artış *Bacillus pumilus* 39/4 de olmuştur (Şekil 4.10).



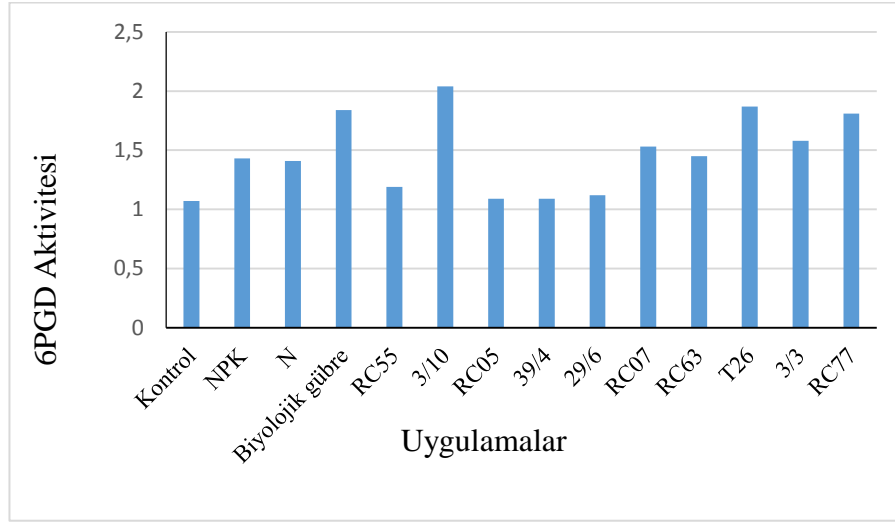
Şekil 4.10. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların GST aktivitesi üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılanan uygulamaların çay numunesindeki G6PD aktivite değerlerine karşı grafiği aşağıdaki gibi verilmiştir. Bu gübreler ve bakteriler kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artış *Pseudomonas fluorescens* T26 ve *Bacillus pumilus* 39/4 da gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların G6PD aktivitesi üzerindeki etkileri

Fener 3 çayına aşılanan uygulamaların çay numunesindeki 6PGD aktivite değerlerine karşı grafiği (Şekil 4.12)'deki gibi verilmiştir. Bu gübreler ve bakteriler kontrole göre kıyaslanmıştır. En büyük artış *Pseudomonas putida* 3/10 da gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Fener 3 çay klonunda bazı uygulamaların 6PGD aktivitesi üzerindeki etkileri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmalarımızda biri kontrol, iki mineral gübreleme (NPK ve N), bir ticari biyolojik gübre ve on farklı bitki gelişimini teşvik edici bakterileri olmak üzere toplam on dört tane uygulama ayrı ayrı fener 3 çay klonuna test edilmiştir. Test edilen bu uygulamalar; sırasıyla kontrol (bakteri ve gübresiz), NPK, N, biyolojik gübre, *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus lentus* 29/6, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 bakterilerinden oluşturuldu.

Mineral gübre, biyolojik gübre ve bakteri aşulamalarının fener 3 çay klonun tüm büyüme parametreleri ve dört enzim aktiviteleri üzerine etkisine bakıldığında, varyans analiz sonuçlarına göre uygulamaların tüm büyüme parametreleri ve dört enzim aktivite değerlerini çok önemli oranda artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1-4.6).

Fener 3 çay klonuna uygulanan gübre ve bakterilerin tümünün bitki boyu üzerine pozitif etki ettiği belirlenmiştir. En büyük artış *Bacillus subtilis* RC63'ün aşılandığı çay fidanlarında ölçülmüştür (Şekil 4.2). Fener 3 çay klonun bitki boyuna kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalardan *Bacillus subtilis* RC63'in %21 pozitif etkisi gözlenmiştir. Bunların dışında pozitif etki eden mikroorganizmalar ise bitki boyuna %8 ile %16 arasında değişen değerlerde gözlenmiştir. *Bacillus lentus* 29/6 ve *Bacillus subtilis* 3/3 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Kontrole göre *Bacillus atrophaeus* RC55 hariç diğer uygulamalar fener 3 çay klonunun gövde çapı değerini artırmıştır. *Bacillus atrophaeus* RC55 bakterisi gövde çapına negatif etki etmiştir (Şekil 4.3). Fener 3 çay klonunun gövde çapına pozitif etki eden uygulamaların yaptığı etkilere bakacak olursak NPK, N, *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus*

subtilis 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 mikroorganizmaları yaklaşık gövde çapına kontrole kıyasla ortalama %21 oranında artırdığı belirlenmiştir. Biyolojik gübrenin ise gövde çapına %28 etkisi gözlenmiştir. Bunların dışında gövde çapına pozitif etki eden uygulamaların etkisi oranları %3 ile %10 arasında gözlenmiştir. *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Tüm uygulamaların ayrı ayrı aşılandığı Fener 3 çay klonun yaprak alanı değerinde kontrole kıyasla artış gözlenmiştir (Şekil 4.4). Fener 3 çay klonunda yaprak alanına, kontrole kıyasla pozitif etki eden mineral, biyolojik gübreler ve bakteriler ise NPK, biyolojik gübre, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 sırasıyla %14, %16, %10 ve %17 olarak gözlenmiştir. Bunların dışında yaprak alanına pozitif etki eden uygulamalar ise %10'un altında etki ettikleri gözlenmiştir. *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus lentus* 29/6, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Bacillus atrophaeus RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05 ve *Bacillus lentus* 29/6 bakterilerinin aşılandığı fener 3 çay klonunda yaş yaprak ağırlık değerinde kontrole kıyasla azalma gözlenmiştir. Diğerlerinin tümünde artma görülmüştür (Şekil 4.5). Fener 3 çay klonunun yaş yaprak ağırlığında kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalar ise N, biyolojik gübre, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 sırasıyla %22, %31, %35, %35, %40 ve %36 etki ettikleri belirlenmiştir. Bunların dışında yaş yaprak ağırlığına pozitif etki eden uygulamalar ise %20'nin altında etkileri gözlenmiştir. *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Bacillus atrophaeus RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05 ve *Bacillus lentus* 29/6 bakterilerinin aşılandığı fener 3 çay klonunun kuru yaprak ağırlık değerlerinde kontrole kıyasla azalma gözlenmiştir. Diğerlerinin tümünde artma görülmüştür (Şekil 4.6). Fener 3 çay klonunun kuru yaprak ağırlığında kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalar N, biyolojik gübre, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 sırasıyla %29, %29, %31, %41, %47, %45 ve %46 oranında etkiledikleri gözlenmiştir. Bunların dışında kuru yaprak ağırlığına pozitif etki eden uygulamalar ise %20'nin altında etki ettiği görülmüştür. *Bacillus pumilus* 39/4 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Pseudomonas putida 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05 ve *Bacillus lentus* 29/6 bakterilerin aşılandıkları fener 3 çay klonun dal+yaprak ağırlık değerlerini kontrole kıyasla azaltmıştır. Diğer uygulamalarla muamele edilen çay bitkilerinin dal+yaprak ağırlıklarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.7). Fener 3 çay klonunun dal+yaprak ağırlığına kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalar ise N, biyolojik gübre, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 sırasıyla %26, %31, %22, %37, %37, %48 ve %40 etki ettikleri gözlenmiştir. Bunların dışında dal+yaprak ağırlığına pozitif etki eden uygulamalar ise %20'nin altında etki yapmıştır. *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

Bacillus atrophaeus RC55 hariç diğer gübre ve bakteri uygulamalarında fener 3 çay klonun klorofil SPAD değerinde kontrol değerine kıyasla pozitif etki yani artış ortaya çıkmıştır. *Bacillus atrophaeus* RC55 aşılandığı fener 3 çay klonundaki SPAD değerinde azalış gözlenmiştir (Şekil 4.8). Fener 3 çay klonunda SPAD değerine kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalardan NPK, biyolojik gübre ve *Bacillus pumilus* 39/6 sırasıyla %23, %23 ve %24 oranlarında gözlenmiştir. Bunların dışında SPAD değerine pozitif etki eden gübre ve bakteriler ise %20'nin altında etki göstermiştir. *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Bacillus lentus* 29/6, *Bacillus megaterium*

RC07 ve *Bacillus subtilis* 3/3 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Fener 3 çay klonundaki glutasyon metabolizmasının kilit enzimi glutasyon redüktaz aktivitesi üzerine tüm uygulamalar kontrole kıyasla pozitif etki yapmıştır (Şekil 4.9). Artış oranları, NPK, N, biyolojik gübre, *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 için sırasıyla %79, %75, %86, %92, %94, %86, %82, %62, %54, %74 ve %53 etkisi gözlenmiştir. Bunların dışında GR aktivitesi değerine pozitif etki eden uygulamalar ise %5'in altında etki ettikleri belirlenmiştir. *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Bacillus atrophaeus RC55, *Bacillus subtilis* 3/3, *Pseudomonas fluorescens* RC77 dışındaki bütün bakteri ve gübrelerin ayrı ayrı aşılandığı fener 3 çay klonundaki glutasyon S-transferaz aktivite değerinde kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. Bu üç bakterinin aşılandığı fener 3 çay klonunda GST aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10). Fener 3 çay klonunda GST aktivitesi, kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalar ise biyolojik gübre, *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus lentus* 29/6 ve *Bacillus subtilis* RC63 sırasıyla %21, %64, %48 ve %25 olarak gözlenmiştir. Bunların dışında GST aktivitesine pozitif etki eden gübreler ve bakteriler ise %20'nin altında belirlenmiştir. (Çizelge 4.7)'de de görüldüğü gibi *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus lentus* 29/6 ve *Bacillus subtilis* RC63 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Bacillus lentus 29/6 bakterisi hariç diğer tüm uygulamaların aşılandığı fener 3 çay klonundaki yaprak glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivite değerinde kontrole kıyasla artış görülmüştür (Şekil 4.11). Fener 3 çay klonu örneklerindeki G6PD aktivitesi değerinde, kontrole kıyasla pozitif etki eden gübre veya mikroorganizmalar ise N, biyolojik gübre, *Bacillus atrophaeus* RC55, *Pseudomonas putida* 3/10, *Paenibacillus*

polymyxa RC05, *Bacillus pumilus* 39/4, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 sırasıyla %25, %47, %70, %60, %27, %88, %41, %43, %94, %61 ve %44 etkileri gözlenmiştir. Bunların dışında G6PD aktivitesi değerine pozitif etki eden uygulamalar ise %20'nin altında saptanmıştır. *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Gübreler ve bakterilerin aşılandığı fener 3 çay klonundaki yaprağın 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivite değerinde ise kontrole kıyasla artış gözlenmiştir (Şekil 4.12). Fener 3 çay klonun 6PGD aktivitesi değerinde, kontrole kıyasla pozitif etki eden uygulamalar NPK, N, biyolojik gübre, *Pseudomonas putida* 3/10, *Bacillus megaterium* RC07, *Bacillus subtilis* RC63, *Pseudomonas fluorescens* T26, *Bacillus subtilis* 3/3 ve *Pseudomonas fluorescens* RC77 sırasıyla %34, %32, %72, %91, %43, %36, %75, %48 ve %69 oranlarında etkileri görülmüştür. Bunların dışında 6PGD aktivitesi değerine pozitif etki eden bakteriler ve gübreler ise %15'in altında etki ettiği gözlenmiştir. *Bacillus atrophaeus* RC55, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus pumilus* 39/4 ve *Bacillus lentus* 29/6 dışındaki uygulamalarda artış oranı istatistiki olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Sonuç olarak

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik gübre ve bakteri aşılanmalarının Fener 3 çay klonunun bitki boyu, gövde çapı, yaprak alanı, yaş yaprak ağırlığı, kuru yaprak ağırlığı, dal+yaprak ağırlığı ve klorofil içeriği (SPAD değeri) gibi büyüme ve gelişme parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara genel olarak bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca özellikle bakteri aşılamalarının glutatyon metabolizmasının iki önemli enzimi glutatyon redüktaz ve glutatyon S-tansferaz enzimlerinin aktivitelerini de artış yönünde değiştirdiği gözlenmiştir. Pentoz fosfat yolunun dönüşümsüz enzimleri glukoz 6- fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktiviteleri de küçük istisnalar dışında artış belirlenmiştir. Artışların hemen hemen tamamı istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Gerek büyüme

faktörleri üzerindeki olumlu etkileri gerekse antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki pozitif etkileri test edilen uygulamaların organik tarımda kullanılabilecek özelliklere sahip olduklarını göstermiştir. Yine sonuç olarak araştırmada test edilen bakterilerden etkin olanların çay fidanlarında gelişmeyi olumlu etkilediği, yaprak antioksidan ve oksidatif pentoz fosfat yolunun enzim aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir. Özellikle enzim aktivitesi üzerine olumlu etki gösteren bakterilerin stres koşulları altında çay bitkisini serbest radikal hasarı, düşük ve yüksek sıcaklıklar, oksijen düzeyi, hava kirliliği, ağır metaller, yüksek ışık intensitesi, magnezyum noksanlığı ve kuraklık gibi çevresel stres koşullarına karşı toleransını artırabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.J., Ellis, G.H., Gover, S., Naylor, C.E., Phillips, C., 1994. Crystallographic study of coenzyme, coenzyme alogue and supstrate binding in 6-phosphoglucanate dehydrogenase implications for NADP spesificity and enzyme mechanizm. *Structre*, 2, 651-668.
- Ali, M.B., Thanh, N.T., Yu, K.W., Hahn, E.J., Peak, K.P., Lee, H.L., 2005. İnduction in the antioxidative systems and lipid peroxidation in suspension culture roots of *Panax ginseng* induced by oxygen in bioreactors. *Plant Sci*, 169, 833-841.
- Anderson, J.V., Davis, D.G., 2004. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiol, Plant*, 120, 421-433.
- Andersson, C., Soderstrom, M., Mannervik, B., 1988. The enzymes of glutathione of metabolism. *Biochem.J.*, 249, 819-823.
- Angelucci, F., Miele, A. E., Boumis, G., Dimastrogiovanni, D., 2008. Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: The structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase. *Proteins*, 72, 936-945.
- Anonim, 2007b. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK Matbaası, Ankara, 2007.
- Anonim, 2007c. MEGEP (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi),Gıda Teknolojisi, Enzim Özellikleri. Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara, 13-20.
- Anonim, 2007a. Etkin Mikroorganizmalar. www.agaclar.net/forum/temel-konular-toprak-gubre-tohum-sulama/3903.htm
- Anonim, 2009. Organik Tarımda Biz 2009: www.organiktarimda.biz.
- Anonim, 2011. Organik Tarım. http://tr.wikipedia.org/wiki/Organik_tar%C4%B1m
- Anonymous, 2007. The Catalytic Site Atlas at The European Bioinformatics Institute.
- Aurelice, B., Oliveira Carlos, F. H., Claudia, A., 2013. The impact of organic farming on quality of tomatoes is associated to increased oxidative stress during fruit development. *PLOS ONE*, 8, 4-5.
- Barrett, M.P., Le Page, R.W.F., 1993. 6-phosphogluconate dehydrogenase gene from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol*, 57, 89-100.
- Basinskiene, L., Juodeikiene, G., Kalvaityte, V., Ceseviciene, J., Leistrumaitė, A., 2011. Enzyme Activity Of Different Cereals Grown Using Organic And Conventional Agricultural Practices. 6th Baltic Conference on Food Science and Technology “Innovations for Food Science and Production” *FOODBALT 2011 Conference Proceedings*, 31-32.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 215, 4955-4956.
- Berg, J.S., Powell, B.C., Cheney, R.E., 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, 12, 780–794.
- Bowhser, C.G., Hucklesby, D.P., Emes, M.J., 1989. Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L. *Planta*, 177, 359-366.

- Can, B., 2010. Glutasyon redüktaz enziminin sıçan böbreğinden saflaştırılması, substrat ve inhibitör kinetiğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Chen, K.M., Gong, H.J., Chen, G.C., Wang, S.M., Zhang, C.L., 2004. Gradual drought under field conditions influences glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. *J Plant Growth Regul*, 23, 20-28.
- Chen, L.H., Kenyon, G.L., Curtin, F., Harayama, S., Bembenek, M.E., Hajipour, G., Whitman, C.P., 1992. 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *J. Biol. Chem*, 267, 17716–17721.
- Cook, P. F., Florian, D., 2002. Principles of Biochemistry I. The University of Oklahoma, 3-4.
- Çakmak, I., Römheld, V., 1997. Boron deficiency- induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193, 71-83.
- Çakmakçı, R. ve Erdoğan, Ü.G., 2012. Organik Tarım". 3. Baskı, Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No 236, 367 s, Erzurum.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Dönmez, M.F., 2007. Bitki gelişimini teşvik edici rizobakteri (PGPR) aşılamalarının bitki gelişimi ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007 Erzurum, 437-441.
- Çakmakçı, R., 2005. Bitki gelişiminde fosfat çözücü bakterilerin önemi. Selçuk Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (35), 93-108.
- Çakmakçı, R., 2009. Stres koşullarında ACC deaminaze üretici bakteriler tarafından bitki gelişiminin teşvik edilmesi. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 40 (1), 109-125.
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F., Aydın, A., Şahin, F., 2006. Growth promotion of plant by plant growth- promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1482-1487.
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F., Ertürk, Y. Erat, M. Haznedar A., ve Sekban, R. 2010. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant and Soil*, 332 (1-2), 299-318.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., Dönmez, M.F., 2007. The influence of plant growth- promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170, 288-295.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Oral, B., Erdoğan, Ü., Şahin, F., 2009. Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3- acetic acid- producing rhizobacteria. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 84, 375-380.
- Çakmakçı, R., Erdoğan, Ü., Kotan, R., Oral, B., Dönmez, M.F., 2008. Çoruh vadisinde yabani ahududu rizosfer topraklarında heterotrof azot fikseri bakteri çeşitliliği. 4. Ulusal Bitki Beslenme ve Gübre Kongresi 8-10 Ekim 2008 Konya, 706-717.
- Danielson, U.H., Jiang, F., Hanson, L.O., Maneervik, B., 1999. Proping the kinetic mechanism and coenzyme spesifity of glutathione reductaze from the cyanobacterium *Anabaena PCC 5170* by redeseing of the pyridine - nucleotide binding site. *Biochemistry*, 82, 586-590.
- De Bolster, M.W.G., 1997. Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 64, 1251-1304.
- Douglas, K. T., 1987. Mechanisms of action of glutathione-dependent enzymes. Meister, A. (Ed.). *Advances in enzymology*, 59, 103-167.

- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martio Rigano, V., Carfagna, S., Rigano, C., 2001. Ammonium induction of a novel isoform of glucose- 6P dehydrogenase in barley roots. *Physiol, Plantarum*, 113, 469-476.
- Ferrat, L., Barelli, M.G., Martini, C.P., Romeo, M., 2003. Mercury and non-protein thiol compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Comp Biochem Physiol*, 134, 147-155.
- Fischer, E., 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges*, 27, 2985-2993.
- Gong, H.B., Jiao, Y.X., Hu, W.W., Pua, E.C., 2005. Expression of glutathione S-transferase and its role plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant Mol. Biol*, 57, 53-66.
- Gurdeep, K., Sudhakara Reddy, M., 2013. Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. Department of Biotechnology, Thapar University, Patiala, Punjab, India, 60, 549–564.
- Güven, A., 2003. Kaz Karaciğerlerinde Karbon Tetraklorür ve Etil Alkol İle Oluşturulan Doku Hasarlarında Redükte Glutasyon (GSH), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve Selenyum Düzeylerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Siest Visvikis, S., Rapid, G., 2002. Spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clin. Chim. Acta*, 326, 131-142.
- Hilton, P.J., 1973. *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*. Interscience Publishers, John Wiley and Sons, U.S.A., 18, 457-513.
- Hopa, E., 2010. İnsan eritrositlerinden glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı kumarin ve pestisitlerin etkilerinin Araştırılması. Doktora tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Balıkesir.
- Hsu, R.Y., Lardy, H.A., 1967. Pigeon liver malic enzyme II isolation crystallization and some properties. *J. Biol. Chem*, 242, 520-526.
- Hubscher, U., Shevelev, I.V., 2002. The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 364–376.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80, 225–236.
- İçen, H., 2008 Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon metodu ile atık çay lifleri ve saplarından kafein eldesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 305–313.
- Kaçar, B., 1991. Çay ve Çay Topraklarının Kimyasal Analizleri 1. Çay Analizleri. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Çay-Kur Yayını, Ankara, 14, 231-273.
- Kirk, R.E., Othmer, D.F., 1983. *Encyclopedia of Chemical Technology*. U.S.A.Wiley, 22, 628-643.
- Korber, F., 1992. Nomenclature of 6-phosphogluconate dehydrogenase: the reaction catalysed determines the systematic name. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 30, 47-49.
- Koshland, D. E., 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 44, 98-104.

- Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., AU, S. W., Lam, V. M., Adams, M. J., 2005. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section Biological Crystallography*, 61, 495-504.
- Levy, H.R., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. In: Meister, A (ed)., *Advances in Enzymology*. New York: John Wiley and Sons Inc, 48, 97-191.
- Medici, L.O., Azevedo, R.A., Smith, R.J., Lea, P.J., 2004. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Functional Plant Biology*, 31, 1-9.
- Mehta, A., Mason, P.J., Vulliamy, T.J., 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13, 21-38.
- Meighen, E.A., 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev.*, 55, 123-142.
- Neuhaus, H.E., Emes, M.J., 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 111-141.
- Neufeld, H., Chappelka, A.H., Somers, G.L., Burkey, K.O., Davison, A.W., Finkelstein, P., 2006. Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cut leaf coneflower. *Photosynthesis Research*, 87, 281-286.
- Oakley, A., Lo Bello, M., Battistoni, A., Ricci, G., Rossjohn, J., Villar, H., Parker, M., 1997. The Structures of Human Glutathione Transferase P1-1 in Complex with Glutathione and Various Inhibitors at High Resolution. *J. Mol. Biol.*, 274, 84-100.
- Oral, B., Dönmez, M.F., Erat, M., Çakmakçı, R., 2007. İndol Asetik asit (IAA) üretici bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin ıspanakta nitrat redüktaz, katala ve peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi. 21. Ulusal Kimya Kongresi (23-27 Ağustos) Malatya.
- Owuar, O. P., Chavanji, A. M., 1986. Caffeine contents of clonal tea: Seasonal variations and effects of plucking standards under Kenyan conditions. *Food Chemistry*, 20, 225-233.
- Pai, F. E., Schulz, G. E., 1983. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-Ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 1752-1757.
- Rios-Gonzalez, K., Erdei, L., Lips, S.H., 2002. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Sci*, 162, 923-930.
- Savidov, N.A., Alikulov, Z.A., Lips, S.H., 1998. Identification of an endogenous NADPH-regenerating system coupled to nitrate reduction in vitro in plant and fungal crude extracts. *Plant Sci*, 133, 33-45.
- Shannon, W.N., Gover, S., Lam, M.S., Adams, M.J., 2000. Human glucose 6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8, 293-303.
- Singh, Y. V., Singh, B.V., Pabbi, S., Singh, P. K., 2007. Impact of organic farming on yield and quality of BASMATI rice and soil properties. 9th. International Scientific Conference on Organic Agriculture (Organic farming in tropic and subtropic), 20-23 March 2007, Hohenheim Üniversitesi, p: 1-4.
- Smith, A.D., (Ed), 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, 25, 11-251.

- Sürmeli, A., 2003. Organik Tarım, Gelişimi ve İlkeleri. Dev.Maden-Sen Yayın Kurulu, 1, 12-50.
- Tanaka, K., Sano, T., Ishizuka, K., Kitta, K., Kawamura, Y., 1994. Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiol. Plantarum*, 91, 353-358.
- Taulavuori, E., Tahkokorpi, M., Taulavuori, K., Laine, K., 2004. Anthocyanins and glutathione S-transferase activities in response to low temperature and frost hending in *Vaccinium myrtillus* (L.). *J. Plant Physiol*, 161, 903-911.
- Tuna, G., 2008. Siçan İnce Bağırsak Glutatyon S Transferaz Enziminin Saflaştırılması ve İzoenzimlerinin Hiperisin Bileşiği İle Bağlanma Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Turpin, D.H., Weger, H.G., Huppe, H.C., 1997. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation. In: Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (eds) *Plant Metabolism*. Longman Limited, London pp, 509-524.
- Vasella, A., Davies, G.J., Bohm, M., 2002. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 6, 619-629.
- Wagner, A.F., Folkers, K.A., 1964. Vitamins and coenzymes. Willey, New York, 2, 138-159.
- Yıldırım, E., Karlıdağ, H., Turan M., 2009. Mitigation of salt stress in strawberry by foliar K, Ca and Mg nutrient supply. *Plant Soil Environ*. 55, 213-221.
- Yüksel, G. 2008, Çankaya Belediyesi Organik Ürünler Pazarı Projesi Ankara.
- Zenkin, N., Yuzenkova, Y., Severinov, K., 2006. Transcript-assisted transcriptional proofreading. *Science*, 313, 518-520.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Rize'nin İkizdere ilçesinde doğdu. 1996 yılında ilkokula Gülderen Beldesi ilköğretim okuluna başladı. 2003 yılında ortaokul öğrenimini için Of Şehit Ahmet Türkan Çok Programlı Lisesinde okumaya başladı. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bilim dalında yüksek Lisansa başladı.