

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİ BAKTERİLERİN KEKİK'TE
(*Thymus vulgaris L.*) SEKONDER METABOLİTLER VE
ANTIOKSİDAN MEKANİZMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEDİRİYE ÇATKIN**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nevzat ESİM**

BİNGÖL-2021

ÖNSÖZ

Heyecan, koşturmaca, yeni şeyler öğrenme isteği ve güzel insanlarla dolu geçirdiğim yüksek lisansımın sonuna gelmiş bulunmaktayım.

Yüksek lisansımın her gününün verimli geçmesinde en büyük katkıyı sağlayan, sadece bilgi birikimiyle değil aynı zamanda insani ve ahlaki değerleriyle örnek aldığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Nevzat Esim'e;

Yüksek lisansım boyunca bilgi birikimlerinden faydalandığım hocalarım Dr. Öğretim Üyesi Musa Tartık'a, Doç. Dr. Ekrem Darendelioğlu'na;

Laboratuvar çalışmalarında büyük katkı sağlayan Doç. Dr. İbrahim Halil Geçibesler'e; Biyokimya laboratuvarı imkanlarından faydalanmamı sağlayan Doç. Dr. Adnan Ayna'ya;

Laboratuvarda beraber çalışmaktan mutlu olduğum arkadaşlarım Zeynep Sezer'e, Esra Mesci'ye, Dilek Korkmaz'a;

Her daim yanımda olan canım annem ve babam başta olmak üzere kalabalık ailemin her bir ferdine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sedriye ÇATKIN

BİNGÖL 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler	2
1.2. Çalışmada Kullanılan Bitkinin Özellikleri	3
1.2.1. Sınıflandırılması.....	3
1.2.2. <i>Thymus vulgaris</i> (büyük kekik, adi kekik).....	4
1.2.3. <i>Thymus vulgaris</i> Türünün Biyolojik Etkileri ve Kullanım Alanları	4
1.3. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (PGPR)	5
1.3.1. Doğrudan Etki Mekanizması	6
1.3.2. Dolaylı Etki Mekanizmaları.....	7
1.4. Sekonder Metabolitler	9
1.4.1. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması.....	10
1.5. Serbest Radikaller.....	11
1.5.1. Serbest Radikallerin Makromoleküller Üzerine Etkileri	13
1.6. Antioksidanlar	14
1.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	16
2. KAYNAK ÖZETİ.....	19

3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali	29
3.2. Bitki Büyütme Koşulları.....	29
3.3. Çalışmada Kullanılan Bitki ve Bakterilerin Temin Edilmesi.....	29
3.4. Bakteri Çoğaltılması	29
3.5. Bitkiye PGPR Uygulaması	29
3.6. Bitki Hasadı	30
3.7. Bitki Ekstraksiyonu	31
3.8. Antioksidan Çalışmalar İçin Standart Grafik Oluşturma	32
3.9. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi.....	32
3.10. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi.....	33
3.11. İndirgeme Gücü Aktivitesinin Tayini.....	34
3.12. Total Fenol İçeriği Tayini.....	35
3.13. Total Flavonoid Tayini	36
3.14. Metal Şelatlama Aktivite Tayini	37
3.15. Uçucu Bileşen Analizi.....	37
3.16. Lipid Peroksidasyon Tayini.....	38
3.17. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi	38
3.18. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi.....	39
3.19. Enzim Ekstraksiyonunun Hazırlanması	40
3.19.1. Katalaz Enzimi Aktivite Ölçümü.....	40
3.19.2. Peroksidaz Enzimi Aktivite Ölçümü	41
3.19.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD) Aktivite Ölçümü.....	41
3.20. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması.....	42
3.20.1. DPPH Giderme Aktivite Tayini İle ilgili Çözeltiler	42
3.20.2. ABTS Giderme Aktivite Tayini İle İlgili Çözeltiler	42
3.20.3. İndirgeme Gücü Aktivite Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler	42
3.20.4. Total Fenol İçeriği Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	42
3.20.5. Total Flavonoid İçeriği Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	43
3.20.6. Metal Şelatlama Aktivite Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler	43
3.20.7. Lipid Peroksidasyonu Miktarının Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler	43
3.20.8. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	43
3.20.9. Enzim Ekstraksiyonu İçin Hazırlanan Kimyasal Çözeltiler	44
3.20.10. Katalaz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	44
3.20.11. Peroksidaz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler	44

3.20.12. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler..	44
3.20.13. H ₂ O ₂ Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler	45
3.20.14. Çalışmada Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Toplam Fenol İçeriği Tayini.....	46
4.2. Toplam Flavonoit İçeriği Tayini	47
4.3. ABTS Katyon Radikali Giderme Açısından Antioksidan Aktivite Tayini	49
4.4. DPPH Serbest Radikali Giderme Açısından Antioksidan Aktivite Tayini	50
4.5. Ferrik İyonlarını (Fe ³⁺) İndirgeme Açısından Antioksidan Kapasite Tayini	52
4.6. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Açısından Antioksidan Aktivite Tayini.....	53
4.7. Lipid Peroksidasyon ve ROS Miktar Tayini	55
4.8. Antioksidan Enzim Aktivite Tayini.....	56
4.9. Bitki Gruplarının Uçucu Bileşen Profili.....	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
DPPH	: 2,2-Difenil 1-pikril hidrazil
TCA	: Trikloroasetik Asit
TBA	: Tiobarbitürik asit
POD	: Peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
FCR	: Folin Ciocalteu Reaktifi
ppm	: Parts per million
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. PGPR Bitkide Etkilediği Özellikler	6
Şekil 1.2. Serbest Radikal Hasarı	14
Şekil 1.3. Aşırı ROS Oluşumu ve Dengenin Bozulması.....	15
Şekil 3.1. Bitki Grupları ve Çoğaltılan Bakteri Grupları	30
Şekil 3.2. Kabin İçinde Yetiştirilen Bitki Grupları	31
Şekil 3.3. Metanol Ekstraksiyonu ve Elde Edilen Ekstrakt	32
Şekil 3.4. DPPH Süpürme Aktivitesi	33
Şekil 3.5. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi	34
Şekil 3.6. İndirgenme Gücü Aktivitesi.....	35
Şekil 3.7. Total Fenol İçeriği.....	36
Şekil 3.8. Total Flavanoid İçeriği.....	36
Şekil 3.9. Metal Şelatlama Aktivitesi.....	37
Şekil 3.10. Hidrojen Peroksit Standart Grafiği	39
Şekil 3.11. Süperoksit Anyonu Standart Grafiği.....	40
Şekil 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Gallik Asit İçin Kalibrasyon Grafiği. 46	
Şekil 4.2. Konsantrasyonlarda Hazırlanan Kersetin İçin Kalibrasyon Grafiği	47
Şekil 4.3. Kekik Numuneleri İçindeki Fenolik Madde Dağılımları	48
Şekil 4.4. Numuneler İçindeki Toplam Flavanoid Dağılımları.....	48
Şekil 4.5. Numunelerin ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi	49
Şekil 4.6. Numunelerin DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivitesi	51
Şekil 4.7. Ferrik İyonlarını İndirgeme Gücü Açısından Antioksidan Aktivite	52
Şekil 4.8. Fe İyonlarını Şelatlama Kapasiteleri Açısından Antioksidan Aktivite.....	54
Şekil 4.9. Uygulama Gruplarındaki MDA Miktarı	55
Şekil 4.10. Uygulama Gruplarındaki H ₂ O ₂ Düzeyi	56
Şekil 4.11. Uygulama Grupları O ₂ Düzeyi.....	56
Şekil 4.12. Uygulama Gruplarındaki SOD Enzim Aktivitesi	57

Şekil 4.13. Uygulama Gruplarındaki CAT Enzim Aktivitesi	58
Şekil 4.14. Uygulama Gruplarındaki POX Enzim Aktivitesi	58

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1 Terpenlerin Sınıflandırılmaları.....	10
Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Türleri	13
Tablo 1.3. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	16
Tablo 3.1. Bitki Büyütme Koşulları.....	29
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Grupları;	29
Tablo 4.1. Kekik Numuneleri İçerisindeki Toplam Fenol ve Flavonoit Miktarları.....	49
Tablo 4.2. Numunelerin ABTS Katyon Radikali Giderme Değerleri.....	50
Tablo 4.3. Kekik Numunelerinin DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivite Değerleri...	51
Tablo 4.4. Örneklerin Ferrik İyonlarını (Fe^{3+}) İndirgeme Gücü Aktivite Değerleri.....	53
Tablo 4.5. Fe^{2+} İyonu Şelatlama Açısından Antioksidan Aktivite Değerleri.....	54
Tablo 4.6. MDA ve ROS Tayini	55
Tablo 4.7. Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	57
Tablo 4.8. Kontrol ve Bakteri Uygulanmış Kekikte Uçucu Bileşenlerin Oranı	59

BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİ BAKTERİLERİN KEKİK'TE (*Thymus vulgaris L.*) SEKONDER METABOLİTLER VE ANTIOKSİDAN MEKANİZMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışmada kekik (*Thymus vulgaris L.*) bitkisinin büyüme ortamına, çiçeklenme aşamasında PGPR (plant growth promoting rhizobacteria - bitki büyümeye düzenleyicisi rizo-bakteri) bakterileri uygulanarak bitkide meydana gelen sekonder metabolitler ve antioksidan mekanizmadaki değişimler araştırılmıştır. Bakteri ile muamele edilen bitki grupları hasat sonrası bir kısmı metanol ile ekstrakte edilmiş bir kısmı da taze olarak kullanılmak üzere -80°C de saklanmıştır. Elde edilen ekstraktlar ile uygulanan bakterilerin sekonder metabolitler üzerindeki etkileri ve antioksidan etkinlikleri standart antioksidan maddeler olan BHA, BHT, Trolox ile karşılaştırılmıştır. Taze kısımlardan ise hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyon düzeyleri, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit anyonu (O₂^{·-}) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan enzimlerin [Süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX) ve katalaz (CAT)] aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca kekik uçucu bileşenlerinin değişimi de incelenmiştir. Elde edilen bulgularda TG-12 bakteri uygulanan bitkilerde total fenolik miktarda %26 oranında artış gözlenmiştir. Bununla birlikte radikal giderme aktivitesi, indirme gücü ve metal şelatlama aktivitelerinde de önemli değişimler meydana gelmiştir. Bakteri uygulamaları ile bitki gruplarının omega 3, 6, 9 ve p-cymene gibi önemli uçucu bileşenlerin miktarda farklılıklar olmuştur. Antioksidan enzimlerden SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla diğer gruplarda önemli bir değişim olmazken POX enzim aktivitesinde kontrole göre %42 ile %156 ve CAT aktivitesinde %16 ile %78 oranlarında enzim aktivitelerinde artış meydana gelmiştir. ROS ve MDA miktarlarında da kontrol grubuna oranla artışlar olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Thymus vulgaris L.*, PGPR, oksidan, antioksidan, sekonder metabolite.

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORY BACTERIA ON SECONDARY METABOLITES AND ANTIOXIDANT MECHANISM IN THYME (*Thymus vulgaris* L.)

ABSTRACT

In this study, PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) bacteria were applied to the growth medium of thyme (*Thymus vulgaris* L.) at the flowering stage and the changes in the secondary metabolites and antioxidant mechanism in the plant were investigated. Plant groups treated with bacteria, some of them were extracted with methanol and others were used as fresh after harvest. Antioxidant activities of the extracted extracts and secondary metabolites were compared with the standard antioxidant substances such as BHA, BHT, Trolox. The lipid peroxidation levels, ROS (Reactive Oxygen Species) and antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT)] activities were investigated from fresh parts. In the findings obtained, an increase (26%) was observed in total phenolic and flavonoid amounts in some plant groups applied bacteria. Significant changes occurred in radical scavenging activity, reducing power and metal chelating activities. There were significant differences in the amount of volatile components such as omega 3, 6, 9 and p-cymene of plant groups with bacterial applications. While no significant difference was observed in the antioxidant enzyme SOD levels in the other groups compared to the control group, there was an increase in POD (42-156%) and CAT (16-78%) enzyme levels compared to the control group. It was observed that there was a change in the amount of ROS and MDA compared to the control group. When all the findings were evaluated together, it was evaluated that the applied bacteria had effects on both the secondary metabolites and the antioxidant mechanism in the thyme plant.

Keywords: *Thymus vulgaris* L., PGPR, oxidant, antioxidant, secondary metabolite.

1. GİRİŞ

Günümüzde yaklaşık 8 milyar olan dünya nüfusunun gelecekteki 50 yıl içinde 10 milyar civarına ulaşacağı öngörülmektedir. Toplumların gelişimi ve sağlığı için önemli bir rol oynayan bitkisel besinler, insanlığın temel ihtiyaçlarından biridir. Artan dünya nüfusu ile beraber çevreye verilen zararın da artması, evrensel gıda üretiminde yetersizliklere yol açmakla beraber bu durumun dünya popülasyonunu beslemek için gelecekte sorunlar yaratabileceği öngörülmektedir (Esim 2011; Etesami and Maheshwari 2018). Artan popülasyon, birim başına düşen üretim talebinin artmasına, tarım arazilerinin bozulmasına, birçok arazinin ve toprak türlerinin yanlış işlenmesine neden olmaktadır (Etesami and Maheshwari 2018).

Besin zincirinin en alt basamağında bulunup birincil üretici olarak adlandırılan bitkiler, ekosistemi oluşturan diğer canlıların yaşamını devam ettirebilmesi için önem arz etmektedir. Bitkiler primer üretici olmalarının yanı sıra ekosistemde sıcaklık dengesinin sağlanması, barınma, giyim, ilaç sektöründe kullanılmaları, yaptıkları fotosentez ve solunum olayları ile dünyanın karbondioksit ve oksijen dengesini de sağlar. Bitkilerin bu özelliklerinden dolayı en eski çağlardan günümüze kadar tarımda verimin artırılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Tarım uygulamalarının başladığı zamandan günümüze kadar bitkiler gelişimlerinin farklı evrelerinde bitkide hastalıklara neden olan farklı fitopatojenlere maruz kalmıştır. Bu fitopatojenlerle başa çıkmak, tarımda sürekliliği sağlamak, yüksek verim ve kalite elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır (İmriz et al. 2014; Mishra and Arora 2018). Bu yöntemlerden sentetik ürünler olan kimyasal kontrol ajanları, pestisitler toprakta birikerek ekosisteme ve insan sağlığına ciddi zararlar verme potansiyeline sahiptir (Mishra and Arora 2018). Çevrede ve canlı üzerinde oluşabilecek bu negatif etkilerden dolayı daha çevreci, çevre dostu, organik tarım

uygulamalarına ihtiyaç duyulmuştur. Bitki rizosferinde yaşayan ve PGPR olarak adlandırılan bitki ile simbiyotik ilişki içerisinde olan yararlı mikroorganizmaların bazı stres şartları altında bitki büyümesini, ürün miktarını ve ürün kalitesini arttırdığı yapılan çalışmalar neticesinde gösterilmiştir (Khanna et al. 2019). Birçok durumda bu mikroorganizmaların, bitkide verimi arttırmak için bitkiye uygulanan sentetik biyokimyasallardan daha etkili sonuçlar verdiği bilinmektedir (del Rosario Cappellari et al. 2013).

Neredeyse bütün ekosistemler bakteri, virüs, mantar, nematod, insektler, memeliler ve farklı herbivorlardan meydana gelirler. Bütün doğal habitatlarda bitkiler farklı potansiyeldeki biyotik (virüs, fungus, bakteri vb.) ve abiyotik (su, sıcaklık, UV, ağır metal, kimyasallar vb.) çevresel streslere maruz kalırlar. Bitkiler doğaları gereği kendilerini çevrelerinde meydana gelen ve normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyen bu stres etmenlerinden koruma mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmalardan bir tanesi sekonder metabolit adı verilen terpenler, fenolik bileşikler, flavanoidler, fenolik bileşikler, ligninler, antosiyeninler steroidler gibi grupları içeren moleküllerin sentezlenmesi ile oluşturulan stres cevap mekanizmasıdır. Bu bileşiklerle patojenik mikroorganizmalara cevap oluşturulmasının yanısıra farklı herbivor ve çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı da bitki savunmasını yaparlar (Büyük vd. 2012; Mazid et al. 2011; Thakur et al. 2019). Sekonder metabolitler bitkide fotosentez ve solunum gibi primer metabolit üretimi yapan temel mekanizmalar için direkt gerekli olmamakla beraber bitkinin dışında oluşan çevresel etmenlere karşı hayatta kalması için özelleşmiş hücrelerde bulunurlar (del Rosario Cappellari et al. 2013). Sekonder metabolitlerin bitki ve insan yaşamı için terapötik, antioksidan ve antimikrobiyal gibi özelliklerinden dolayı, bitkide sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır.

1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

Tıbbi ve aromatik bitkiler, insanlığın var olduğu ilk zamanlardan günümüze kadar birçok alanda insanoğlu tarafından kullanılmaktadır (Erdoğan 2012; Saha ve Basak 2020). Tıbbi ve aromatik bitkiler, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla ilaç sektöründe,

gıda sektöründe aroma verici olarak kullanılma, kozmetik alanında, bazı inançların dini törenlerinde tütsü olarak kullanılmışlardır.

M.Ö. 5000’li yıllara ait kayıtlarda Mezopotamya uygarlığının bitkilerle tedavi amacıyla yaklaşık 250 bitkisel ilaç kullanıldıkları tespit edilmiştir (Acıbuca ve Budak 2018). Gıda ve tarım örgütü verilerine göre dünyada bulunan toplam 422.000 bitki tür sayısının 52.885 tanesi tıbbi ve aromatik bitkiler sınıfına girmektedir. 4941 tıbbi aromatik bitki türü ile Çin ilk sırada yer alırken Türkiye daha alt sıralarda yer almaktadır (Temel vd. 2018). Türkiye’nin sahip olduğu ortalama 10.000 bitki türünün yaklaşık üçte birini tıbbi ve aromatik özelliğe sahip bitkiler oluşturmaktadır. Bu özelliklere sahip bitkilerin 70-100 türü başka ülkelere ihracatı yapılan bitkilerdir (Arslan vd. 2015). Tıbbi özelliğe sahip bitkilere olan ilgi dünya çapında bir eğilim haline gelmiştir. Sentetik ilaçların aksine bitkisel ürünlerin olası yan etkilerinin daha az olması, gıda muhafazasında kullanılan yapay antioksidanların yerine bitkilerden elde edilen esansiyel yağların kullanımı tıbbi bitkilerin dünyada gün geçtikçe artan bir talep görmesine buna bağlı olarak dünya ticaretinde önemli bir yere sahip olmasını sağlamıştır (Kartal ve Erdem 2012). Ülkemizde haşhaş, nane, siyah çay, kimyon, kırmızı biber, anason ve kekik gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin yetiştirilmesi için büyük bir tarım alanı ayrılmıştır. Yemeklerde baharat olarak kullanılmasının yanı sıra ilaç ve kozmetik sektöründe de sıkça kullanılan kekik, Türkiye’nin tıbbi ve aromatik bitkiler grubu içerisinde yer almakta olup dünyaya kekik ihracatı yapan ülkeler arasında Türkiye %70-80’lik bir pay ile ilk sırada yer almaktadır. Türkiye ekonomisi için önemli yere sahip olan kekik bitkisi 2015 yılında 15,525 tona karşılık olarak 55,9 milyon dolarlık bir getiri sağlamıştır (Temel vd. 2018).

1.2. Çalışmada Kullanılan Bitkinin Özellikleri

1.2.1. Sınıflandırılması

Türkiye’nin bitki florasını oluşturan bitkilerin, yaklaşık üçte biri oranında olan tıbbi ve aromatik bitkiler grubuna giren *Lamiaceae* (ballıbabagiller) familyası 200 cinse ait 3000 türü içerisinde barındırmaktadır (Başer 1998; Heywood 1978; Tan 2010). Bu familyanın üyesi olan bitkiler zengin uçucu yağ profillerinden dolayı (genellikle karvakrol ve timol) tıpta ve parfüm sektöründe büyük ilgi görmektedirler.

Bu sınıfta yer alan kekik bitkisinin Türkiye’de *thymus*, *coridothymus*, *origanum*, *satureja* ve *tymbra* olmak üzere 5 cinsi bulunmaktadır. Dünyada 220, ülkemizde ise *Thymus* cinsine ait yaklaşık 39 tür olmakla beraber bu türlerin %52,6’sı endemiktir (Baser vd. 1994; Bozdemir 2019; Davis 1970).

1.2.2. *Thymus vulgaris* (Büyük Kekik, Adi Kekik)

Türkiye’de doğal bir yayılım alanına sahip olmayan *Thymus vulgaris* türü yaklaşık 30 cm kadar uzayabilen, yeşil yapraklı, beyaz veya lila rengi çiçeklere sahiptir. Ancak morfolojik karakterler çevreye göre değişiklik gösterebilir. İyi havalanabilen her tür toprakta yetiştirilebilir. Fazla sulama bitkinin kökünün çürümesine neden olmakla beraber bu bitki direkt güneş ışığından hoşlanır. Kekik türleri soğuk havalara karşı dayanıklı türlerdir. Kekik tohumları yaklaşık 4 haftada çimlenme özelliğine sahiptirler. *Thymus* uçucu yağları, *A-terpinen*, *p-cymene*, *carvacrol* ve *timol* gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili oldukları bilinen bileşikler içerir (Bozdemir 2019; Galambosi et al. 2009). *Thymus vulgaris*, kurak ılıman ve gölge olmayan alanlarda, genellikle ilkbaharda ekilir ve kurak ve iyi drene edilmiş topraklarda iyi yetişir.

1.2.3. *Thymus vulgaris* Türünün Biyolojik Etkileri ve Kullanım Alanları

Kekik bitkisinden elde edilen uçucu yağlar *timol*, *carvacrol* gibi önemli molekülleri içerdiğinden dolayı diyabet, gut, sarılık, romatizma başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Antimikrobiyal, antiseptik ve antifungal özelliklerinden dolayı kullanıldıkları bölgelerde bakteri ve mantar oluşmasını önlerler (İlkimen ve Gülbandılar 2018). Gıda raf ömrünün uzatılmasında antioksidan ve antimikrobiyal olarak boya ve yem sanayiinde, romatizmal rahatsızlıkların tedavisinde, migren, nezle, diş ağrılarında, uykusuzluk problemlerinde, sinir sistemini rahatlatıcı etkilerinden dolayı tıp ve eczacılık alanında da kullanılmaktadır (İlisulu 1992).

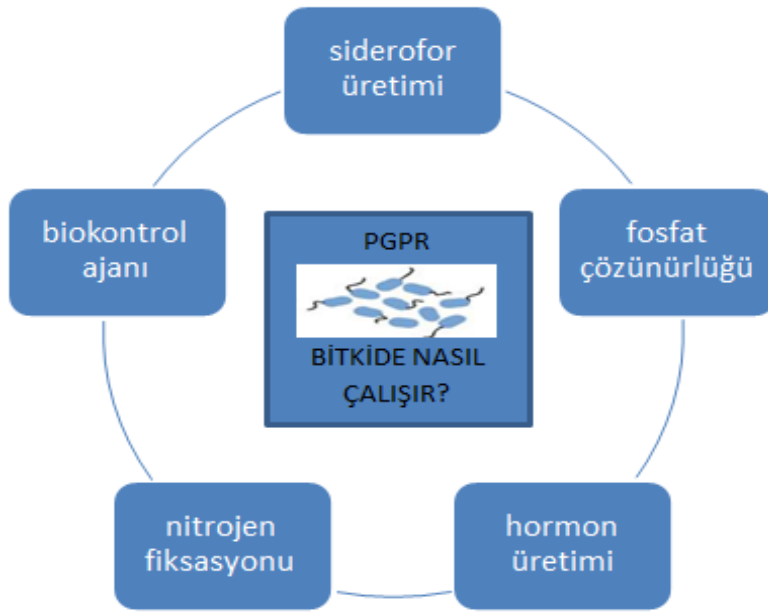
Bitki gelişimini engelleyici özellikte olan yabancı otlara karşı salgıladıkları uçucu yağlarla allelopatik etki göstermektedir (Önen 2003). Tarımda yoğun gübre kullanımıyla toprakta kimyasal maddelerin birikmesi, bitkiye zarar veren böcek ve otlara karşı kullanılan insektisit ve herbisitlerin toprakta birikerek besin zincirinin en üst

basamağındaki canlının dahi bu durumdan zarar görmesi daha çevreci tarım uygulama alanlarının doğmasına yol açmıştır. Kekik bitkisinin sahip olduğu bileşenler sayesinde organik tarımda kullanımı yaygınlaşmıştır. Yapılan çalışmalar bazı arı hastalık ve zararlılarına karşı da kekik bitkisinin etkili olduğunu göstermiştir (Pavela 2004).

1.3. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (PGPR)

Artan dünya nüfusuyla beraber tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tarımda verimi arttırma ve bu şekilde de artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak zorunlu hale gelmiştir. Verimi arttırmak amacıyla gelişigüzel kullanılan çeşitli ilaç ve gübreler toprakta birikerek sadece toprağın kirlenmesiyle sınırlı kalmayıp insan sağlığını tehdit eden bazı unsurların da ortaya çıkmasına neden olmuştur (Bockman 1997; Saber 2001). Bu olumsuz sonuçları ortadan kaldırmak amacıyla daha çevreci, alternatif tarım uygulama arayışlarında büyük bir ivme yaşanmıştır. Bu amaçla “Organik Tarım” sloganı altında tarımda gübre ve kimyasal kullanımının minimuma indirilmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalarda PGPR’lerin tarımda biyogübre olarak kullanılmasının yanında biyokontrol ajanı olarak da kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu gözlenmiştir. PGPR sınıfı giren bakteriler daha çok *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine aittir (Burdman et al. 2000).

Toprak, içerisinde birçok mikroorganizma kolonileri barındırır. Bu mikroorganizmaların bir kısmı bitki kökleri ile etkileşim halindedir. Bu etkileşim bitkiye yarar sağlayabildiği gibi kimi zaman da zararlı olabilir. Bitki kökleri ile simbiyotik ilişki içerisinde olup bitkinin büyümesi, gelişmesi, savunması üzerinde etkili olan bakterilere PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) denmektedir. PGPR’lerin bitkide bazı patojenlerin neden olduğu hastalıkları baskıladığı, viral hastalıklara karşı bitkiyi koruduğu bilinmektedir (Sıddıqui 2006). PGPR’ler bitkide doğrudan ve dolaylı olarak birçok mekanizma üzerinde etkili olabilmektedirler.



Şekil 1.1. PGPR Bitkide Etkilediği Özellikler

1.3.1. Doğrudan Etki Mekanizması

1.3.1.1. Azot Fiksasyonu

Gaz formunda atmosferin %78'ini oluşturan, canlılığın temel yapıtaşları olan protein ve nükleik asitlerin yapısında bulunan N_2 (azot), bitkinin en önemli besin maddelerinden biridir. Bitkiler atmosferik nitrojeni gaz formunda bünyesine katamazlar. Toprakta bulunan nitrit bakterileri, PGPR, tarafından azot, nitrat formuna dönüştürülerek toprağın yapısına dolayısıyla bitkinin kullanabileceği forma dönüştürülür (Jensen and Hauggaard-Nielsen 2003). *Pseudomonas, serratia, Artrobacter, Azoarcus, Klebsiella, Azospirillum, Enterobacter Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Rhizobia* grubundaki bakteriler azotu fikse eden bakterilere örnek teşkil etmektedir (Burdman et al. 2000).

1.3.1.2. Fosfat Çözme Özelliği

DNA'nın yapısında bulunmasından dolayı canlılar için P (fosfor) büyük öneme sahiptir. Bitkiler fosforu topraktan reaktif halde bulunan $H_2PO_4^-$ (dihidrojen fosfat) ve HPO_4^{2-}

(hidrojen fosfat) formunda alabilmektedir. Reaktif halde bulunan bu moleküllerin bitkinin alabileceği forma dönüşmesi için PGP bakterileri formik asit, glukonik asit ve laktik asit gibi organik asitler sentezlerler ve toprağın pH'sının etkilenmesinden sonra fosfor bitkinin bünyesine katılabilecek forma dönüşür. *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Rhizobium* fosfat çözme özelliğine sahip PGPR grubuna girerler (Ram et al. 2013).

1.3.1.3. Bitkisel Hormon Üretimi ve Enzimatik Aktivite

Bitkide hücre bölünmesi, kök gelişimi ve yüzey alanının gelişmesi, yaprak gelişimi, yaşlanmasının gecikmesi gibi olaylarda IAA (oksin) ve sitokinin hormonları etkilidir. Etilen hormonu ise bitkide tohumun çimlenmesi, bitkide çiçeklenme ve meyve olgunlaşması için önemli bir bitkisel hormon olmakla beraber stres durumlarında bitkide fazla salgılanabilen bir hormondur. Bu durumun sonucu olarak artan etilen miktarı kök bölgesinin gelişmemesine neden olmaktadır. PGP bakterileri giberellin, sitokinin ve oksin gibi bitki için faydalı olan hormonların üretimini arttırırken etilen hormon seviyesini, etilen üretiminde öncül molekül olan ACC üretimini ACC deaminaz ile azaltarak enzimatik aktivite ile bitki gelişimine katkıda bulunurlar (Glick 1995; Yang et al. 2009).

1.3.2. Dolaylı Etki Mekanizmaları

1.3.2.1. Siderofor Üretimi

Gen regülasyonu, N₂ fiksasyonu, ATP sentezi gibi önemli biyolojik olaylarda rol alan Fe (demir) canlı sistemler için önemli bir elementtir (Ratledge and Dover 2000; Skaar 2010). Bitkiler için de aynı öneme sahip olan Fe elementi toprakta Fe⁺³ formunda bulunmaktadır. Bu formda bulunan demirin çözünürlüğü çok düşüktür ve bitki tarafından kullanılamaz. Toprakta bulunan mikroorganizmalar demiri +3 formundan +2 formuna dönüştürerek bitki için kullanıma hazır hale getirirler. Toprakta bulunan bu mikroorganizmalar siderofor olarak bilinen ve demiri bağlayıcı özellikte olan molekülleri sentezleyerek demirin kullanılabilir hale gelmesini sağlarlar (Kraemer 2004). Bunun yanında sideroforlar topraktaki demiri bağlayarak patojen mikroorganizmaların demiri kullanmasının önüne geçerler bu şekilde hastalık yapıcı özelliği olan patojenler ihtiyaçları olan demiri alamazlar ve bitkide hastalık oluşması önlenmiş olur (Miethke and Marahiel

2007). Bitki rizosferinde bulunan ve bitki büyümesini teşvik eden özellikle *Pseudomonas* genusundaki rizobakterilerin, bitkide fungus ve bakteri kaynaklı hastalıklara karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Mark et al. 2006; Montesinos et al. 2002; Nagarajkumar et al. 2004).

1.3.2.2. Antibiyotik Üretimi

Antibiyotikler heterojenik organik grup içeren, kendisi dışında metabolik aktiviteler ve büyüme için zararlı işlevleri olan mikroorganizmalara karşı sentezlenen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Duffy et al. 2003). Bitki büyümesini destekleyen bakterilerin (PGPR) bir veya daha fazla antibiyotik üretmesi toprakta bulunan fitopatojenlere karşı antagonistik etki mekanizması ile ilişkilendirilmiştir (Glick et al. 2007). Antibiyosisin temeli, mikroorganizmaların salgıladığı moleküllerin bitkiye zarar veren hedef patojenlerin büyümesini azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmaktır (Lugtenberg and Kamilova 2009). Bitkilerde kök hastalıklarının biokontrolünde phenazines, phloroglucinols, pyoluteorin, pyrrolnitrin, cyclic lipopeptides ve hydrogen cyanide gibi antibiyotiklerin etkili olduğu gösterilmiştir (Haas and Défago 2005).

1.3.2.3. Bakteriyosinler

Bitkilerde mikrobiyal savunmada Bakteriyosinler önemli moleküllerdir. Bakteriyosinler, geleneksel antibiyotiklere benzer özellikler taşısa da önemli bir yolda antibiyotiklerden ayrılırlar; antibiyotiklere kıyasla daha dar bir etki spektrumuna sahiptirler ve kendileriyle yakından ilişkili suşlar için toksik etki gösterirler (Riley and Wertz 2002).

1.3.2.4. Biyokontrol Ajanı Olarak PGPR

Bitkiler çevrelerinde meydana gelen ısı, ışık, patojen saldırısı gibi biyotik ve abiyotik uyarılara farklı tepkiler oluştururlar. Bu durum bitkinin sadece toprak üstü kısımda meydana gelen değişikliklerle sınırlı değildir. Aynı zamanda bitkiler, toprak altı kısımda mikro boyuttaki canlıların sentezlediği kimyasal moleküllere de cevap oluştururlar. Bitkinin kök kısmında meydana gelen patojen saldırılarına bitkinin savunma sistemi biyokimyasal yollarla tepki verir. Oluşturulan savunma sistemi mekanizmalarından

bitkilerde indüklenmiş sistemik direnç (ISR= Induced Systemic Resistance), patojenik olmayan rizobakterilerin hastalıkları bastırmasıdır. Bu bakterilerin etkisiyle bitkide jasmonik asit veya etilen üretilir. Diğer bir savuma mekanizması ise kazanılmış sistemik direnç (SAR= Systemic Acquired Resistance) olarak adlandırılır. SAR mekanizması bitkinin patojen saldırısından sonra PR olarak adlandırılan patojenez ile ilgili proteinlerin ifade olmasını sağlayan salisilik asittir. PR genleri eksprese olarak bitki hücre duvarının daha dayanıklı hale gelmesini ya da direkt olarak patojen etki gösteren hücreleri yok eden enzimlerden oluşur (De Vleeschauwer and Höfte 2009; Van Loon 2007; Van Loon et al. 1998).

1.4. Sekonder Metabolitler

Bitkilerin temel yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan, nükleik asitler, karbohidratlar, proteinler, yağlar primer metabolit olarak adlandırılmaktadır. Bitkinin beslenmesi, büyümesi, fotosentez yapabilmesi için primer metabolitler zorunlu makromoleküllerdir. Bunun yanında sekonder metabolitler, bitkinin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi, salgıladıkları kimyasal maddeler ile insektlere ve yabancı otlara karşı koruma, allelopati özelliği ile rekabet özelliklerini bitkiye kazandırarak bitkinin çevresinde meydana gelen çevresel streslere karşı bitkiyi korurlar (Mulabagal and Tsay 2004; Vanisree et al. 2004). Son yıllarda çalışıldığı tahmin edilen 150,000 den fazla bitki türünün farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan terapötik ajanları içerdiği ve farmasötik açıdan önemli bileşenler olan sekonder metabolitler olduğu gözlenmiştir. Bu tıbbi bitkilerin antimikrobiyal etkileri ile insanda bazı patojen bakterilere karşı koruma görevini üstlendikleri antiinflamatuvar, antikanser, antimitojenik, antiviral, antioksidan ve antidiyabetik etkileri yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir (Ghorbanpour et al. 2016; Shazhni et al. 2018). Sekonder metabolitler, bitkilerin çevrelerinde meydana gelen olumsuz çevre şartlarına karşı hayatta kalması için büyük bir önem arz etmekle beraber savunma rollerinin dışında bitkide tat, renk ve koku oluşumunda da önemli yere sahiptirler (Verpoorte et al. 2002). Herbivorlara, mikroplara, virüslere ve allelopatik bitkilere karşı savunma görevi görürken hayvanlarda polinatör işleviyle de sinyal molekülleri olarak görev alırlar. Ayrıca bitkileri oksidanlara, UV ışınlarına karşı da korudukları bilinmektedir. Bu moleküllerin miktarı bitkide çok azdır. %100'lük kuru ağırlıkta miktarının yaklaşık olarak %1 olduğu bilinmektedir (Thakur et al. 2019).

1.4.1. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması

Sekonder metabolitlerin basit sınıflandırılması şu şekildedir;

- Terpenler
- Fenolik bileşikler
- Azot içeren bileşikler

1.4.1.1. Terpenler

Sekonder metabolitlerin en geniş sınıfını oluşturan terpenler içerdikleri C (karbon) atomu sayısına göre sınıflandırılırlar.

Tablo 1.1. Terpenlerin Sınıflandırılmaları

Karbon Sayısı	Sınıfı
40	Tetraterpenler(karotenoidler)
20	Diterpenler
15	Seskiterpenler
10	Monoterpenler
5	Hemiterpenler

Bitkilerde tat ve koku oluşumunu sağlayan monoterpenler keskin kokulu sekonder metabolitlerdir. Parfümeri sanayinde sıkça kullanılan uçucu yağlar monoterpenler sınıfına giren sekonder ürünlerdir. Bitkilerde daha fazla bulunan bu grubun bazı böceklerin koruma salgılarında da olduğu tespit edilmiştir (Robbers et al. 1996). Yüksek karbon sayısına sahip terpenler hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunur. A vitaminin temel kaynağı olan B-karoten tetraterpen sınıfına dahil iken, steroid ve hormonların yapısında triterpen grubuna dahil moleküller yer almaktadır (Gören 2002).

1.4.1.2. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, yapısındaki aromatik halkada fonksiyonel bir OH- (hidroksil) grubu içeren, bitkilerin savunma mekanizmasında, bitkilerde renk, tat ve koku oluşumundan sorumlu olan fitomoleküllerdir (Bakır 2020; Bohn 2014). Antiviral, antimikrobiyal,

özelliklerinden dolayı sağlık alanıyla yakından ilişkili olan sekonder bileşenlerdir. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin sağlanmasından da sorumludurlar (Albishi et al. 2013; S. Kaur and Mondal 2014; XL. Zhang et al. 2014). Fenolik bileşikler içeren gıdalar alındığında vücutta ya fazla oksijen konsantrasyonunu azaltarak ya da doğrudan ROS'ları (reaktif oksijen türü) tutarak oksidatif stresin önüne geçilir (H. Zhang and Tsao 2016). Flavonoidlerin bitkilerde pigmentasyonu sağlayan moleküller olmalarının yanısıra bitkileri UV-B ışınlarına karşı korudukları bilinmektedir (Lake et al. 2009).

1.4.1.3. Azot İçeren Bileşikler

Azotlu sekonder metabolitler alkaloidleri, protein olmayan amino asitleri ve siyanojenik glikozitleri içermektedir. Alkaloidler bitki savunma mekanizmasında yer almasına rağmen belirli bir miktara kadar toksik etki gösterebilirler. Kendi normal yapısında zehirli bir etkisi olmayan siyanojenik glikozitler bitki herhangi bir hasar gördüğünde H₂S (hidrojen sülfür) ve HCN (hidrojen siyanür) gibi toksik olan maddelere parçalanabilir. Siyanojenik glikozitler *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Graminae* familya üyelerinde görülmektedir (Pagare et al. 2015). Protein olmayan aminoasit özellikteki moleküller bitkide serbest formlarda bulunup bitkiyi dış etkenlere karşı savunabilmektedir. Bu moleküller protein sentezini bloke ederek ya da sentezlenecek proteine dahil olarak görev yapmaktadır. Bitkinin yapısında bulunan bu moleküller normal zamanlarda bitki için toksik etki yapmazken bitkiyi patojenik mikroplara, otçul hayvanlara karşı koruyabilmektedir.

1.5. Serbest Radikaller

Son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, reaktif ve kararsız olan atom ya da moleküller serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (Bast et al. 1991; Halliwell and Gutteridge 1985; WW 1996). Son yörüngelerinde eşlenmemiş elektronu bulunmayan ve kararlı bir yapıya sahip olup diğer moleküllerle daha az etkileşime giren moleküller ise radikal olmayan (nonradikal) moleküller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller oksijen kaynaklı (ROS) ve nitrojen kaynaklı oluşabilmektedir (Valko et al. 2007). Canlılığın devamı için elzem olan oksijen molekülü enerji üretimi sırasında bazı serbest radikallerin oluşmasına neden olabilir.

Oluşan bu serbest radikaller düşük konsantrasyonlarda hücredeki metabolik olaylar için gereklidir. Metabolik olaylarda ortaya çıkan serbest radikaller belirli düzeyin üstüne çıkarsa ve nötralize edilmezlerse hücrede membran proteinlerinin ve lipidlerinin yapısını bozarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca genetik materyal olan DNA'nın yapısını bozarak mutasyon oluşması ile sonuçlanan serbest radikal saldırısı, oksidatif hasar olarak adlandırılan duruma neden olabilmektedir (Serteser ve Gök 2003). Serbest radikal oluşumu bitkilerde fotosentez reaksiyonlarında, sitrik asit döngüsünde, plastit ve peroksizomlarda endojen kaynaklı olarak meydana gelebilir. Bitkinin çevresinde meydana gelip işlevlerinde aksaklıklar meydana getirebilen kuraklık, sıcaklık, UV, tuzluluk gibi çeşitli çevresel abiyotik stres kaynaklarına bağlı olarak eksojen olarak da meydana gelebilmektedir (Gechev et al. 2003; Lamb and Dixon 1997; Van Breusegem and Dat 2006; Van Camp et al. 1998).

Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit Radikali	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil Radikali	OH^{\cdot}	Singlet Oksijen	O_2^1
Lipid Peroksil	LOO^{\cdot}	Ozon	O_3

1.5.1. Serbest Radikallerin Makromoleküller Üzerine Etkileri

1.5.1.1. Lipid Peroksidasyonu

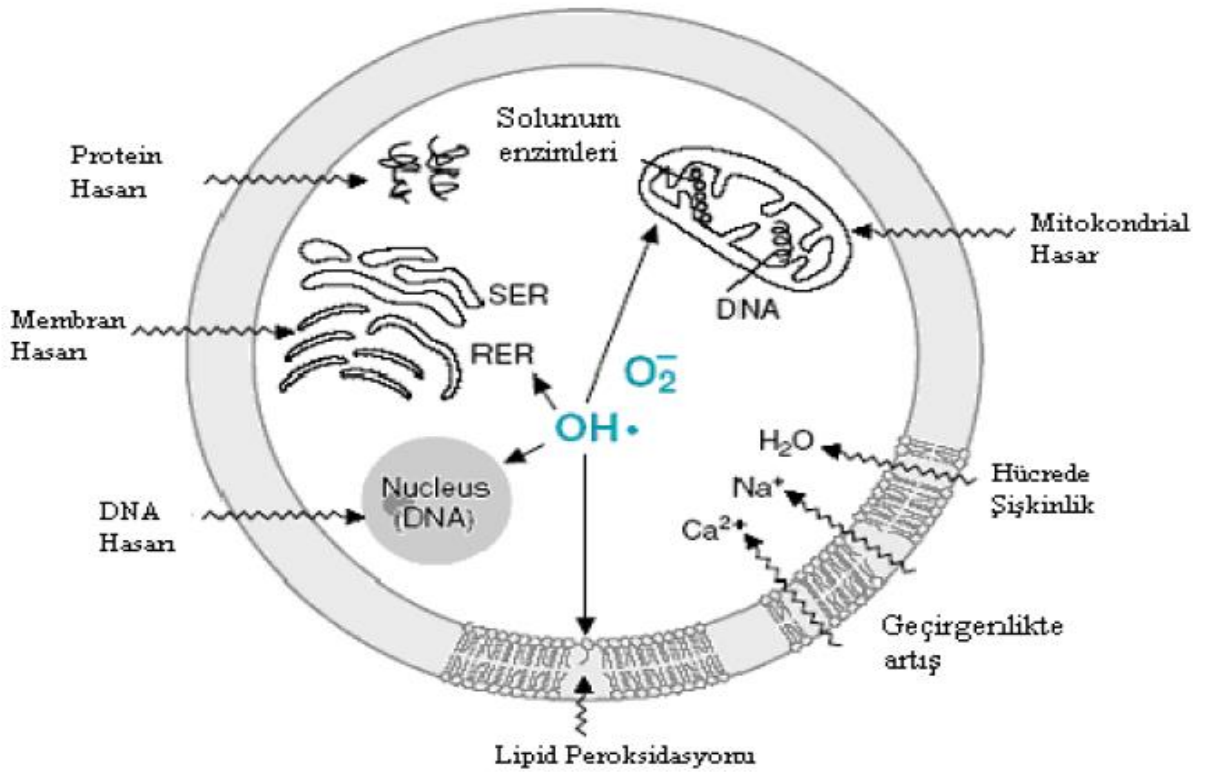
Hücre zarının yapısını oluşturan fosfolipitler serbest radikallere karşı çok hassas olan biyomoleküllerdir. Serbest radikallerin, membran yapısında bulunan lipitlere saldırması sonucu doymamış yağ asitinden bir H atomunun uzaklaştırılması ile yapısı bozulan lipitler peroksi radikallerinin (LOO^{\cdot}) oluşmasına neden olur. Bu moleküller daha fazla hidrojen atomlarının ayrılmasıyla diğer lipit molekülleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon olayının zincirleme olarak devam etmesine neden olur. Oluşan lipit hidroperoksilleri ($LOOH$) zar yapısında polimerizasyona neden olarak membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur (Devasagayam et al. 2003; Devasagayam et al. 2004; Sarma et al. 2010).

1.5.1.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller, proteinleri yapılarında bulunan aminoasit içeriklerine göre etkiler. Serbest radikaller, yapısında sülfür ve doymamış yağ bulunduran triptofan, metiyonin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinlerle daha yüksek reaktivite gösterirler. Serbest radikallerin neden olduğu protein peroksidasyonu, birçok enzim ve yapısal protein hasarına neden olur. Oksidasyona uğrayan proteinlerin birikmesi sonucu çeşitli hastalıklar meydana gelir (Devasagayam et al. 2004; Sarma et al. 2010).

1.5.1.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin etkilediği diğer biyomolekül grubu DNA'dır. OH^\cdot radikalinin DNA'nın yapısını oluşturan şeker moleküllerine ilgisi yüksektir. OH^\cdot grubu şeker molekülleri ile tepkimeye girerek H atomu eklenmesi / çıkarılması ile nükleik asidin yapısını bozabilmektedir. Serbest radikaller ayrıca apoptoziste önemli olan poli sentetaz enziminin (ADP-riboz) aktive olmasına buna bağlı olarak DNA'nın parçalanmasına da yol açabilmektedir (Fang et al. 2002; Kuraoka et al. 2001).



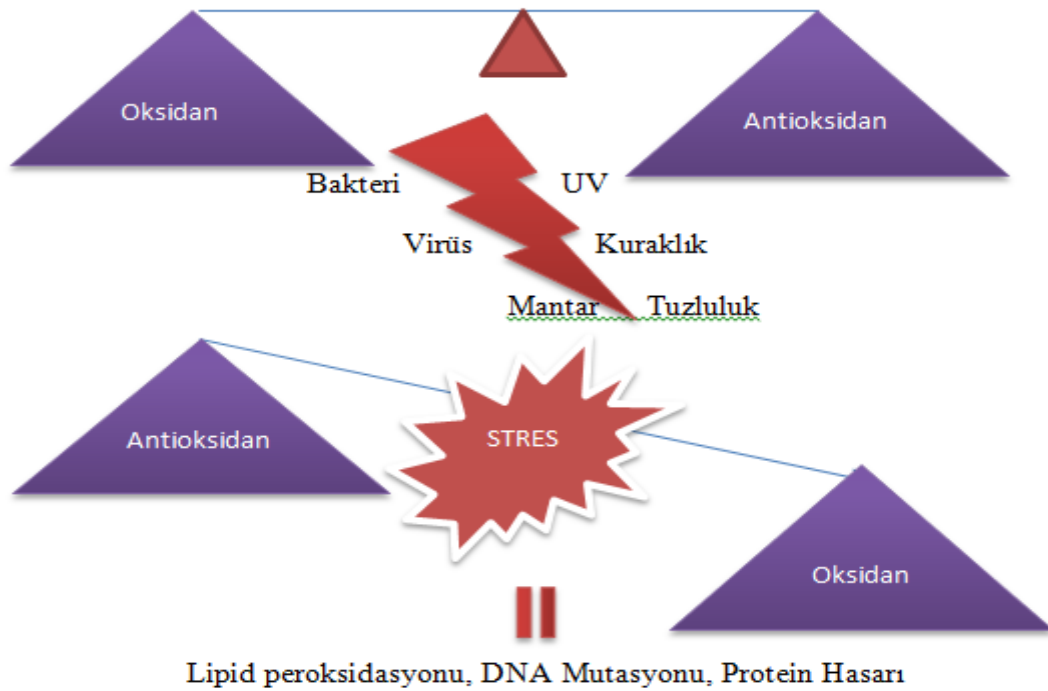
Şekil 1.2. Serbest Radikal Hasarı (Onat vd., 2002'den uyarlanmıştır.)

1.6. Antioksidanlar

Canlıyı serbest radikallerin meydana getirdiği oksidasyona karşı koruyan, ortamda mevcut olan serbest radikalleri nötralize ederek hücre hasarını engelleyen, yapısında fenolik bileşikler barındıran savunma moleküllerine antioksidan denmektedir (Kähkönen et al. 1999). Canlı için savunma aracı olan bu moleküller serbest radikallere elektron vererek bu molekülleri etkisizleştirirler.

Elektron transferi yapan antioksidan moleküllerin özelliği, elektronunu verdikten sonra serbest radikal formuna dönüşmemeleridir (Prior and Cao 2000). Doğal kaynaklardan elde edilmelerinin kolay olması, çözünürlükleri ve aktiviteleri antioksidanları canlı yaşamı için vazgeçilmez moleküller haline getirir (Kaur and Kapoor 2002). Antioksidan bileşikler canlının yapısında oluşabildiği gibi dışarıdan da alınabilmektedirler. Besinlerin yapısında bulunan antioksidanlar oksidasyonu önleyerek besin kaybını önlemekle beraber gıda raf ömrünü de uzatabilmektedirler (Kıralan vd. 2004; Nishino 1999).

Canlı yapısında oksidan ve antioksidan düzeyleri dengeli bir durumda bulunmaktadır. Bu denge oksidan maddelerin lehine (biyotik ve abiyotik stres etmenleri) değişirse canlı yapısındaki serbest radikal miktarı da artar. Artan serbest radikal miktarı canlılar için hücre hasarı ile sonuçlanabilen, kardiyovasküler hastalıklar, infertilite, kanser, diyabet, yaşlanma, solunum ve boşaltım ile ilgili birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Serbest radikal orijinli hastalıkların önüne geçmek için antioksidan moleküllerin kullanımı canlılar için önemli bir savunma mekanizması oluşturabilmektedir (Karabulut ve Gülay 2016).



Şekil 1.3. Aşırı ROS Oluşumu ve Dengenin Bozulması

1.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Fizyolojik koşullar altında hücreler serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak ya da var olan serbest radikalleri yok etmek için antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Bu antioksidan savunma sistemi canlının kendi yapısında enzimatik olan ve olmayan şeklinde bulunabilmektedir. Doğal antioksidanlar sınıfına dahil olan enzimatik antioksidanlar canlının kendi yapısında sentezlenirken enzimatik olmayan doğal antioksidanlar ise canlının kendi yapısında da bulunabilip takviye gıdalarla da alınabilmektedir. Canlının kendi yapısında bulunan antioksidanlar dışında dışardan alınabilen sentetik bazı antioksidanlar da kullanılmaktadır.

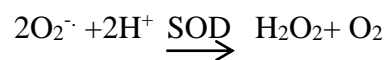
Tablo 1.3. Antioksidanların Sınıflandırılması

<u>Antioksidanlar</u>		
<u>Doğal Antioksidanlar</u>		<u>Sentetik Antioksidanlar</u>
<u>Enzimatik</u>	<u>Enzimatik Olmayan</u>	
SOD	E-vitamini	BHA
Katalaz	Askorbik Asit	BHT
Peroksidaz	β -Karoten	Trolox
		Gallik Asit Türevleri

1.6.1.1. Enzimatik Doğal Antioksidanlar

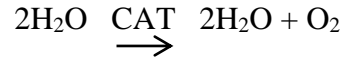
Bitkilerde UV, ısı, ışık, kuraklık, tuzluluk gibi stres etmenleri hücre içinde serbest radikal olarak bilinen moleküllerin oluşmasına neden olur. Hücre içi sentezlenen bazı antioksidan enzimler oluşan radikalleri nötralize ederek hücreyi oluşabilecek hasarlardan korurlar. Bu antioksidan enzimler aşağıda gösterildiği şekilde aktivite gösterirler:

Süperoksit Dismutaz (SOD): oksidatif strese karşı verilen ilk tepkimeyi katalizleyen SOD enzimi süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene çevirir.

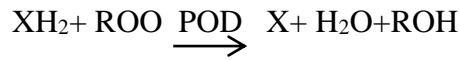


SOD enziminin hücrede nikel içeren Ni-SOD, manganez içeren Mn-SOD, bakır ve çinko içeren CuZn-SOD, demir içeren Fe-SOD, bakır içeren Cu-SOD olmak üzere beş izoenzimi vardır (Kireççi 2018).

Katalaz (CAT): süperoksit dismutaz enzim aktivitesi sonucunda oluşan hidrojen peroksit, normal şartlarda nonradikal bir moleküldür. Ancak hidrojen peroksit, reaktivitesi çok yüksek olan hidroksil radikalının öncü molekülü olduğu için katalaz enzimi tarafında su ve oksijen molekülüne parçalanır. Katalaz enzimi 4 hem grubu içeren tetramerik yapıya endojen bir antioksidan enzimdir.



Peroksidaz (POD) : hidrojen peroksit varlığında organik bazı substratların oksidasyon-redüksiyonunu katalizleyen antioksidan bir enzimdir (Diplock 1998). Bitkilerde meyve olgunlaşması, ROS giderimi, lignin sentezi gibi metabolik olaylarda önemli rol alan peroksidaz enzimi, yapısında hem grubu bulunduran oksidoredüktaz sınıfına dahildir (Passardi et al. 2005; Regalado et al. 2004).



1.6.1.2. Enzimatik Olmayan Doğal Antioksidanlar

Alfa tokoferol (E vitamini): $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ formlarında bulunan, eksojen olarak alınan E-vitaminin, biyolojik olarak en aktif formu α -tokoferoldür (Shahidi, 2000). Sahip olduğu lipofilik özelliği ile hücre membranının içine nüfuz ederek membran fosfolipitlerinde serbest radikallerin meydana getirebileceği lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar. Tahıllarda yüksek oranda bulunan E vitamini, göğüs kanserinde, kalp damar hastalıklarında ve nörolojik dejenerasyonlara karşı korumada önemlidir (Pham-Huy et al. 2008).

Askorbik asit (C vitamini): Suda çözünebilen, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan C vitamini reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerini okside ederek canlıyı oksidatif hasarın meydana getirebileceği olumsuz durumlara karşı korur (Kasnak and Palamutoğlu 2015).

β-karoten (A vitamini): A vitamininin öncül molekülü olan β-karoten bitkilerde sarı, turuncu ve kırmızı rengin oluşmasını sağlayan pigmentlere sahip olan moleküldür. Yağda çözünebilen, antioksidan özellikteki bu moleküller yüksek düzeyde süperoksit radikal giderme aktivitesine sahiptir (Pham-Huy et al. 2008).

1.6.1.3. Sentetik Antioksidanlar

Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA): 2-ter-bütül-4 hidroksi anisol ve 3-ter-bütül hidroksi anisolun karışımı olarak bilinen BHA bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağlarda çözünebilen sentetik antioksidandır. Suda çözünmeyen BHA gıda raf ömrünü uzatmada, aynı zamanda yağların renginin ve tadının muhafaza edilmesinde de kullanılmaktadır (İbadova 2006).

Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT): Kimyasal formülü $C_5H_{12}O$ olan 2,6-ditert-bütül-p-cresol (DBPC) olarak da adlandırılan BHT gıda sektöründe besinlerin tat ve kokularında değişiklik meydana getiren otooksidasyon reaksiyonunun hızını yavaşlatan sentetik bir antioksidandır. BHA antioksidanı ile benzer özellikler gösteren BHT yağda çözünebilen fakat suda çözünemeyen bir bileşiktir (Kar 2008).

Trolox: vitamin E nin analogu olup, BHA ve BHT gibi sentetik bir antioksidandır. Suda çözünebilmesiyle BHT ve BHA'dan ayrılmaktadır. Antioksidan özelliğinin çalışıldığı birçok çalışmada referans olarak kullanılmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETİ

Khanna ve arkadaşları (2019) *Solanum lycopersicum* (domates) bitkisinde kadmiyum (Cd) stresine karşı *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia gladioli* gibi PGPR bakterilerini kullanarak domateste yaptığı inokülasyon sonucunda; *P. aeruginosa* ile inoküle edilen tohumlarda total fenol miktarının %60, flavonoidlerin %28 ve antosiyanin miktarının ise %56 arttığı not edilmiştir. *B. gladioli* ile inoküle edilen domates tohumlarında ise total fenol miktarının, flavonoidlerin ve antosiyanin miktarının sırasıyla %111, %13 ve %34 oranında artış gösterdiği gözlenmiştir.

Ghorbanpour ve ark., (2016) *Salvia officinalis* (adaçayı) bitkisi üzerinde *P.fluorescens* ve *P.putida* gibi PGPR bakterilerinin farklı suşlarını kullanarak flavonoidler, fenolikler ve esansiyel yağlar gibi sekonder metabolitlerin üretimi üzerindeki rollerini araştırmak için toprağa ve yapraklara yaptıkları inokülasyon sonucunda; bakterilerle inoküle edilen bitkilerde kök (%42,36,40,83) ve sürgün biyokütlesinde, yaprak P (fosfat) düzeyinde, fenolik bileşiklerinde, flavonoid ve esansiyel yağ miktarında inoküle edilmeyen bitkilere oranla önemli artışlar gözlenmiştir. Ayrıca elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri de incelenmiş ve bakteri ile inoküle edilen bütün bitkilerde antioksidan aktivite ve esansiyel yağların patojenik bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinde de önemli artışlar olduğu belirlenmiştir.

del Rosario Cappellari ve ark., (2013) *Tagetes minuta* (Kadife çiçeği) bitki tohumlarına *Pseudomonas fluorescens* ve *Azospirillum brasilense* PGPR ile yaptıkları inokülasyon sonucunda; *P. fluorescens* rizobakterisi ile inoküle edilen tohumlarda inoküle edilmeyen tohumlara oranla esansiyel yağ miktarının %70 oranında artış gösterdiği görülmüştür. Total fenolik içeriğinin yalnızca *P. fluorescens* ve *P.fluorescens* + *A. brasilense* ile inoküle edilen tohumlarda kontrole oranla 2 kat arttığı gösterilmiştir. Ayrıca kök kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve kök uzunluğunda da kontrol bitkisine (bakteri ile inoküle edilmeyen) oranla bakteri ile inoküle edilen bitkilerde artış gözlenmiştir.

Xiao ve ark., (2020) *Oryza sativa* L. (pirinç) bitkisi üzerinde PGPR bakterilerinin arsenik biriktirme ve bitki büyümesi üzerine yaptıkları çalışma sonucunda PGPR bakterilerinin sera koşullarında bitki büyümesini %10-50 arasında, tarla koşullarında ise %4-9 arttırdığı gösterilmiştir. PGPR uygulanan toprakta arsenik ağır metalinin bitkiye verdiği hasar da azalmıştır. Yapılan çalışma ile arsenikli toprakta arsenik birikiminin azaldığı arsenik ile kontamine olan topraklarda bitki büyümesini düzenlendiği not edilmiştir.

Islam ve ark., (2014) Zn stresi altındaki buğdayın PGPR bakterisi *P. aeuroginosa* ile inoküle edilmesi sonucu oksidatif stres üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda bakteri inoküle edilen bitkilerin azot ve fosfat alımını arttırdığı, yaprak klorofil miktarında, total çözünebilir protein ve bitki biyokütle üretiminde artış olduğu gözlenmiştir. Zn+PGPR bitkilerde kök ve sürgün analizleri sonucunda Zn konsantrasyonunun, sadece Zn stresine maruz kalan ve herhangi bir bakteri uygulanmayan bitkiye oranla daha az olduğu not edilmiştir. *P. aeuroginosa* uygulaması ile Zn stresinin zararlı etkileri SOD (Süperoksit Dismutaz), POD (Peroksidaz) ve CAT (Katalaz) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini ve askorbik asit ve total fenolik gibi enzimatik olmayan bileşiklerin miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. PGPR uygulaması ile daha da aktifleşen antioksidatif savunma mekanizmanın ROS'ları süpürmesi ile H₂O₂ ve MDA miktarında azalmalar gözlenmiştir.

Salla ve ark., (2014) *Eucalyptus* (ökaliptus) bitkilerinin köklerine uyguladıkları *Streptomyces spp.* rizobakterisinin sentezlediği IAA ile kök büyümesini teşvik ettiği ve bu köklerin analiz edilmesi ile fenolik ve flavonoid sekonder metabolit içeriğinde değişimler olduğu aynı zamanda PPO (Polifenoloksidaz) ve POX gibi antioksidan enzimlerde de önemli değişimler olduğu gözlemlenmiştir.

Mushtaq ve ark., (2021) *Abelmoschus esculentus* (bamya) bitkisinde ağır metal kirliliğine karşı PGPR iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada bitkilerde metabolik bazı süreçlerin bozulmasına neden olan kromun (Cr) toksik formu olan Cr (IV)'ün daha az toksik formu Cr (III)' e dönüşümünün PGPR bakterileri tarafından yapılabildiği gösterilmiştir.

Çalışmada Cr (IV) ile kontamine toprakta sürgün uzunluğunun, kök uzunluğunun ve fotosentez oranının sırasıyla %19, %37 ve %31 oranında baskılandığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber PGPR ile inoküle edilen bitkilerde ise Cr (IV) alımının kök ve sürgünlerde sırasıyla %37 ve %31 oranında azaldığı görülmüştür.

Li ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada PGPR grubunun bir suşu olan *Kocuria rhizophila* Y1 bakterisinin mısırdaki (*Zea mays*) tuzluluk stresi altında meydana gelen moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar *K. Rhizophila* Y1 suşunun besin alımını kolaylaştırarak ve bitki büyüme hormonları IAA ve ABA'yı düzenleyerek tuz stresine karşı *Zea mays* (mısır) bitkisini koruyabildiği gösterilmiştir. Ayrıca özellikle büyüme performansının, biyokütle üretimi, tohum çimlenme oranı, fotosentetik kapasite, antioksidan düzeyleri, bağıl su içeriği ve klorofil birikiminde *K. Rhizophila* Y1 ile inoküle edilen tuzluluk stresi altındaki mısır bitkileri ile inoküle edilmeyen mısır bitkileri kıyaslandığında bakteri ile inoküle edilenlerde daha iyi gelişimin olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber Y1 suşu ile inoküle edilen mısırdaki daha az elektrolit sızıntısı olduğu, antioksidan mekanizma ve tuz toleransı ile ilişkili genlerin daha fazla transkripsiyona uğradığı gösterilmiştir.

He ve ark., (2021) *Haloxylon ammodendron* bitkisinin rizosferinden izole ettikleri *Bacillus sp.* WM13-24 ve *Pseudomonas sp.* M30-35, bakteri suşlarını bir çim türü olan *Lolium perenne* L. bitki tohumlarına inoküle etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile kuraklık stresi altında, izole ettikleri PGP bakterilerinin çim bitkisi üzerindeki iyileştirici etkisi incelemişlerdir. Normal şartlar altında WM13-24 ve M30-35 suşlarının kontrol grubuna oranla sürgün taze ve kuru ağırlığını, klorofil, total fosfat ve nitrojen içeriğini arttırdığını ve fitohormon dağılımını değiştirdiği gözlenmiştir. Kuraklık stresinin 7. gününde *Bacillus* ve *Pseudomonas* suşlarının fotosentetik kapasiteyi, bağıl su tutma oranını, katalaz ve peroksidaz aktivitelerini, prolin içeriğini arttırdığı, MDA içeriğini, bağıl membran geçirgenliğini ve hidrojen peroksit birikimini azalttığı sonucuna varılmıştır. Her iki bakteri suşunun da yapraklarda ABA (abscisik asit) içeriğini azalttığı gözlemlenmiştir.

Benidire ve ark., (2021) maden atıklarının temizlenmesi, bitki büyümesi ve bitki örtüsünün oluşumu üzerine PGPR ve organo-mineral bileşiklerin sinerjik etkisini

çalışmışlardır. Yapılan çalışmada bir çim türü olan *Lolium perenne* L. kullanılmıştır. Çalışmada PGPR olarak *Advenella kashmirensis* BKM20 ve *Mesorhizobium tamadayense* BKM04 suşları kullanılmıştır. Bitki büyümesi bakterilerin tek tek ve beraber inokülasyonu ile artmıştır. PGPR suşları ile inoküle edilen çim bitkisinde katalaz, peroksidaz, polifenoloksidaz ve glutatyon redüktaz gibi güçlendirilmiş bir antioksidan mekanizmanın göstergesi olan enzim aktivitelerinde artış olduğu gözlenmiştir.

Ke ve ark., (2021) metale dirençli *Acinetobacter sp.* RA1, *Bacillus sp.* Eh7 ve *Bacillus sp.* RA2 PGPR suşlarını kullanarak çok yıllık çimlerde bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) fitostabilizasyon etkilerinin geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır. Yapılan çalışmada metal varlığında PGPR suşlarının performansı, stres şartları altında özelliklerini devam ettirme durumu ve fitostabilizasyon potansiyelinin yükseltilmesi değerlendirilmiştir. Adsorbsiyon çalışması PGPR suşlarının, Cu metalini %79,49 ve Cd metalini %81,35 oranında biyoakümülyasyon ve biyoabsorbsiyon ile immobilize edebildiğini göstermiştir. Çalışmada kullanılan PGPR suşları ağır metal varlığında ve yokluğunda Indol-3-asetik asit (IAA) sentezleme ve fosforu çözüme özellikleri göstermişlerdir. Cu ve Cd stresine maruz kalan izolatların siderofor üretme yeteneği baskılanmıştır. Toprağa PGPR eklenmesi ile Cu ve Cd ile kontamine topraklardaki bitkilerin sürgün ve kök biyokütlelerinde sırasıyla %11,49-44,50, %43,53-90,29 oranında artışın olduğu görülmüştür. İnoküle edilen bitkilerin MDA oranında ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde normal şartlar altındaki bitkilere oranla seviyelerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Asghari ve ark., (2020) yarpuz bitkisinde (*Mentha pulegium* L.) su eksiliği şartlarında PGPR suşlarının sekonder metabolit biyosentezini uyardığını ve kuraklığa direnç sağladığını kaydetmişlerdir. Yaptıkları çalışmada PGPR suşları olarak *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* kullanmışlardır. Çalışmada kuraklık stresinin özellikle klorofil floresansında ve bağıl su içeriğinde azalma meydana getirmiştir. PGPR inokülasyonu, *Mentha pulegium* L. bitkisinde sekonder metabolit üretimi ve fizyobiyokimyasal özellikler üzerine su eksikliğin zararı etkilerini azaltmıştır. PGPR inokülasyonu ile bitki kuraklık stresinde MDA miktarı ve elektrolit sızıntısı az olmuştur. Kuraklık stresi altındaki bitkide katalaz aktivitesi yükselmiştir. Bununla beraber PGPR inoküle edilen bitkilerde CAT aktivitesinin azaldığı, SOD aktivitesinin ise arttığı gözlemlenmiştir.

Belirtilen bakteri suşları kombine şekilde verildiğinde ABA, DPPH süpürme aktivitesi, fenolik ve flavanoid düzeylerinin en yüksek seviyede olduğu kaydedilmiştir.

Tirry ve ark., (2021) *Medicago sativa* (yonca) bitkisinde tuz stresi altında PGP bakterilerinin toprak enzim aktivitesini ve tuzluluğa toleransı arttırdığını göstermişlerdir. *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes sp.*, *Klebsiella sp.*, ve *Pseudomonas cedrina* bakterilerinin inokülasyonu sonucunda yonca bitkisinde tuzluluk stresine karşı kontrol grubuna oranla klorofil içeriğinde, bitki büyümesinde gelişimlerin olduğu rapor edilmiştir. Oksidatif hasrın indikatörleri olan malondialdehit, hidrojen peroksit ve prolin düzeylerinin de düştüğü gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bakteri ile inokülasyonun toprak fosfataz aktivitesini, β -galaktosidaz ve arilamidaz aktiviteleri üzerine pozitif etkileri görülmüştür.

Li ve ark., (2020) *Avena sativa* (yulaf), *Medicago sativa* (yonca) ve *Cucumis sativus* (salatalık) bitki fidelerinin toprak özellikleri ve büyümeleri üzerine PGPR mikrobiyal inokulantların etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada PGP rizobakterilerinin (*Providencia rettgeri* P2, *Advenella incenata* P4, *Acinetobacter calcoaceticus* P19, ve *Serratia plymuthica* P35) her üç bitkide de bitki kuru ağırlığını, bitki boyunu, kök uzunluğunu, kök yüzey alanını, kök hacmini ve klorofil içeriğini arttırdığı ayrıca fidelerde CAT, POD ve SOD aktivitelerini güçlendirdiği gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan mikro canlıların bitki rizosfer toprağında üreaz, invertaz, alkalik fosfataz, katalaz aktivitesini ve fosfor, potasyum ve nitrojen varlığını arttırdığı gösterilmiştir.

Desoky ve ark., (2020) buğday bitkisinde (*Triticum aestivum* L.) tuzluluk stresi altında PGPR mikro canlılarının oksidatif stresin baskılanması ve antioksidan savunma mekanizmasının aktifleşmesi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşlarını buğday bitkisinin toprağına inoküle etmişlerdir. Tuzluluk stresinin büyümeyi, fotosentetik pigmentleri, gaz alışverişini, membran stabilitesini, bitki su içeriğini ve potasyum – kalsiyum içeriğini belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber oksidatif stresin markırları olan süperoksit ve hidrojen peroksit radikal düzeyleri artmıştır. PGPR inokülasyonu ile tuzluluk stresinin zararlı etkileri detoksifiye edilmiş, antioksidatif aktivite düzeyi yükselmiştir.

Bitki büyüme düzeyi, ürün miktarı artmış, oksidatif stres molekül düzeylerinde düşüş kaydedilmiştir.

Kohler ve ark., (2009) marul bitkisinde tuz stresine karşı *Pseudomonas mendocina* PGPR bakterisini tek başına ve arbusküler mikorizel mantarlar (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*) ile kombine şekilde kullanmıştır. Bütün tuz seviyelerinde bakteri inokülasyonu, kontrole oranla özellikle sürgün biyokütlesinde önemli derecede artış sağlamıştır. Mantar inokülasyonu sadece orta düzeydeki tuz seviyelerinde sürgün biyokütlesinde artış sağlamıştır. Bakteri ve mantar ile ayrı ayrı inoküle edilen bitkilerde en yüksek tuzluluk düzeylerinde yaprak su düzeyi yükselmiştir. Özellikle PGPR ile aşılana bitkilerde tuz stresi şeker akümülyasyonunu azaltmış ve yaprak prolin konsantrasyonunu arttırmıştır. Tuzluluk stresinin artması total peroksidaz ve katalaz enzimleri içeren antioksidan aktivitenin artmasına yol açmıştır. Şiddetli tuz stresinde PGPR suşlarının bu antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir.

Fatnassi ve ark., (2015) baklada (*Vicia faba* L.) bakır (Cu) stresi altında, antioksidan mekanizma ve büyüme üzerine PGPR ve rhizobium ikili etkileşimini çalışmışlardır. Yapılan çalışmada büyüme parametresi, bakır birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiştir. 1 mM üzerindeki Cu konsantrasyonu bitki büyümesine zarar verirken *Rhizobium* ve PGPR birlikte inokülasyonu metal stresinin zararlı etkilerini indirgediği gözlemlenmiştir. Bununla beraber ikili inokülasyon inoküle edilmeyen bitkilerle kıyaslandığında bitki kuru ağırlığında artışa yol açmıştır. Köklerdeki bakır alımı %80 oranında azalma göstermiştir. Cu varlığında SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış olduğu kaydedilmiştir. Daha düşük Cu konsantrasyonunda ise yaprak ve köklerdeki askorbat peroksidaz (APX) ve peroksidaz aktivitelerinin uyarıldığı not edilmiştir. 1 mM Cu uygulaması köklerde SOD, CAT ve APX aktivitesini artırırken sürgünde ise sadece SOD ve POX aktivitesi artmıştır. 2 mM Cu ile kontamine edilen bütün topraklarda enzim aktiviteleri inhibe olmuştur.

Tahir ve ark., (2019) tuz stresine karşı patatesta (*Solanum tuberosum* L.) PGPR mikro canlılarının antioksidan üretiminin regülyasyonu ve iyon alımı üzerine etkilerini çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada tuza toleransı olan *Bacillus* türlerini kullanmışlardır. Yapılan çalışmada *Bacillus* suşlarının farklı konsantrasyonlardaki tuz ortamlarında,

çözünemeyen fosfatı çözünebilir hale getirdiği, IAA ürettiği ve ACC deaminaz sentezlediği gösterilmiştir. Bakteri suşlarının birlikte inokülasyonu ile bağıl su içeriğinin arttığı, elektrolit sızıntısının ve antioksidan enzim aktivitesinin ise hem normal toprakta hem de tuzlu toprak ortamında azaldığı kaydedilmiştir. PGPR'nin özellikle bitki biyokütlesinde artış sağladığı her bir bitki başına yumru sayısını ve verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Genç patates bitkilerinin kök eksudatlarında oksin hormon üretiminin arttığı gösterilmiştir. Tuz ile muamele edilen topraklarda yetiştirilen bitki rizosferlerinde Na iyon regülasyonu ve yumru veriminin oksin artışı ile korelasyon gösterdiği kaydedilmiştir. *Bacillus* suşlarının en nihayetinde patates rizosferinde oksin üretimini arttırdığı, antioksidan enzim üretimini ve Na, K ve Ca alımını düzenlediği bunların sonucu olarak hem tuzlu topraklarda hem de normal topraklarda pateteste verimi çok arttırdığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir.

Chiappero ve ark., (2019) kuraklık stresi altında nanede (*Mentha piperita*) PGPR canlılarının antioksidan mekanizma ve total fenolik bileşenlerin içeriği üzerine etkisini çalışmışlardır. Çalışmada bitki kökleri *Pseudomonas fluorescens* WCS417 ve *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 suşları ile inoküle edilip şiddetli ve orta şiddette kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. PGPR canlılarının bitki büyümesini nasıl ve ne kadar teşvik ettiği, kuraklık toleransını nasıl etkilediği, enzimatik ve enzimatik olmayan parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar kuraklık stresine maruz bırakılıp aynı zamanda PGPR ile inoküle edilen bitkilerde kontrol grubuna oranla total fenolik içeriğinin ve peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin artış gösterdiği gösterilmiştir. Bitkiler yalnızca strese maruz bırakıldıklarında prolin miktarında herhangi bir değişiklik görülmezken stres ile birlikte PGPR uygulaması prolin miktarının azalmasına neden olmuştur. PGPR inokülasyonu kuraklık stesi altında *Mentha piperita* da membran hasarının belirteci olan lipid peroksidasyonunun da azalmasını sağlamıştır.

Yasmeen ve ark., (2020) ayçiçeği bitkisinde antioksidan enzim aktivitesinin uyarılması ile tuzluluk toleransının artmasını sağlayan ve büyümenin artmasında rol oynayan biofilm oluşturma özelliğine sahip PGPR ile çalışmışlardır. *Bacillus licheniformis* ve *Pseudomonas plecoglossicida* suşları ile yapılan çalışmada her iki bakteriyel inokülantın IAA sentezlediği, inorganik fosfatı çözebildiği ve ACC deaminaz aktivitesini eksprese

ettiği gösterilmiştir. PGPR inoküle edilen bitkilerde kuru ve yaş ağırlıkta, bitki boyunda ve kök uzunluğunda artış görülmüştür. CAT, SOD ve GPX (guaikol peroksidaz) antioksidan enzim ekspresyonunu arttırarak oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı kaydedilmiştir.

Shahid ve ark., (2021) tuz stresi altında *Vigna radiata* (maş fasulyesi) bitkisinde halotolerant bir bakteri olan *Kosakonia sacchari*' nin, bitkinin antioksidan durumu, iyon dengesi, stres metabolitlerinin ve verimi üzerine bitkide meydana getirdiği kolonizasyonunu çalışmışlardır. Çalışmada uygulanan tuz konsantrasyonunun artmasıyla antioksidan enzim, MDA, prolin, membran hasarı, hidrojen peroksit içeriği, bağıl su içeriği ve Na⁺/K⁺ iyon konsantrasyonunun da arttığı gösterilmiştir. Toprağın halotolerant PGPR suşu ile inoküle edilmesiyle, tuz stresi koşulları altında stres kaynağının iyileştirildiği, bitki kuru ağırlığının, klorofil formasyonunun, simbiyosizin ve ürün veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında *Kosakonia sacchari* suşu, prolin, hidrojen peroksit, MDA ve antioksidan enzim aktivitelerini düşürdüğü bunlara ek olarak membran hasarı, bağıl su oranı ve Na⁺/K⁺ iyon düzeyleri bakteri uygulamasını takiben azaldığı kaydedilmiştir.

Patel ve Saraf, (2013) *Jatropha curcas* L. (kurkas) bitkisinde, tuzluluk koşulları altında toprak mikroflorasının antioksidan moleküllerin indüksiyonu ve büyümeyi teşvik edici etkisini çalışmışlardır. PGPR suşları *Enterobacter clocae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ve *Bacillus sp.*, ile inoküle edilen bitkilerde kök sayısı, kök uzunluğu, kök taze ve kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve klorofil içeriğinde artış olduğu gösterilmiştir. PGPR inokülasyonu Na, N, K, P alımını arttırmıştır. Tuz stresi uygulanan bitkilerde PGPR inokülasyonu ile prolin düzeyinde artış gözlenmiştir. Artan tuz stresi ile beraber özellikle askorbat peroksidaz ve katalaz enzimlerini içeren antioksidan moleküllerde önemli derecede artış sağlanmıştır.

Saleem ve ark., (2018) Ayçiçek bitkisinde kurşun ile kontamine topraklarda, kurşuna toleransı olan PGP rizobakterilerinin bitkinin antioksidan aktivitesi, büyümesi, fizyolojisi, ürün verimi ve bitkinin kurşun akümüasyonu üzerine etkisini çalışmışlardır. *Pseudomonas sp.* suşları ile yaptıkları çalışmada kurşun ile kontamine topraklarda bitkinin fizyolojik parametrelerini, bitki büyümesini olumsuz etkilediği fakat PGPR

uygulamasý ile bitkinin büyümesini, fizyolojik parametrelerini, verimini ve prolin düzeyini arttırdığı malondialdehit düzeyini ise düşürdüğünü göstermişlerdir. PGPR uygulamasının aynı zamanda ayçiçeği bitkisinin kök ve sürgün kısımlarında kurşun alımını teşvik ettiği de kaydedilmiştir.

Sirajuddin ve ark., (2016) domates bitkisinde (*Lycopersicum esculentum* L.) bor stresine karşı *Bacillus pumilus* bakterisinin koruyucu etkisini çalışmışlardır. Bakteri uygulaması yapılan bitkilerde ortamda bor elementinin varlığından bağımsız bir şekilde bitkinin hem yaş hem de kuru ağırlığında artış gözlemlenmiştir. *B.pumilus* bakterisi domates fidelerinde özellikle SOD ve CAT antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış meydana getirmiştir.

Qadir ve ark., (2020) *Helianthus annuus* L. (ayçiçeği) bitkisinde krom (Cr) toksisitesine karşı fitohormon üreten *Staphylococcus arlettae* rizobakterisinin MT4 suşunun antioksidan moleküller üzerine etkisini çalışmışlardır. Krom direnci olan bakteri suşunun, krom stresi altında ayçiçeği bitkisinde fitohormon ve bitki büyümesini teşvik eden sekonder metabolitleri salgıladığı gösterilmiştir. Bununla beraber MT4 suşunun Cr alımını baskılayarak, fitohormonları modüle ederek, bitkinin antioksidan sistemini genişleterek bitkide Cr stresinin 3 kat daha fazla iyileştirildiği kaydedilmiştir. Bitkide MT4 suşu uygulaması ile aynı zamanda ROS birikiminde düşüş, ROS süpürme aktivitesinde artış, peroksidaz aktivitesinde azalma total fenol ve flavonoidlerde artış gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali, kekik (*Thymus vulgaris*), ticari bir firmadan fide halindeyken satın alınmıştır. Fide halinde satın alınan kekik bitkisi Bingöl Üniversitesi Merkez Kampüs bahçesinden alınan toprak kullanılarak saksılara ekilmiştir. Çalışmada kullanılan toprak 0,2' mm lik elekten geçirildikten sonra kullanılmıştır. Her bir grup için 3 tekrar olacak şekilde bitki ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.2. Bitki Büyütme Koşulları

Saksılara ekilen kekik bitkisi fideleri bitki büyütme kabine alınmıştır. Kabin içi şartlar aşağıda belirlenen şekilde ayarlanmıştır;

Tablo 3.1. Bitki Büyütme Koşulları

	Sıcaklık	Nem	Aydınlanma
Gece	23 °C	%70	10.000 lux
Gündüz	28 °C	%70	10.000 lux

Bitki örnekleri her bir saksı için düzenli sulama rejimine tabi tutulmuştur. Bu sulama rejimi bitki grupları çiçek açmaya başlayınca (45 gün) kadar devam etmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Bitki ve Bakterilerin Temin Edilmesi

Çalışmada *Tymus vulgare* L. (Adi kekik, bahçe kekiği) bitkisinin fideleri ticari bir firmadan temin edilerek kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki büyümesini düzenleyici bakteri grupları olarak halofit bazı bitkilerin rizosfer bölgelerinden izole edilen bakteri izolatları kullanılmıştır (Aydın 2016). Seçilen izolatların ACC deaminaz aktiviteleri, azot fiksasyonu ve gram boyama gibi bazı özelliklerine göre değerlendirilmeler yapılmış ve bitki büyüme düzenleyici bakteri olarak değerlendirilen 4 halotolerant bakteri suşu kullanılmıştır (Aydın 2016) (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Grupları

TG-4: <i>H. arcis</i>	TG-12: <i>H. dabanensis</i>
TG-16: <i>S. Succinus</i>	TG-20: <i>K. İndalinina</i>

3.4. Bakteri Çoğaltılması

Bu çalışmada kullanılan bakteri grupları Nutrient Broth besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Nutrient agar besiyerinden plastik öze ile alınan bakteri grupları, nutrient broth sıvı besiyerine ekilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 30 °C’de çoğaltılması beklenen bakteri grupları OD: 0.7 geldiğinde bitki toprağına uygulama gerçekleştirilmiştir.

3.5. Bitkiye PGPR Uygulaması

Uygun besiyerinde çoğaltılan bakteri grupları 45 günün sonunda çiçeklenen kekik bitkilerine uygulandı. Düzenli bir sulama rejimine tabi tutulan saksılar için kontrol grubuna bakteri içermeyen ortam, diğer gruplara ise PGPR bakterilerini içeren besiyerleri eşit miktarda bitki toprağına uygulanmıştır. Her grup için 3 tekrar yapılmıştır. Yapılan uygulamadan sonra bitkilerin bulunduğu saksılar tekrardan bitki büyütme kabine alınmıştır. 5 gün boyunca aynı şartlar altında bitkilerin büyümesi sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Bitki Grupları ve Çoğaltılan Bakteri Grupları

3.6. Bitki Hasadı

Saksıda yetiştirilen, bakteri uygulanan ve uygulanmayan kekik bitkileri çiçeklenmenin başladığı günden beş gün sonra hasat edilmiştir. Hasat edilen bitki örneklerinden çalışmalarda taze olarak kullanılacak bitki materyali 0.5 g olarak tartılıp alüminyum folyoya sarılarak -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Geri kalan bitki numunesi kuru ve gölgelik alanda kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan bitki numuneleri sekonder metabolitler, antioksidan aktivite ve uçucu bileşenlerinin analizi çalışmalarında kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Kabin İçinde Yetiştirilen Bitki Grupları

3.7. Bitki Ekstraksiyonu

Kurutulup $+4^{\circ}\text{C}$ de muafaza edilen kuru bitki örnekleri ekstraksiyon işlemleri için toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki gruplarından 30 g tartılarak 1000 ml lik balon jöjelere alındı. Her bir balon jöjeye 700 ml olacak şekilde metanol eklendi. Bitki örnekleri ve alkolün iyice karışması sağlandıktan sonra 2 gece boyunca inkübe edildi. Bu karışım gün içerisinde birkaç defa karıştırılarak bitki-alkol etkileşiminin daha hızlı olması sağlandı. 2 gece boyunca metanolde bekletilen bitki örnekleri huni yardımıyla tülbentten süzülerek elde edilen süzüntü evaporatörden geçirilerek bitki ekstraktı ve metanol ayrıştırıldı. Elde edilen ekstrakt cam petrilere dökülerek metanolün tam uçması ve ekstraktın kuruması sağlandı. Tülbenttin üst kısmında kalan bitki kalıntıları üzerine tekrardan metanol eklenerek aynı işlem 5 defa tekrarlandı. İşlem sonunda petride biriken bitki ekstraktı tam kurutulmaya bırakıldı ve çalışmalarda kullanılmak üzere uygun şartlar altında muhafaza edildi.



Şekil 3.3. Metanol Ekstraksiyonu ve Elde Edilen Ekstrakt

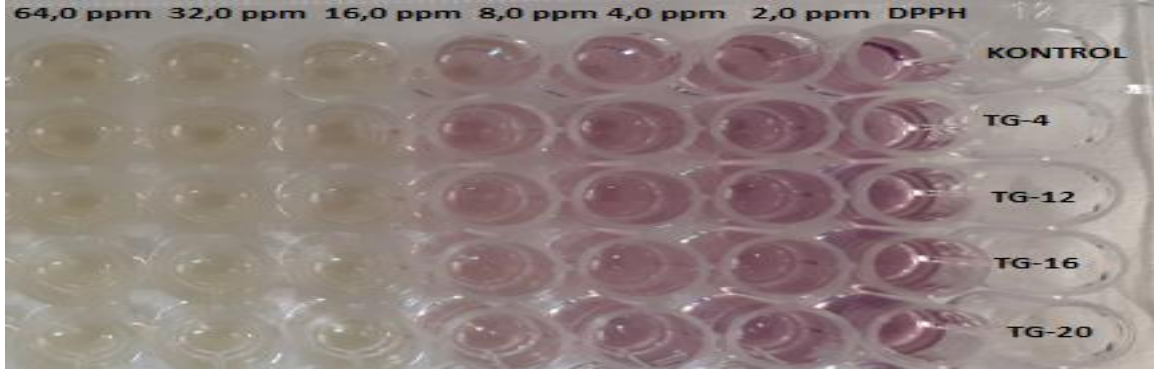
3.8. Antioksidan Çalışmalar İçin Standart Grafik Oluşturma

Elde edilen ekstraktların antioksidan etkinliklerini belirlemek amacıyla BHA, BHT, alfa Tokoferol ve trolox standart antioksidanlar kullanılmıştır. Konsantrasyonlar 2.0-1000 $\mu\text{g/ml}$ aralığında olacak şekilde belirlenmiştir. Standart antioksidanlar için stok çözelti mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma 96'lı mikrotablada yapılmıştır.

3.9. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi

Elde edilen kekik bitkisi ekstraktları, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidraliz) radikalini giderme etkisi radikalın mor/menekşe olan rengini giderme aktivitesi ile ölçümü yapılmaktadır. Mor/menekşe renkli DPPH çözeltisi bitki ekstraktından proton ya da elektron alarak rengin açılması sağlanmaktadır. Bu renk açılması 517 nm dalga boyunda eliza cihazında ölçüm alınarak standart antioksidanlarla karşılaştırıldı ve etkinlik derecesi hesaplandı. DPPH radikal giderme aktivitesi testi için 0.1 mM'lık DPPH çözeltisi hazırlandı. 96'lık mikrotablada bitki örnekleri ve BHA standart antioksidanı için 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 ve 64.0 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları çalışıldı. Bu çözeltilerin üzerine 125 mikrolitre DPPH çözeltisi eklenerek 1 saat karanlık ortamda bekletildi. 517 nm dalga

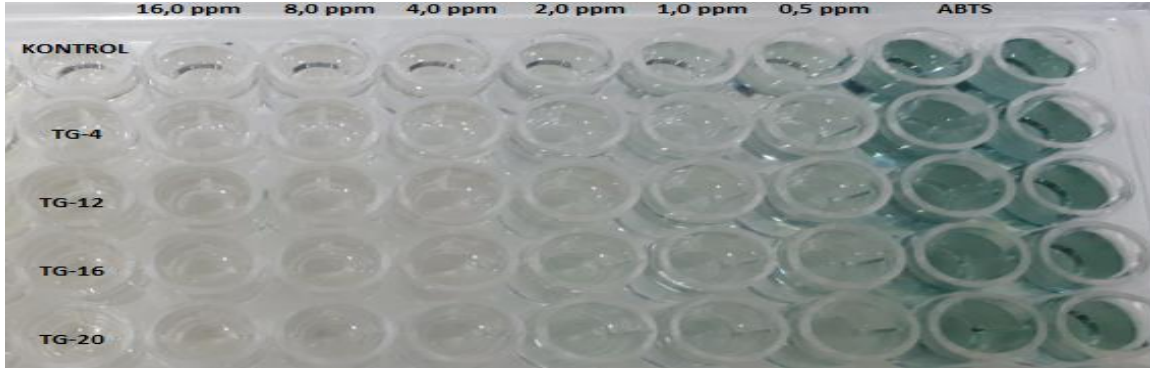
boyunda eliza cihazında ölçüm alındı ve standart antioksidan BHA ve kekik bitki numunelerinin DPPH giderme aktiviteleri karşılaştırıldı. Kontrol grubu olarak DPPH kullanıldı. Yapılan işlemler her grup için 3 defa tekrarlandı (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.4. DPPH Süpürme Aktivitesi

3.10. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi

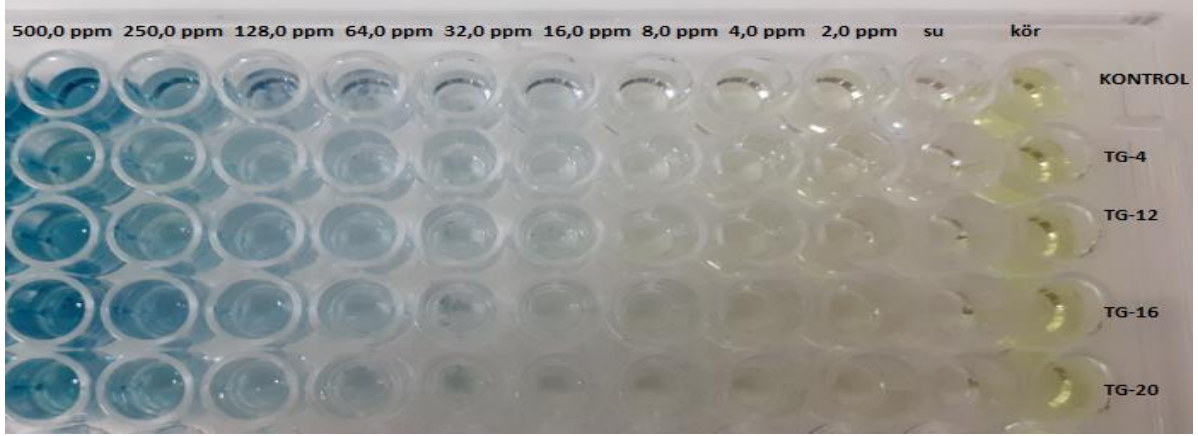
ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat) radikali, hazırlanan ABTS çözeltisine potasyum persülfat çözeltisinin eklenmesiyle oksidasyon tepkimesi sonucu oluşturuldu. ABTS radikal oluşturma işlemi için 0.1 M Na_2HPO_4 fosfat tamponu hazırlandı. Bu tamponun pH, HCl ile 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan 2 mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (potasyum persülfat) çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak ABTS radikali oluşturuldu. Oluşturulan çözeltinin 17-18 saat boyunca manyetik karıştırıcıda iyice karışması sağlandı. 734 nm dalga boyunda alınan ölçüm sonucunda çözeltinin absorbansı 0.1 M pH:7.4 olan fosfat tamponu ile OD: 0.9 olacak şekilde ayarlandı. Standart antioksidan ve numune testi için konsantrasyonlar 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ den başlayarak dilüsyon işlemiyle konsantrasyon yarıya düşürülerek yapıldı. 96'luk mikro tablanın ilk kuyucuğuna 250 mikro litre numune diğer kuyucuklara 125 mikro litre etanol konularak seyreltme işlemi yapıldı. Bu işlem bittikten sonra bütün kuyucuklara 125 mikrolitre ABTS radikali eklendi oda sıcaklığındaki 8 dakikalık inkübasyondan sonra 734 nm dalga boyunda alınan ölçümler not edildi. Bu işlemler her grup için en az 3 tekrarlı yapıldı (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.5. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi

3.11. İndirgeme Gücü Aktivitesinin Tayini

İndirgeme gücü aktivitesi elde edilen bitki ekstraktlarının Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına dönüştürme kapasitesinin test edilmesi için uygulanan bir antioksidan testtir. İndirgeme gücü tayini için 3 ml standart ve bitki ekstraktları 3 ml 0.2 M pH:6.6 NaH_2PO_4 fosfat tamponu ile karıştırıldı. Üzerine 3 ml %1 lik $K_3Fe(CN)_6$ eklenerek 50 °C de 20 dk inkübe edildi. Sıcaklıkta inkübe edilen tüpler oda sıcaklığına alındıktan sonra üzerlerine 3 ml %10'luk TCA eklendi. Tüpler TCA eklendikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan 3 ml alınarak üzerine 3 ml saf su eklendi. Vortex işlemi ile iyice karışması sağlandı. 96'lık mikro tablanın ilk kuyucuğuna hazırlanan çözeltilerden 250 μ l alındı. Diğer kuyucukların her birine 125 μ l etil alkol alınarak seyreltme işlemi ilk kuyucuktan başlayarak 9 kuyucuk boyunca devam etti. Bu şekilde seyreltme işlemi 500 μ g/ml'dan başlayarak %50 azalan konsantrasyonlarda yapıldı. Seyreltme işleminden sonra her bir kuyucuğa 25 μ l $FeCl_3$ eklenerek oluşan Prusya mavisi rengin 700 nm dalga boyunda eliza cihazında ölçümü alındı. Kör olarak $FeCl_3$ dışındaki diğer çözeltiler karıştırılarak kullanıldı. Artan konsantrasyonlardaki yüksek absorbans indirgeme gücünün etkinliğini göstermektedir (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.6. İndirgenme Gücü Aktivitesi

3.12. Total Fenol İçeriği Tayini

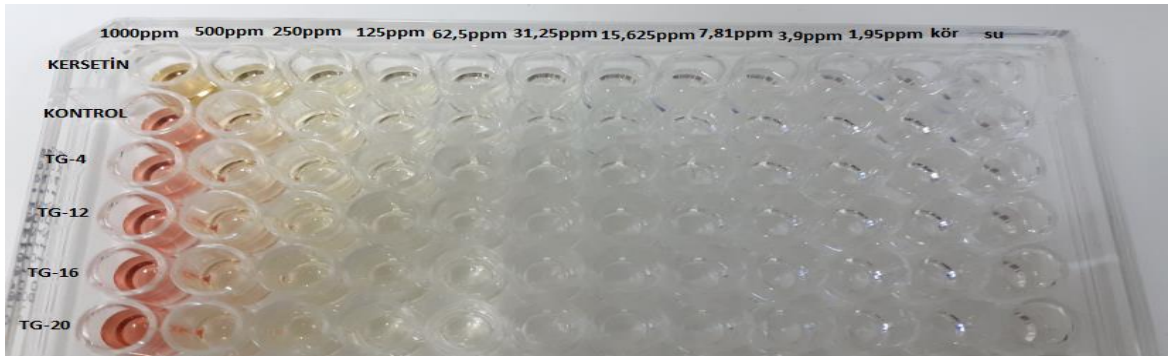
Total fenolik madde içeriği tayini yaygın kullanılan FCR (Folin Ciocalteu Reaktifi) metoduna göre yapılmıştır. FCR yöntemine göre çalışmada kullanılan bitki örneğinden 125 µl ve Folin Ciocalteu Reaktifinden 125 µl alınarak 5 dakika süreyle karıştırıldı. Üzerine %2'lik Na₂CO₃ (sodyum karbonat) çözeltisinden 125 µl eklendi ve 1 dakika vortex işlemi uygulandı. Hazırlanan bu karışımın üzerine 875 µl saf su eklenerek karışım tüpü tekrardan vortexlendi. Tüp 25 °C 'de 90 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra kör numuneye karşı 760 nm dalga boyunda Eliza Reader cihazında ölçüm alındı. Yapılan çalışmada 1000 ppm den başlayarak seri dilüsyon yapılarak totalde 10 konsantrasyon çalışıldı (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.7 Total Fenol İçeriği

3.13. Total Flavonoid Tayini

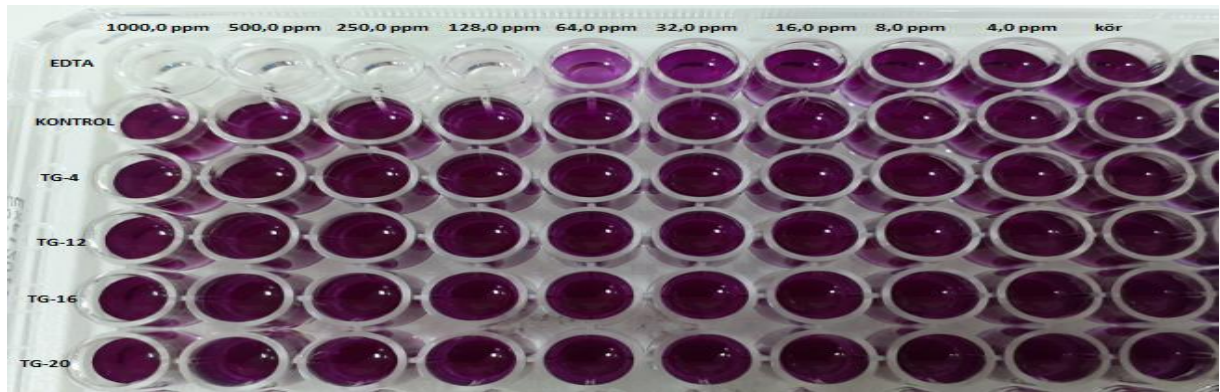
Çalışmada PGPR uygulanan ve uygulanmayan *Thymus* bitki örneklerinin total flavonoid tayini için 500 µl bitki numunesinden alınarak üzerine 60 µl NaNO₂ eklendikten sonra 3 dk vortex işlemi uygulandı. Bu karışımın üzerine 30 µl AlCl₃ eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Üzerine 450 µl NaOH ve 1 ml saf su eklendikten sonra tekrar vortex yapıldı ve 415 nm dalga boyunda köre karşı Eliza Reader cihazında ölçüm alındı (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.8. Total Flavanoid İçeriği

3.14. Metal Şelatlama Aktivite Tayini

Fe elementi serbest halde prooksidan özelliği olan bir elementtir. Fenton reaksiyonu sonucu H_2O_2 ile tepkimeye girerek en zararlı serbest radikal olan OH^\cdot (hidroksil) radikalinin oluşmasına öncülük edebilmektedir. Antioksidan özelliği olan bitkiler, ortamda bulunan serbest demiri bağlayarak oluşabilecek serbest radikallerin önüne geçilmiş olacaktır. Yapılan çalışmada kullanılan bitki materyalinin Fe^{+2} bağlama aktivitesini incelemek amacıyla $FeCl_2$ (demir klorür) kimyasalı kullanıldı. Çalışmada kullanılan bitki numunesi ve standart örneğinden 250 μ l 96 kuyucuklu mikrotablanın ilk kuyucuğuna alındı. İlk kuyucuktan alınan 125 μ l numune ikinci kuyucuktaki çözelti içerisinde bulunan aynı miktardaki çözücü içerisinde alınarak dilüsyon işlemi 1000 ppm den başlayarak 4,0 ppm kadar yapıldı. Her bir kuyucukta bulunan numune üzerine 25 μ l $FeCl_2$ eklenerek 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra tablanın örnek içeren her bir kuyucuğuna 100 μ l ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Belirtilen süre geçtikten sonra köre karşı 562 nm dalga boyunda ölçüm alındı (Geçibesler ve Erdoğan 2019; Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.9. Metal Şelatlama Aktivitesi

3.15. Uçucu Bileşen Analizi

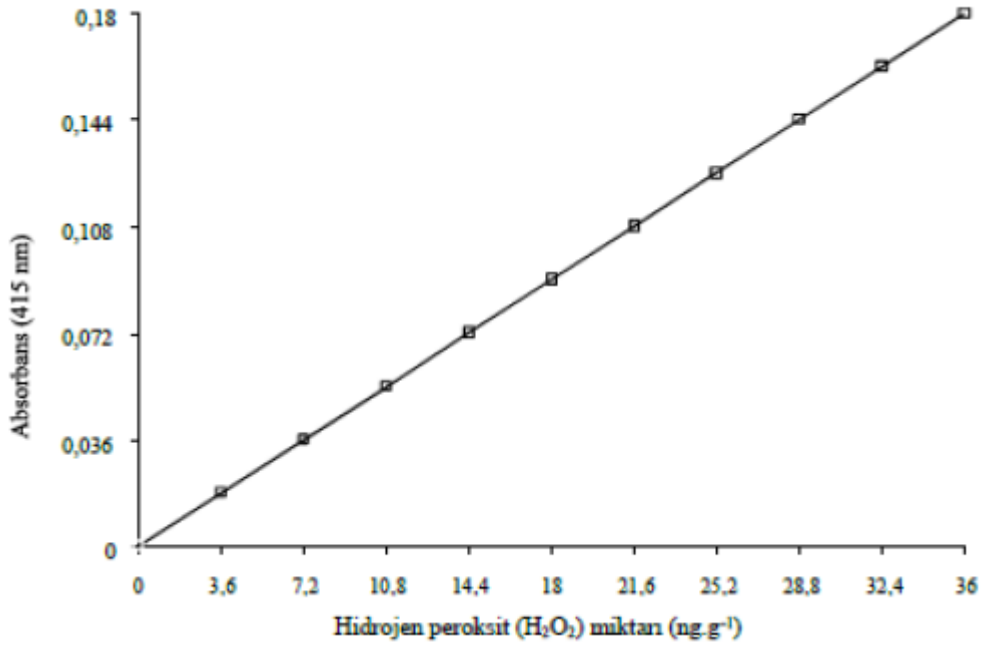
Çalışmada kullanılan bitki örneklerinin uçucu yağ profiline bakmak için kuru ve serin yerde kurutulan, öğütülmüş bitki örneklerinden 2 g alınarak Head Space yöntemi ile Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki GC-MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) cihazı kullanıldı.

3.16. Lipid Peroksidasyon Tayini

Hasat sonrası taze olarak -80°C 'de bulunan 0,5 g bitki örnekleri 5 ml TCA çözeltisi ile iyice homojenize edildi. Elde edilen bitki homojenatı $10.000\times\text{g}'de$ 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüplerin süpernatant kısmından 4 ml alınarak üzerine 1 ml %0,5 olarak hazırlanan TBA çözeltisinden eklendi. Tüplerde oluşan karışım sıcak su banyosuna alınarak 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durduruldu. Buz banyosuna alınan tüpler soğuduktan sonra $10.000\times\text{g}'de$ 10 dakika tekrardan santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin süpernatant kısmından spektrofotometre küvetine 3 ml alınarak 532 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Nonspesifik bileşenlerin eliminasyonu için 600 nm dalga boyunda da ölçüm alındı. 532 nm dalga boyunda alınan ölçüm sonuçlarından 600 nm dalga boyunda alınan ölçüm sonuçları çıkarılarak 1 ml çözeltideki MDA (malondialdehit) miktarı (nmol/g): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplandı (Esim ve Güneş 2021).

3.17. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarının Belirlenmesi

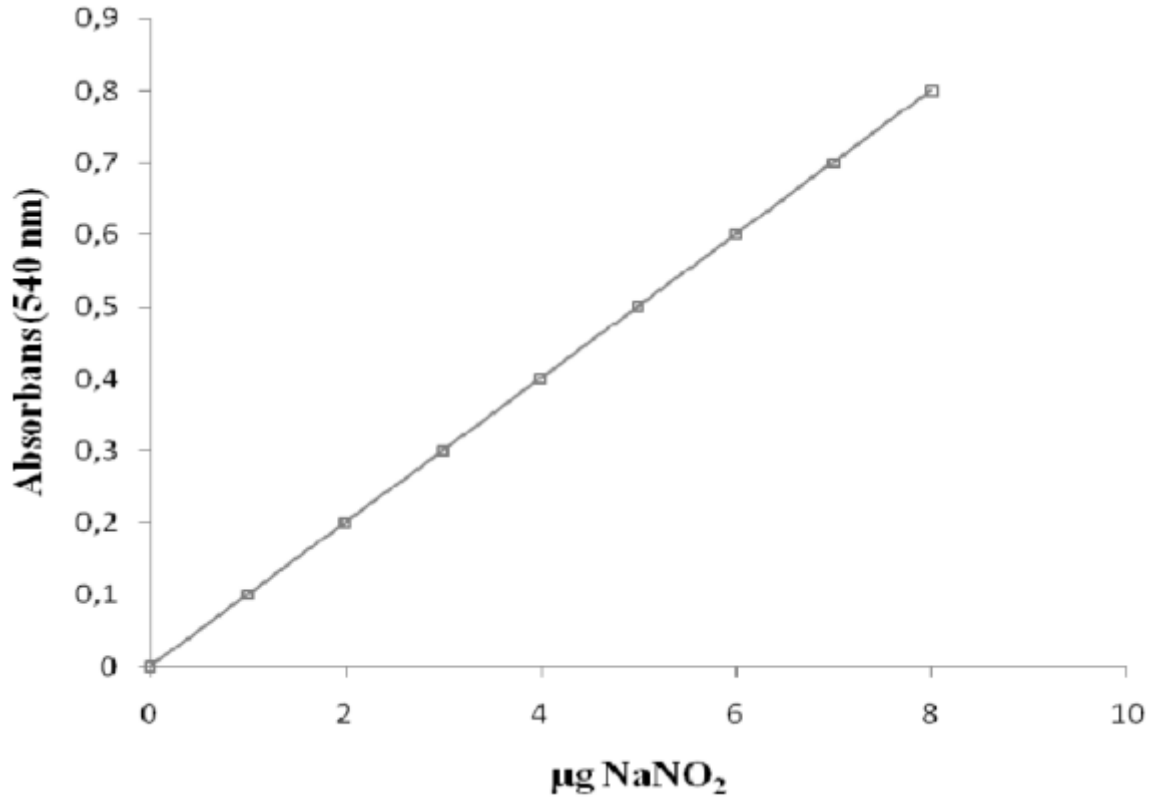
Bitki numunesinde bulunan hidrojen peroksit miktarını belirlemek amacıyla 0,5 g bitki örneği %0,1'lik TCA çözeltisi içerisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat $15.000\text{ rpm}'de$ 15 dakika santrifüj edildi. 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 10 mM pH: 7.0 KH_2PO_4 tampon çözeltisinden 800 μl alınarak üzerine 1,6 ml 1 M KI çözeltisinden eklendi. Hazırlanan bu reaksiyon karışımının üstüne son olarak santrifüj edilen bitkinin süpernatant kısmından 800 μl eklendi ve 390 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Elde edilen veriler oluşturulan H_2O_2 standart grafiğine göre nanogram cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürüldü (Esim ve Güneş 2021).



Şekil 3.10. Hidrojen Peroksit Standart Grafiği

3.18. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi

Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi amacıyla 0,5 g bitki örneği alınarak 5 ml KH₂PO₄ tamponu ile homojenize edildi. 5000×g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan 1 ml alınarak üzerine 100 µl hidroksilamin ve 900 µl fosfat tamponundan alınarak karıştırıldı. Reaksiyon tüpleri 25 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolan tüplerden 1 ml reaksiyon karışımı alınarak üzerine 1 ml aminobenzene sülfonik asit ve 1 ml 1-naftilamine eklenerek 25 °C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolan örnekler 530 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüm alındı. Oluşturulan sodyum nitrit (NaNO₂) standart grafiğine göre sonuçlar değerlendirildi (Eltner and Heupel 1976; Esim 2011).



Şekil 3.11. Süperoksit Anyonu Standart Grafiği

3.19. Enzim Ekstraksiyonunun Hazırlanması

Antioksidan enzimlerin aktivite ölçümünü yapmak için 0,5 g bitki örnekleri havan içerisinde alınarak üzerine %1 PVP, 1 mM EDTA, 0,1 M pH: 7.0 KH₂PO₄ içeren homojenat tamponundan 5 ml eklendi. Bitki örnekleri tampon içerisinde iyice homojenize edildikten sonra santrifüj tüplerine alındı. 15.000×g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant enzim aktivite tayini için kullanıldı (Angelini vd Federico 1990; Esim 2011).

3.19.1. Katalaz Enzimi Aktivite Ölçümü

Katalaz enzimi, oksidan bir molekül olan hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene parçalanmasını katalize eder. Antioksidan bir enzim olan katalaz enziminin aktivite ölçümünü yapmak için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 103.5 mM olarak hazırlanan KH₂PO₄ tamponundan 1.475 ml alındı. Üzerine 40 mM olarak hazırlanan H₂O₂

çözeltisinden 1.5 ml ve 25 µl enzim ekstraktından eklendi. 240 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında 1 dakika aralıklarla 3 dakika boyunca ölçüm alındı. Oluşturulan H₂O₂ standart grafiğine bakılarak dakika başına azalan H₂O₂ miktarı µM cinsinden kaydedildi (Esim 2011).

3.19.2. Peroksidaz Enzimi Aktivite Ölçümü

Peroksidaz enzimi aktivite ölçüm çalışmasında, substrat olarak guaikol ve H₂O₂ kullanıldı. Reaksiyon ürününün oluşturduğu renkli bileşiğin artan absorbansı 470 nm dalga boyunda ölçüldü. Enzim aktivitesini ölçmek için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine içerisinde guaikol ve H₂O₂'nin bulunduğu 0,1 M Na₂HPO₄ tamponundan 3 ml alınarak üzerine 10 µl enzim ekstraktından eklendi. Örneğin absorbansı 1 dakika aralıklarla 5 dakika boyunca ölçüldü. Absorbansı 1 dakikada 0.01 abs arttıran enzim miktarı hesaplanarak, enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar g protein başına düşen enzim ünitesi olarak verilmiştir (Ye et al. 2003; Esim 2011).

3.19.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD) Aktivite Ölçümü

Süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD) ölçüm esası, NBT (nitro blue tetrazolium)'nin süperoksit serbest radikalleri ile oluşturduğu mavi renkli formazon boyasının inhibisyonuna dayanmaktadır. SOD enzimi ortamda bulunan O₂⁻ radikallerini ortadan kaldırarak formazon reaksiyonunu inhibe eder. SOD aktivite ölçüm çalışmasında; içerisinde 50 mM KH₂PO₄, 13 mM metiyonin, 63 µM NBT ve 0,1 M EDTA içeren çözeltilerden 3 ml'lik spektrofotometre küvetine 2.58 ml alınır. Üzerine 30 µl enzim ekstraktından eklendikten sonra son olarak da küvete 390 µl riboflavin eklenir. Hazırlanan reaksiyon karışımının beyaz ışık karşısına alınmasıyla reaksiyon başlamış olur. Reaksiyon karışımını içeren tüplerin 15 dakika sonra beyaz ışık kaynağının karşısından alınmasıyla reaksiyon sonlandırılır. 15 dakika içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu kör numuneye karşı 560 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okunmuştur. Bir enzim ünitesi, NBT yoğunluğunun azalması ile % 50'lik bir azalmaya sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Agarwal and Pandey 2004; Esim 2011).

3.20. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

3.20.1. DPPH Giderme Aktivite Tayini İle İlgili Çözeltiler

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 0,0012 g DPPH tartılır ve 30 ml saf etanol içerisinde manyetik karıştırıcıda tamamen çözündürülür.

3.20.2. ABTS Giderme Aktivite Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0,1 M Na_2HPO_4 : 1,77 g Na_2HPO_4 tartılır 50 ml saf suda çözündürülür. pH: 7.4 ayarlandıktan sonra total hacim saf su ile 100 ml tamamlanır.
2. 2 mM ABTS: 0,043 g ABTS tartılır 40 ml pH: 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlanır.
3. 2,45 mM $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (potasyum persülfat) 0,026 g potasyum persülfat tartılır ve 40 ml pH: 7,4 olan fosfat tamponu içinde çözündürülür.

3.20.3. İndirgeme Gücü Aktivite Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

1. %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Potasyum ferrisiyanür) çözeltisi: 0,5 g potasyum ferrisiyanür tartılır 50 ml saf suda çözündürülür.
2. 0,2 M NaH_2PO_4 (sodyum dihidrojen fosfat) tamponu: 1.56 g sodyum dihidrojen fosfat tartılır 30 ml saf suda çözündürülür. pH: 6.6 ayarlandıktan sonra total hacim saf su ile 50 ml tamamlanır.
3. %10 'luk TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi: 5 g TCA tartıldı ve 50 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
4. %0,1'lik FeCl_3 (demir klorür) çözeltisi: 0,05 g demir klorür tartıldı ve 50 ml saf su içerisinde çözünmesi sağlandı.

3.20.4. Total Fenol İçeriği Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) %2'lik Na_2CO_3 (sodyum karbonat) : 0,2 g sodyum karbonat tartıldı 10 ml distile suda çözündürüldü.
- 2) FCR (Folin Ciocalteu Reaktifi) , satın alındığı şekliyle kullanıldı.

3.20.5. Total Flavanooid İÇeriği Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) %15'lik NaNO_2 (sodyum nitrit): 1,5 g sodyum nitrit tartılır ve 10 ml saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla tam olarak çözünmesi sağlandı.
- 2) %10'luk alüminyum klorit (AlCl_3) : 1 g alüminyum klorit tartıldı ve çeker ocakta kontrollü bir şekilde 10 ml saf su eklenerek tam olarak çözündürüldü.
- 3) %4'lük NaOH : 0,4 g NaOH tartıldı, 10 ml distile suda çözündürüldü.

3.20.6. Metal Şelatlama Aktivite Tayini İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 2 mM FeCl_2 : 0,004 g demir klorür tartıldı 10 ml saf su içerisinde çözünmesi sağlandı.
- 2) 5 mM ferrozin: 0,073 g ferrozin tartıldı ve 30 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla tam olarak çözünmesi sağlandı.

3.20.7. Lipid Peroksidasyonu Miktarının Ölçümü İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) %5'lik TCA (Trikloroasetik asit) : 2 g TCA tartıldı ve 40 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 2) %0,5'lik TBA çözeltisi: 2 g TCA tartıldı 10 ml saf su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan bu çözelti içerisine 0,05 g TBA (tiyobarbitürik asit) eklendi ve manyetik karıştırıcıda tam olarak çözünmesi sağlandı.

3.20.8. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi İÇin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 65 mM K_2HPO_4 (dipotasyum fosfat): 1,132 g dipotasyum fosfat tartıldı ve 100 ml distile suda tam olarak çözünmesi sağlandı.
- 2) 10 mM hidroksilamin hidroklorür: 0,0138 g hidroksilamin hidroklorür tartıldı ve 20 ml saf suda çözündürüldü.
- 3) 17 mM amonyum benzeno sülfonik asit: 0,1472 g amonyum benzeno sülfonik asit tartıldı 50 ml distile suda çözündürülür.
- 4) 17 mM 1-naftilamine: 0,243 g naftilamine tartıldı 10 ml asetonda çözündürüldükten sonra saf su ile total hacim 100 ml tamamlandı.

3.20.9. Enzim Ekstraksiyonu İçin Hazırlanan Kimyasal Çözeltiler

- 1) 0,1 M KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat): 0,68 g KH_2PO_4 tartıldı 25 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH:7.0 ayarlandı total hacim saf su ile 50 ml tamamlandı.
- 2) %1 PVP (Polivinilpirolidon): 0,5 g PVP tartıldı ve hazırlanan fosfat tamponu içerisine eklendi.
- 3) 1 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit): 0,019 g EDTA tartıldı ve pH:7.0 olarak hazırlanan fosfat tamponu içerisine eklenerek manyetik karıştırıcıda tamamen çözünmesi sağlandı.

3.20.10. Katalaz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 103.5 mM KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat) : 0,7 g potasyum dihidrojen fosfat tartıldı. Üzerine 25 ml distile su eklenen kimyasal çözündükten sonra pH:7.5 ayarlandı. Total hacim saf su ile 50 ml tamamlandı.
- 2) 40 mM H_2O_2 (hidrojen peroksit): 204 μl H_2O_2 alınır üzeri distile su ile 50 ml tamamlandıktan sonra manyetik karıştırıcı ile iyice karışması sağlanır.

3.20.11. Peroksidaz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 0.1 M Na_2HPO_4 (disodyum hidrojen fosfat) çözeltisi: 0,885 g Na_2HPO_4 tartılır 30 ml distile suda çözündürülür. pH:5.5'e ayarlandıktan sonra hazırlanan çözeltinin içine 27 μl guaikol ve 22,5 μl H_2O_2 eklenir. Total hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlanır.

3.20.12. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 50 mM KH_2PO_4 çözeltisi: 0,68 g potasyum dihidrojen fosfat tartıldı 75 ml saf su içerisinde çözündürüldü. pH:7.8'e ayarlandı.
- 2) 13 mM metiyonin çözeltisi: 0,194 g metiyonin tartıldı ve pH:7.8 olarak hazırlanan tampon içerisine eklendi.
- 3) 63 μM NBT (Nitro Blue Tetrazolium) çözeltisi: 0,005 g NBT tartıldı ve hazırlanan fosfat tampon içerisine eklendi.

- 4) 0,1 M EDTA çözeltisi: 0,0036 g EDTA tartıldı ve fosfat tampon içerisine eklendi. EDTA eklendikten sonra hazırlanan pH:7.8 fosfat tamponun total hacmi 100 ml tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda kimyasalların tamamen çözünmesi sağlandı.
- 5) 13 μ M Riboflavin çözeltisi: 0,48 mg riboflavin tartıldı ve 100 ml saf suda çözündürüldü.

3.20.13. H₂O₂ Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

- 1) 10 mM KH₂PO₄ çözeltisi: 0,136 g KH₂PO₄ tartıldı bir miktar saf suda çözündürüldü. pH:7.0 ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml tamamlanır.
- 2) 1 M KI (potasyum İyodür) çözeltisi: 16,6 g KI tartıldı. 100 distile suda çözündürüldü.
- 3) %0,1'lik TCA çözeltisi: 0,1 g TCA tartıldı 100 ml saf suda çözündürüldü.

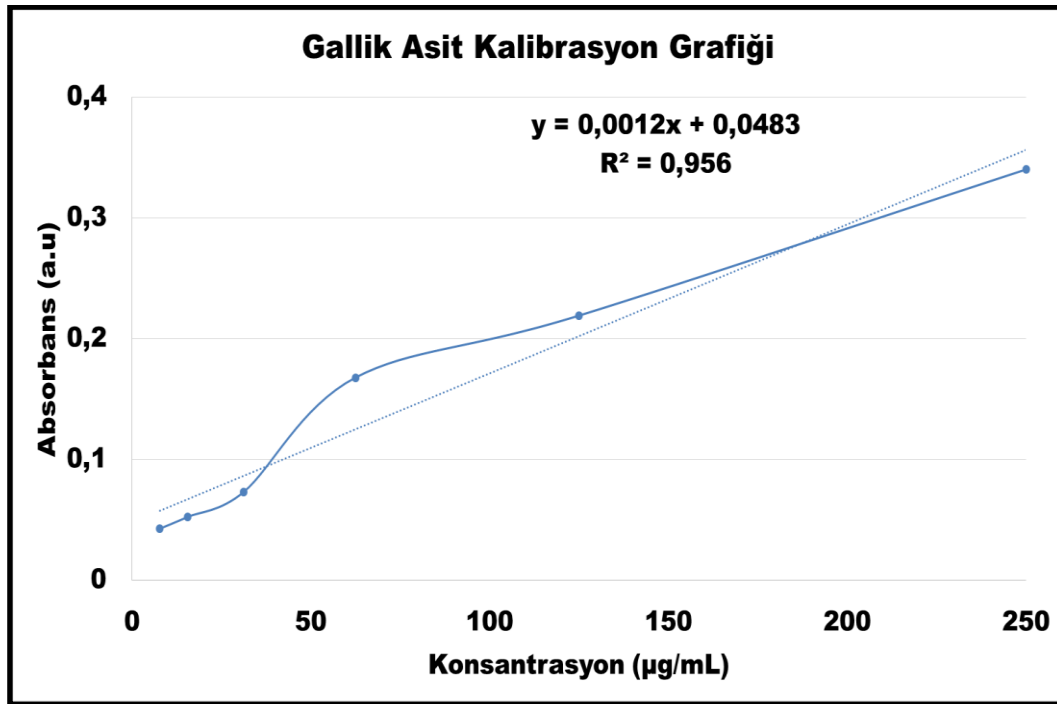
3.20.14. Çalışmada Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- 1) BHA (Bütil Hidroksi Anisol) çözeltisi: BHA çözeltisi 20 mg/20 ml olacak şekilde hazırlandı. 0,02 g BHA tartıldı. 20 ml etanol içerisinde çözündürüldü.
- 2) BHT (Bütil Hidroksi Toluen) çözeltisi: 20 mg BHT tartıldı ve 20 ml etanol içerisinde çözündürüldü.
- 3) α -tokoferol (E vitamini) çözeltisi: 20 mg e-vitamini tartıldı ve 20 ml etil alkol içerisinde çözündürüldü.
- 4) Trolox çözeltisi: 0,02 g trolox kimyasalı tartıldı ve 20 ml saf etanolde çözündürüldü.
- 5) Gallik asit çözeltisi: total fenol içeriği tayini için kullanılan gallik asit / çözücü oranı 1 mg: 1 ml olacak şekilde hazırlandı. 10 mg gallik asit tartıldı ve 10 ml saf su içerisinde çözündürüldü.
- 6) Kersetin çözeltisi: total flavanoid tayini için kullanılan kersetin çözeltisini hazırlamak için 10 mg kersetin tartıldı. 10 ml metanolde çözündürüldü.
- 7) EDTA çözeltisi: metal şelatlama aktivite ölçümünde kullanılan EDTA standart çözeltisi için 0,02 g EDTA tartıldı ve 20 ml metanolde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Fenol İçeriği Tayini

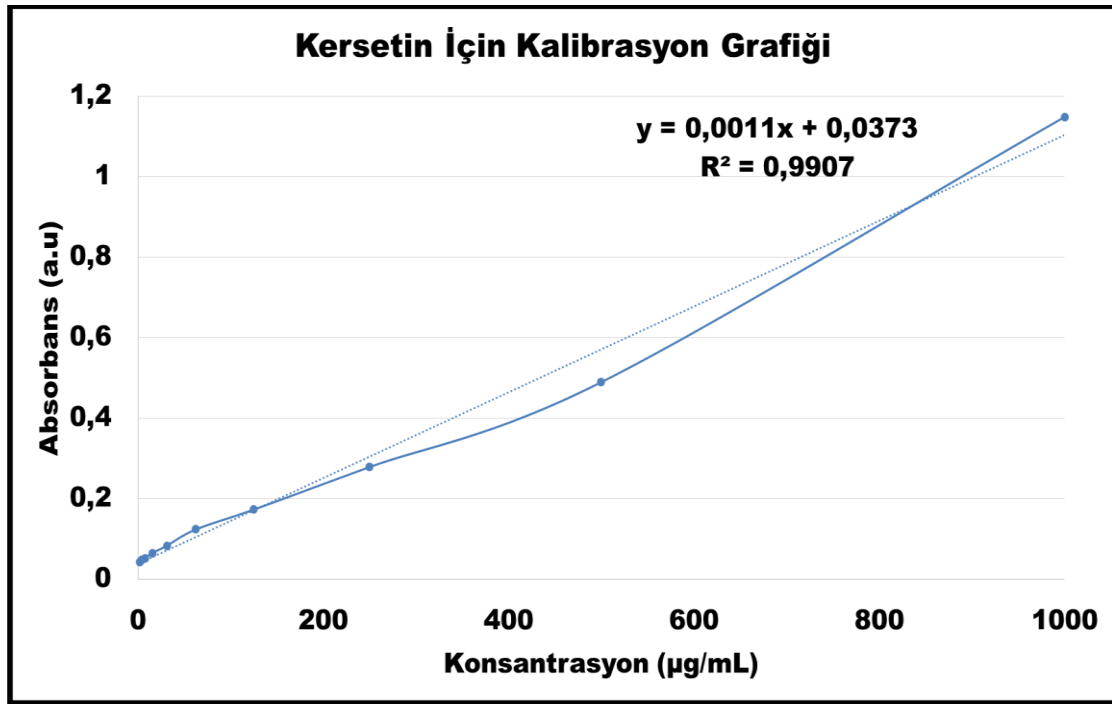
Kekik numunelerinin toplam fenol içeriği tayini mg kuru kekik izolatu örneklerindeki μg gallik asit eşdeğeri cinsinden ifade edildi (μg GAE/mg Kİ). Bunun için gallik asitin farklı konsantrasyonlardaki kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 4.1). Farklı konsantrasyonlardaki gallik asitin absorbans okumalarının grafiğe geçirilmesi ile elde edilen lineer doğru denklemi $y=0,0012x + 0,0483$ olarak bulundu.



Şekil 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Gallik Asit İçin Kalibrasyon Grafiği

4.2. Toplam Flavonoit İÇeriği Tayini

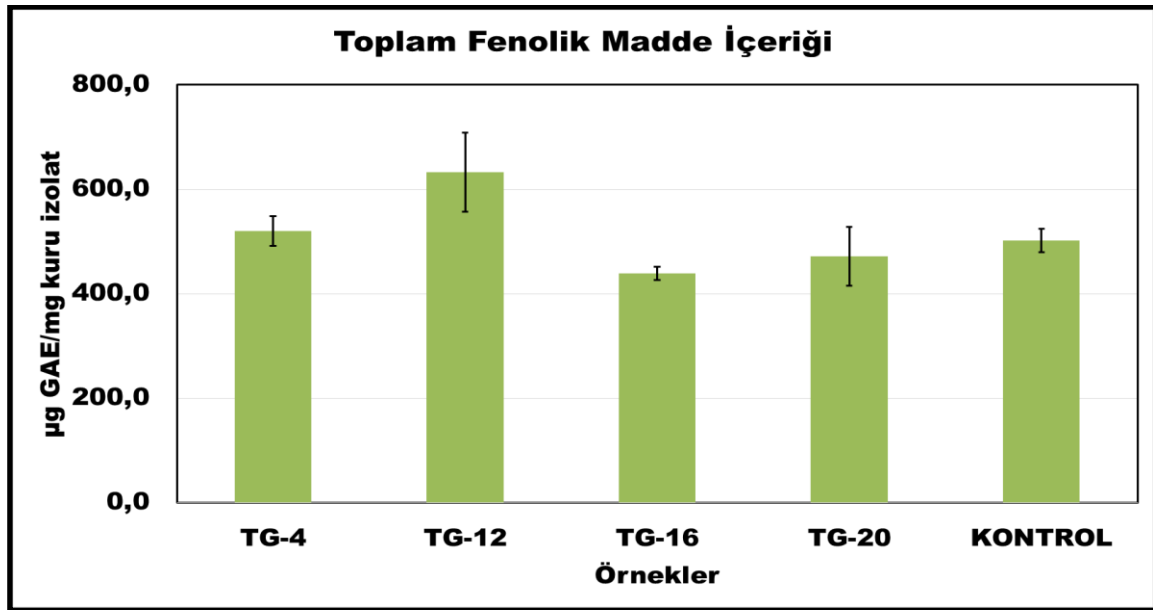
Kekik numuneleri içerisindeki toplam flavonoit içeriği kersetin standardı eşdeğeri cinsinden verildi. Bunun için öncelikle kersetinin farklı konsantrasyonları hazırlanarak linner bir doğru denklemi elde edildi. Kersetinin farklı konsantrasyondaki absorbans okumaları grafiğe geçirilmesi sonucu $y = 0,0011x + 0,0373$ olan doğru denklemi elde edildi (Şekil 4.2). Denklem kullanılarak kekik numuneleri içerisindeki flavonoit miktarları mg kuru izolat (mg Kİ) içerisinde μg kersetin eşdeğeri (μg KE) cinsinden ifade edildi.



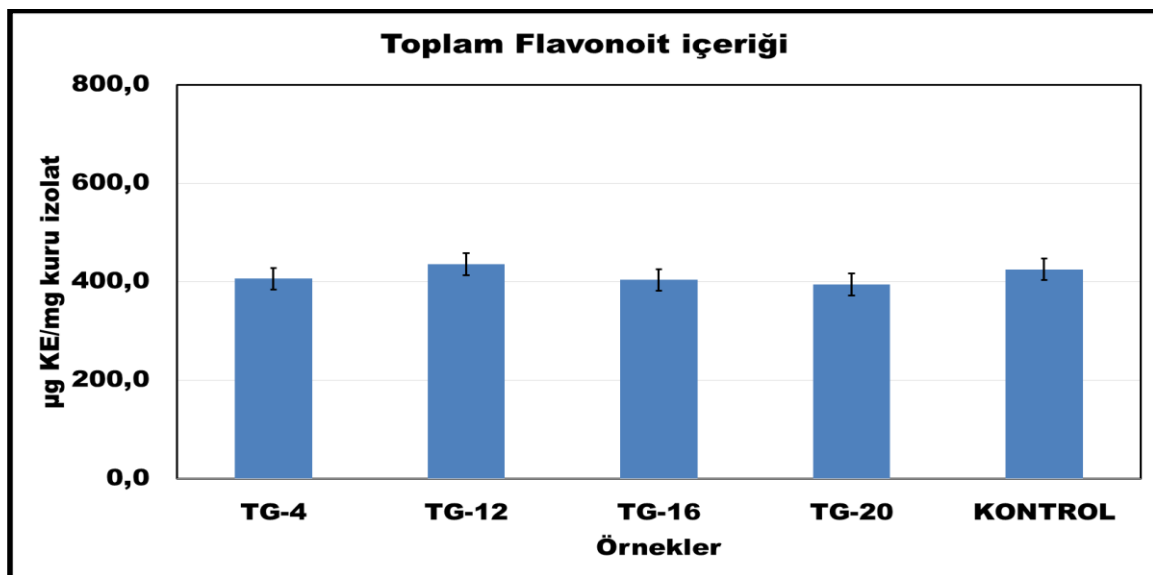
Şekil 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Kersetin İçin Kalibrasyon Grafiği

Kekik numuneleri içerisindeki toplam fenol ve flavonoit madde içerikleri spektrometrik olarak değerlendirildiğinde TG-12 numunesinin toplam fenolik madde içeriği açısından $633,1 \pm 75,6 \mu\text{g GAE/ mg Kİ}$ değeri ile en zengin örnek iken, TG-16 numunesi ise $439,0 \pm 12,7 \mu\text{g GAE/ mg Kİ}$ değeri ile en dŐŐuk fenol içeriğine sahipti (Şekil 4.3). Diğer örneklerin toplam fenol içeriği ise bŐyŐkten kŐŐĐe doğru TG-12 ($633,1 \pm 75,6$) > TG-4 ($520,0 \pm 28,3$) > KONTROL ($502,0 \pm 22,6$) > TG-20 ($471,3 \pm 56,6$) > TG-16 ($439,0 \pm 12,7$)

şeklinde olduğu tespit edildi (Tablo 4.1). Toplam flavonoit madde içeriği sonuçları karşılaştırıldığında ise, büyükten küçüğe doğru TG-12 ($435,9 \pm 16,1$) > KONTROL ($425,3 \pm 22,1$) > TG-4 ($406,2 \pm 22,8$) > TG-16 ($403,6 \pm 31,2$) > TG-20 ($394,3 \pm 55,0$) şeklinde toplam flavonoit içeriğine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Kekik Numuneleri İçindeki Fenolik Madde Dağılımları



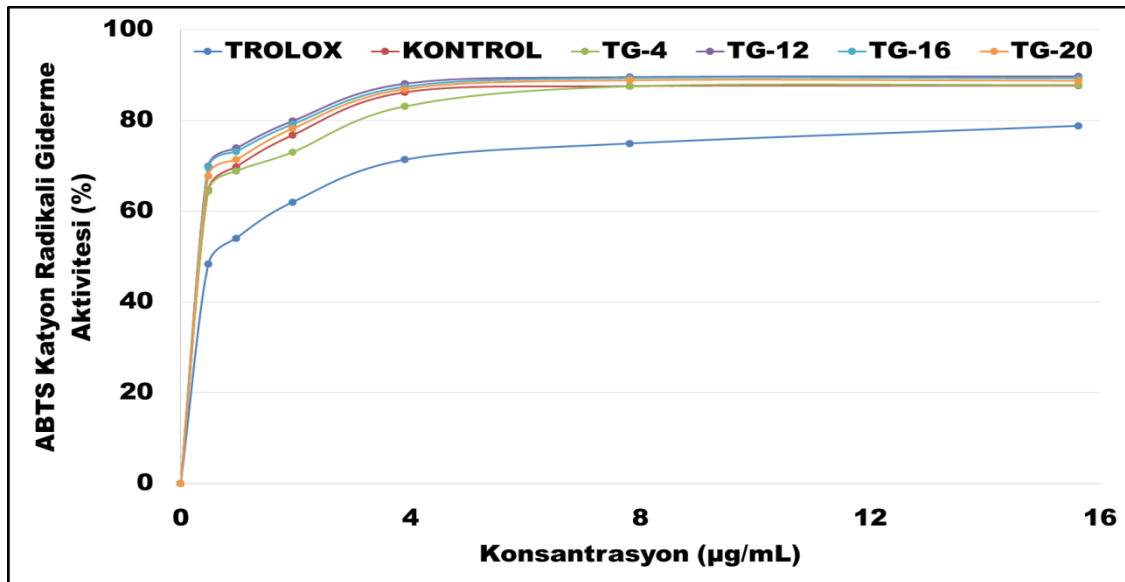
Şekil 4.4. Numuneleri İçindeki Toplam Flavanoit Dağılımları

Tablo 4.1. Kekik Numuneleri İçerisindeki Toplam Fenol ve Flavonoit Miktarları

	$\mu\text{g GAE/ mg Kİ}$	$\mu\text{g KE/ mg Kİ}$
TG-4	520,0 \pm 28,3	406,2 \pm 22,8
TG-12	633,1 \pm 75,6	435,9 \pm 16,1
TG-16	439,0 \pm 12,7	403,6 \pm 31,2
TG-20	471,3 \pm 56,6	394,3 \pm 55,0
KONTROL	502,0 \pm 22,6	425,3 \pm 22,1

4.3. ABTS Katyon Radikali Giderme Açısından Antioksidan Aktivite Oranı

Örneklerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri referans antioksidan madde troloks ile karşılaştırılarak tayin edilmiştir. ABTS katyon radikali giderme aktivitesi tayini için 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 ve 16,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralıklarında deney şartları optimize edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kekik Numunelerinin Farklı Konsantrasyonlarda ABTS Katyon Radikali Giderme Aktivitesi

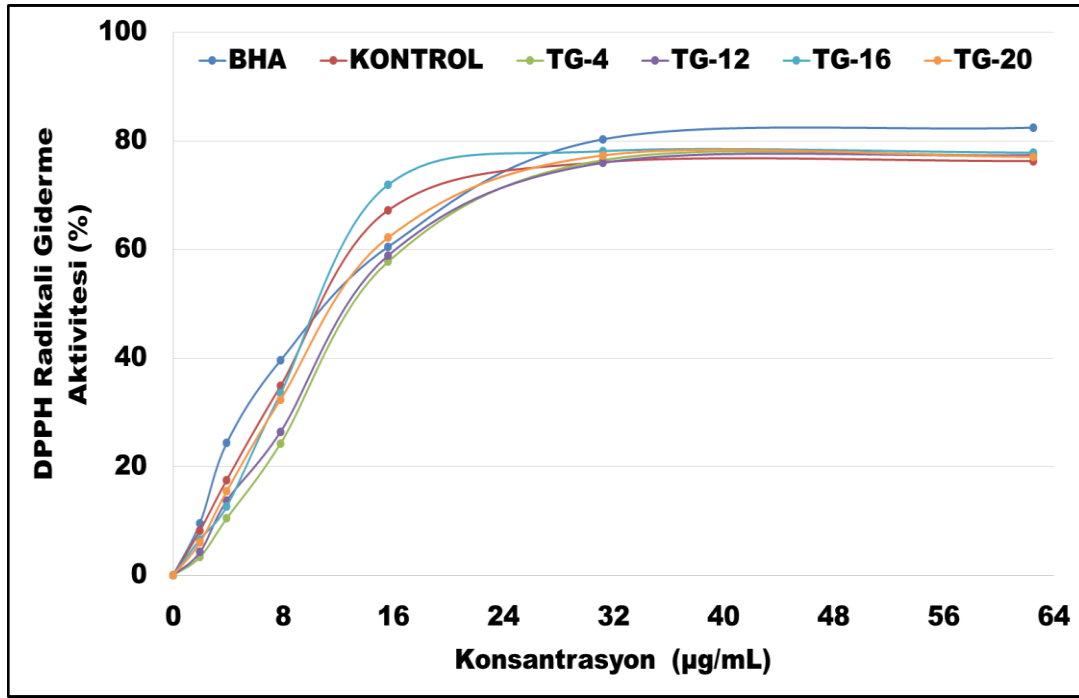
Örneklerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri kendi aralarında ve troloks standardı ile karşılaştırıldığı zaman genel olarak artan konsantrasyon ile ABTS katyon radikali giderme aktivitelerinin artan konsantrasyon ile arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.2). Kekik numunelerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri 4,0 µg/mL konsantrasyonda karşılatırıldığı zaman TG-4 numunesi en düşük aktiviteyi (% 83,1±3,6) gösterirken, TG-12 numunesi en yüksek aktivite (% 88,1±1,3) değerine ulaşmıştır. Genel olarak örneklerin ABTS katyon radikali giderme aktiviteleri troloks standardından yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 4.2. Kekik Numunelerinin Farklı Konsantrasyonlardaki ABTS Katyon Radikali Giderme Değerleri

	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	2,0 µg/mL	4,0 µg/mL	8,0 µg/mL	16,0 µg/mL
TROLOX	48,3±6,9	54,1±6,7	62,0±1,6	71,4±1,3	74,9±3,4	78,8±9,3
KONTROL	64,7±3,7	69,8±2,8	76,8±2,7	86,2±1,9	87,6±1,0	87,7±1,3
TG-4	64,5±2,8	68,9±3,4	73,0±3,6	83,1±3,6	87,5±1,1	87,9±1,0
TG-12	69,9±0,8	73,9±0,9	79,9±1,2	88,1±1,3	89,6±0,5	89,7±0,3
TG-16	69,6±1,8	73,2±2,1	79,2±3,5	87,5±0,8	89,4±0,5	89,3±0,3
TG-20	67,8±3,3	71,4±3,2	78,2±3,4	86,9±2,4	88,9±1,2	88,8±0,7

4.4. DPPH Serbest Radikali Giderme Açısından Antioksidan Aktivite Tayini

Kekik numunelerinin DPPH serbest radikali giderme aktiviteleri butillenmiş hidroksi anisol (BHA) standardı ile karşılaştırılarak 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0 ve 64,0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında optimize edilerek DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri test edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Örneklerin Farklı Konsantrasyonlardaki DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivitesi

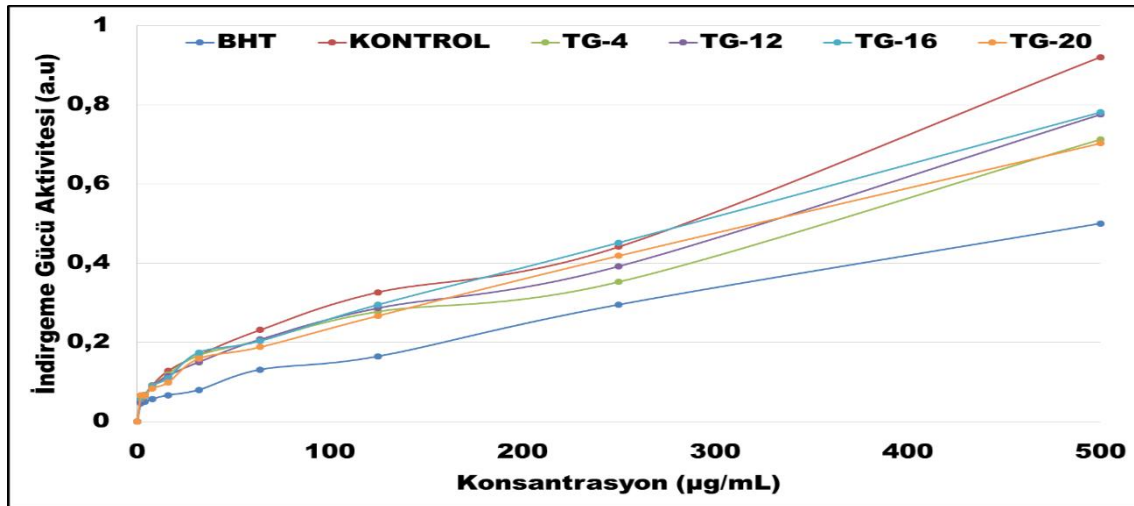
Kekik numunelerinin test edilen konsantrasyon aralıklarında DPPH radikali süpürme aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Örnekler KONTROL numunesi ile karşılaştırıldığında uygulanan mikroorganizmaların DPPH radikali süpürme etkinliğini az da olsa azalttığı gözlenmiştir (Tablo 4.3). Artan konsantrasyonlarda ise bakteri uygulamalarının kontrole göre DPPH radikali giderme aktivesinin arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kekik Numunelerinin DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivite Değerleri

	2,0 µg/mL	4,0 µg/mL	8,0 µg/mL	16,0 µg/mL	32,0 µg/mL	64,0 µg/mL
BHA	9,6±0,7	24,4±1,3	39,6±2,6	60,5±2,0	80,3±2,1	82,5±1,8
KONTROL	8,2±0,0	17,6±2,6	34,9±3,2	67,2±2,9	76,1±1,4	76,3±1,5
TG-4	3,4±0,0	10,5±1,7	24,3±2,1	57,8±3,5	76,5±0,5	77,4±1,1
TG-12	4,3±0,0	13,8±1,1	26,4±2,3	58,9±3,1	76,0±1,4	77,4±0,7
TG-16	6,7±1,3	12,7±1,5	33,5±1,0	71,9±4,1	78,1±1,0	77,8±1,2
TG-20	6,0±0,4	15,5±2,4	32,4±2,2	62,2±3,8	77,3±1,1	77,1±1,2

4.5. Ferrik İyonlarını (Fe³⁺) İndirgeme Açısından Antioksidan Kapasite Tayini

Ferrik iyonlarını indirgeme potansiyelleri bakımından örneklerin antioksidan aktiviteleri 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0, 64,0, 128,0, 250,0 ve 500,0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında test edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Örneklerin Ferrik İyonlarını İndirgeme Gücü Potansiyelleri Açısından Antioksidan Aktiviteleri

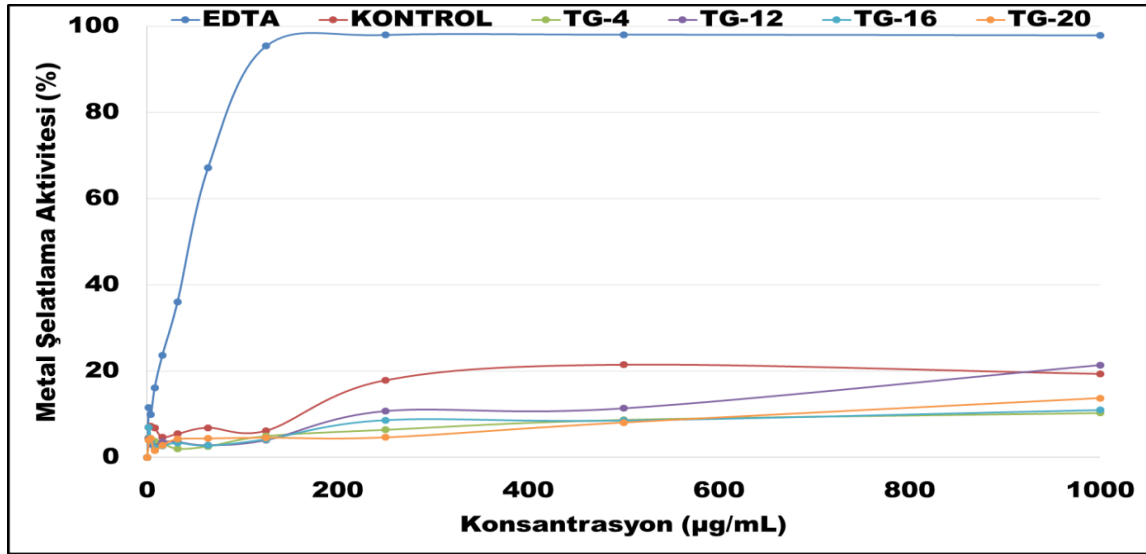
Şekil 4.7.' de görüldüğü gibi kekik numunelerinin indirgeme gücü potansiyelleri için elde edilen grafikte artan konsantrasyon ile birlikte okunan absorbans değerlerinin de lineer olarak arttığı gözlenmiştir. Artan konsantrasyon ile absorbans değerlerinin artması örneklerin Fe^{3+} iyonlarını indirgemeye bağlı olarak antioksidan potansiyellerinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4. Örneklerin Ferrik İyonlarını (Fe^{3+}) İndirgeme Gücü Aktivite Değerleri

	2	4	8	16	32	64	125	250	500
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
BHT	0,05±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01	0,07±0,01	0,08±0,00	0,13±0,01	0,16±0,01	0,30±0,04	0,50±0,11
KONTROL	0,05±0,00	0,07±0,00	0,09±0,01	0,13±0,02	0,17±0,03	0,23±0,03	0,33±0,06	0,44±0,02	0,92±0,13
TG-4	0,06±0,00	0,07±0,00	0,09±0,01	0,12±0,01	0,17±0,01	0,20±0,00	0,28±0,02	0,35±0,03	0,71±0,05
TG-12	0,05±0,00	0,06±0,00	0,09±0,00	0,11±0,01	0,15±0,01	0,21±0,01	0,29±0,01	0,39±0,04	0,78±0,12
TG-16	0,06±0,01	0,06±0,00	0,09±0,01	0,11±0,01	0,17±0,03	0,20±0,01	0,29±0,02	0,45±0,04	0,78±0,10
TG-20	0,07±0,03	0,06±0,00	0,08±0,00	0,10±0,01	0,16±0,02	0,19±0,01	0,27±0,02	0,42±0,04	0,70±0,04

4.6. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Açısından Antioksidan Aktivite Tayini

Örneklerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri 4,0, 8,0, 16,0, 32,0, 64,0, 128,0 250,0, 500,0 ve 1000,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) şelatlama ajanı ile mukayese edilerek test edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Örneklerin Farklı Konsantrasyonlarda Fe İyonlarını Şelatlama Kapasiteleri Açısından Antioksidan Aktiviteleri

Kekik numunelerinin referans şelatlama ajanı EDTA ile karşılaştırıldığında şelatlama potansiyellerinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. Örneklerin Fe²⁺ İyonu Şelatlama Kapasiteleri Açısından Antioksidan Aktivite Değerleri

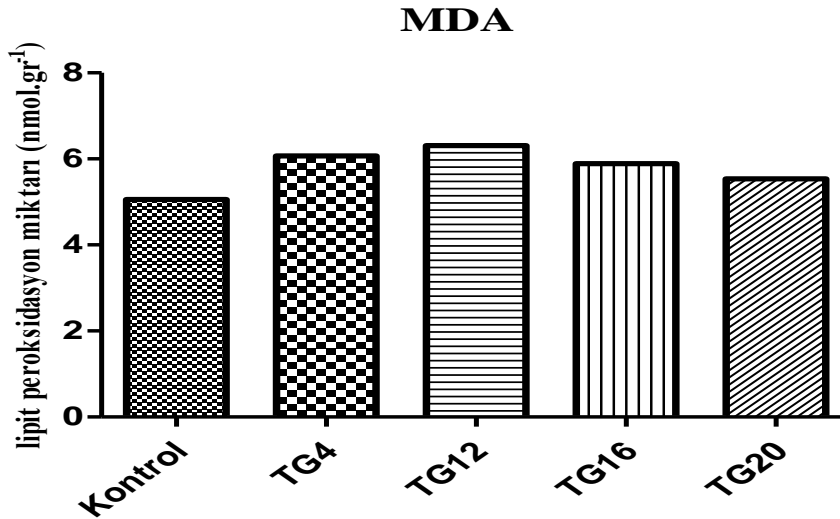
	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
EDTA	9,9±1,4	16,1±1,5	23,7±3,2	36,1±3,2	67,2±3,3	95,4±3,7	98,0±0,1	98,1±0,1	97,9±0,6
KONTROL	7,3±0,6	6,9±1,1	4,7±0,8	5,5±1,0	6,9±0,6	6,2±1,7	17,9±0,0	21,5±1,1	19,4±1,2
TG-4	4,2±0,6	3,7±0,0	3,3±0,2	2,0±0,6	2,6±0,0	5,0±1,1	6,4±1,0	8,7±2,2	10,3±1,0
TG-12	3,0±0,0	2,5±0,0	3,7±0,0	3,6±0,9	2,8±0,6	4,0±1,2	10,8±0,0	11,4±1,9	21,4±3,9
TG-16	3,7±0,0	2,3±0,0	2,7±0,0	3,4±0,1	2,8±0,6	4,2±0,9	8,7±0,0	8,6±2,0	11,0±2,5
TG-20	4,4±0,0	1,7±0,0	2,8±0,0	4,3±0,5	4,4±0,0	4,6±0,6	4,7±0,2	8,1±0,2	13,8±1,4

4.7. Lipid Peroksidasyon ve ROS Miktar Tayini

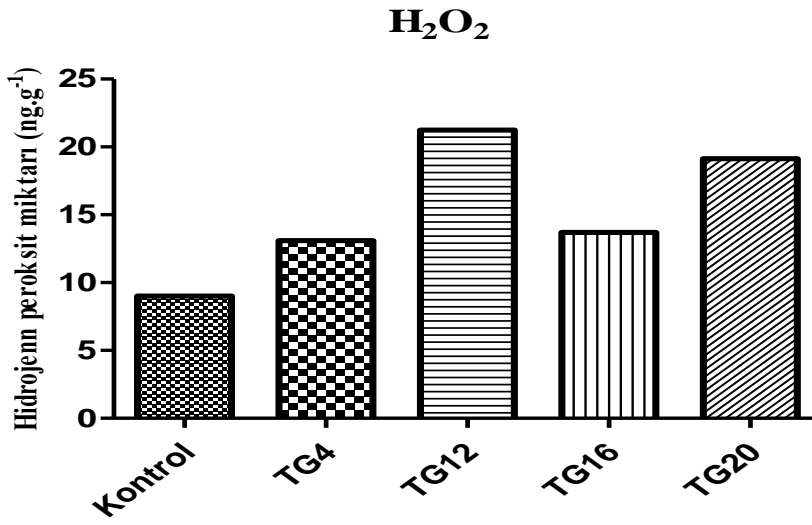
Hücre membranındaki hasarın bir göstergesi olan lipid peroksidasyon, ortamdaki malondialdehitin (MDA) ölçülmesi ile tespit edilir. Çalışmamızda kontrol grubu bitkisi ile bakteri uygulaması yapılan bitki grupları karşılaştırıldığında bakteri uygulaması yapılan tüm grupların lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Aynı şekilde bitkilerde oksidatif stresin bir göstergesi olan H_2O_2 ve O_2^- düzeylerinde de kontrol grubuna kıyasla artış söz konusu olmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamaların MDA (nmol/ml), H_2O_2 (ng/g) ve O_2^- (μ g/g) Miktarı Üzerine Etkileri. Gruplar arası fark $p < 0,05$ oranına göre değerlendirilmiştir. * Aynı sütundaki harflerin farklı olması gruplar arası farkın önemli olduğunu gösterir.

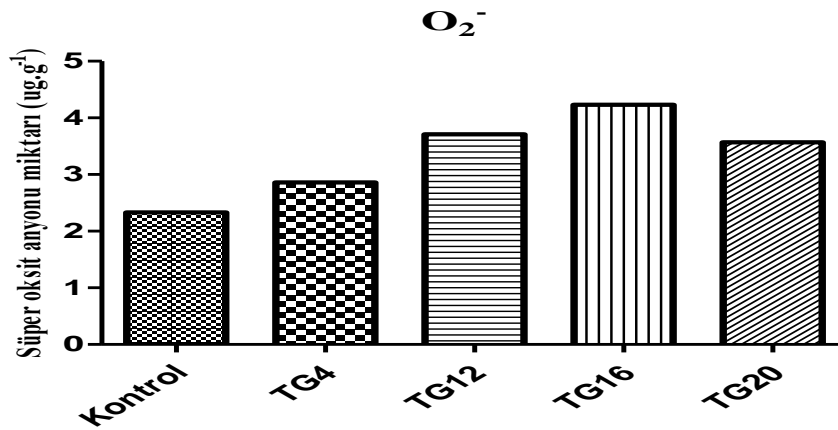
	MDA	H_2O_2	O_2^-
Kontrol	5,06 ± 0,69 d	9,02 ± 1,1d	2,33 ± 0,38 d*
TG4	6,07 ± 0,48 a	13,1 ± 1,3 c	2,86 ± 0,65 c
TG12	6,31 ± 1,58 a	21,24 ± 1,9 a	3,71 ± 0,53 b
TG16	5,89 ± 0,61 b	13,7 ± 1,2 c	4,23 ± 0,96 a
TG20	5,54 ± 0,62 c	19,14 ± 1,6 b	3,57 ± 0,72 b



Şekil 4.9. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının MDA (nmol/ml) Miktarı Üzerine Etkisi



Şekil 4.10. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının MDA (nmol/ml) Miktarı Üzerine Etkisi



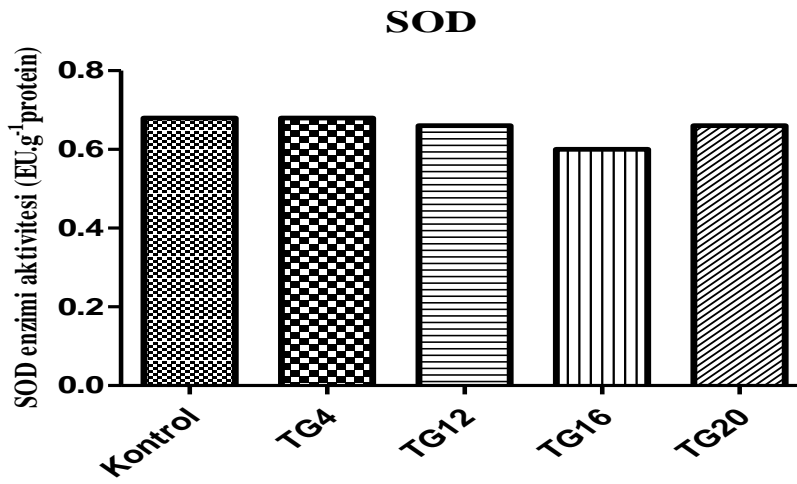
Şekil 2.10. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının MDA (nmol/ml) Miktarı Üzerine Etkisi

4.8. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

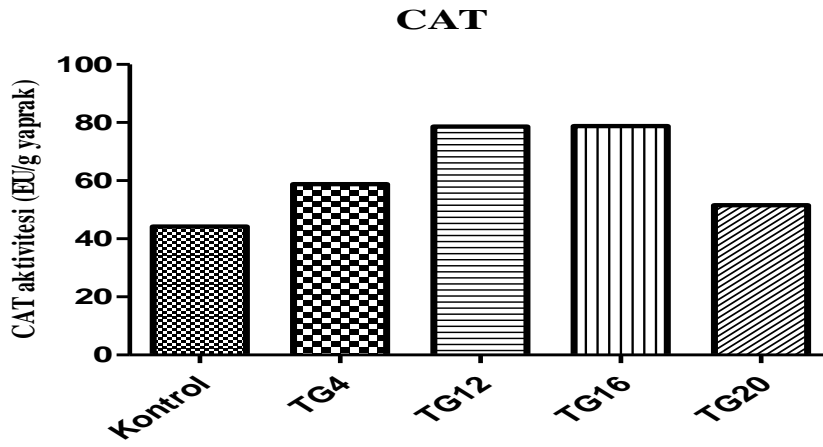
Bitkilerde artan oksidatif hasarın etkilerini en aza indirmek ya da oksidatif hasarın oluşmasını engellemek amacıyla canlıların kendi yapısında antioksidan enzimler aktivite göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgularda SOD aktivitesinde önemli bir artış gözlenmemiştir. CAT ve POD enzim aktivitelerinde ise kontrol grubuna kıyasla bazı gruplarda önemli artış olmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamaların Süperoksit dismutaz (SOD), Peroksidaz (POX) ve Katalaz (CAT) Enzim Aktiviteleri (EU/g doku) Üzerine Etkileri. Gruplar arası fark $p < 0,05$ oranına göre değerlendirilmiştir. * Aynı sütundaki harflerin farklı olması gruplar arası farkın önemli olduğunu gösterir.

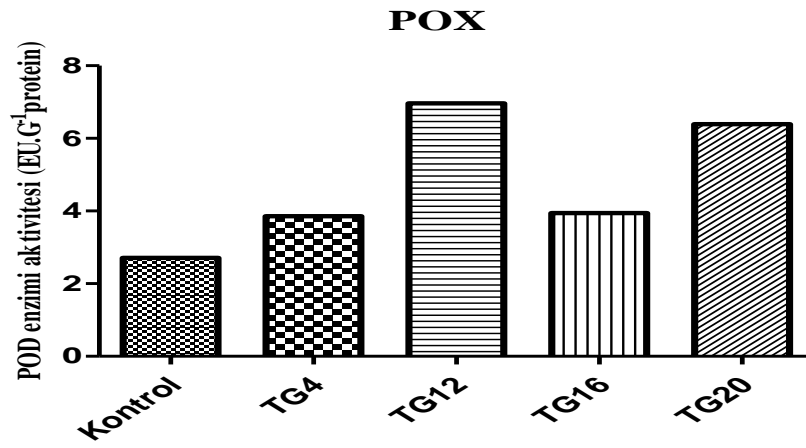
	SOD	CAT	POX
Kontrol	0,68 ± 0,03 a	44,2 ± 8,12 a	2,7 ± 0,5 c*
TG4	0,68 ± 0,11 a	58,8 ± 12,21 c	3,86 ± 0,6 b
TG12	0,66 ± 0,12 a	78,6 ± 1,64 d	6,96 ± 1,9 a
TG16	0,6 ± 0,02 a	78,8 ± 1,69 d	3,94 ± 0,8 b
TG20	0,66 ± 0,06 a	51,5 ± 11,16 b	6,39 ± 2,1 a



Şekil 4.12. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının SOD Enzim Aktivitesi (EU/g) Üzerine Etkisi



Şekil 4.13. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının CAT Enzim Aktivitesi (EU/g) Üzerine Etkisi



Şekil 4.14. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının POX Enzim Aktivitesi (EU/g) Üzerine Etkisi

4.9. Bitki Gruplarının Uçucu Bileşen Profili

Tablo 4.8. Kekik Bitkisinde Bakteri Uygulamalarının Uçucu Bileşenlerdeki Değişimler (%)

Bileşik adı	RT	Kontrol	TG-4	TG-12	TG-16	TG-20
		Miktarı (%)	Miktarı (%)	Miktarı (%)	Miktarı (%)	Miktarı (%)
1,6-oktadien	15,83	0,60	-	-	-	-
Mirsen	15,89	-	-	0,34	0,40	0,41
Alfa-terpinen	16,66	1,57	-	0,62	1,43	0,98
Bisiklo	16,89	-	-	0,14	-	-
Gamma-terpinen	17,89	18,02	17,90	17,45	18,17	15,00
p-simen	19,64	3,99	6,08	4,58	4,83	3,68
Hekzadekan	24,85	-	-	0,01	0,16	-
Dodekan	25,15	-	-	0,06	-	0,17
Heptadekan	25,18	0,66	-	-	-	1,36
Undekan	25,20	-	-	-	-	0,38
Siklohekzen	29,84	0,36	-	-	0,43	-
Oktadekan	30,67	-	-	0,13	-	-
Dokosan	30,87	-	-	-	0,68	-
Tetradekan	36,41	-	-	-	0,05	0,29
Pentadekan	36,42	-	-	-	-	0,07
Palmitoleik asit (C 14:0)	38,59	-	-	-	0,39	-
2,4-Dimetilbenzaldehit	40,56	1,46	1,56	1,89	1,56	2,01
Benzoik asit	41,14	-	-	-	0,37	0,51
Palmitik asit (C 16:0)	44,12	9,74	12,29	10,28	11,47	12,99
Fenol	46,19	12,42	21,56	21,55	13,35	18,47
Karvakrol	47,10	21,65	15,21	17,84	12,57	9,32
Stearik asit (C 18:0)	49,58	3,22	2,75	3,25	3,21	4,20
Oleik asit (omega 9)	50,13	5,64	-	2,73	6,79	7,62
Linoleik asit (Omega 6)	51,65	3,75	2,34	2,03	4,53	4,85
Linolenik asit (omega 3)	53,58	5,00	8,86	6,55	8,49	5,59
Benzamid	59,53	-	-	0,09	-	-

RT: Retention time (tahmini alıkonma zamanı).

Tablo 4.8. incelendiğinde tüm gruplarda majör bileşikler; karvakrol, gamma-terpinen, fenol, palmitik asit, oleik asit (omega 9) ve linolenik asit (omega 3) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre bakteri uygulamasında karvakrol oranının önemli derecede azaldığı buna karşın palmitik asit oranında kontrole göre önemli artışlar olmuştur. TG-20 bakteri suşunun uygulanması sonucunda karvakrol haricinde hemen hemen tüm yağ asiti içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Bakteri uygulamalarının kontrole göre bazı uçucu bileşenlerin üretimini engellediği sonucuna varılmıştır. Tüm bakteri grubunda p-cymene ve linolenik asit (omega 3) önemli derecede artış sağlamıştır.

Bitkiler buldukları çevrede çeşitli olumsuz şartlara maruz kalabilmektedir. Bu olumsuz durumlar bitkide fonksiyon kayıplarına, biyokütlede azalmaya neden olmaktadır. Bu durumu önlemek amacıyla tarımda çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu kimyasallar toprakta birikebilmekte, ekosistemin diğer elemanlarına zarar vererek besin zincirinin dengesini bozabilmektedir. Son yıllarda bilim insanları ekosisteme zararı olmayan alternatif uygulamaların peşine düşmüştür. PGPR olarak adlandırılan mikro canlıların birçok bitkide, bitkinin bulunduğu ortama adaptasyonunu kolaylaştıran, karşılaştığı olumsuz şartlarla daha kolay başa çıkmasını sağlayan, bitkinin biyokütlesinde artış sağladığı gözlemlenmiştir. Bunu çeşitli sekonder metabolit miktarlarını arttırarak ve antioksidan savunma mekanizmasını aktifleştirerek yapabilmektedirler.

Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilere olan talep artmıştır. Bu artışın sebebi bu bitkilerin içerdiği çeşitli biyoaktif moleküllerin (antioksidan, antimikrobiyal moleküller ve sekonder metabolitler) bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmasıdır. Ancak bitkilerden küçük bir miktar etken madde elde edebilmek için fazla miktarda bitkisel biyokütlenin kullanılması gerekmektedir. Bu sorunu çözüme kavuşturabilmek amacıyla bitkinin sahip olduğu etken madde miktarının arttırılması PGPR gibi alternatif ve zararsız uygulamalarla da yapılmaktadır.

Bu çalışmada 4 ayrı PGPR bakterisinin kekik bitkisinde (*Thymus vulgaris* L.) DPPH radikal süpürme aktivitesi, ABTS radikali giderme aktivitesi, total fenolik ve flavonoid bileşiklerin miktarı, metal şelatlama ve indirgeme gücü aktivitesi, ROS miktar tayini, bazı antioksidan enzim analizleri, uçucu yağ bileşen profili ve lipid peroksidasyon miktarındaki değişimler incelenmiştir. Çalışma sonuçları BHA, BHT, EDTA, Trolox,

kuarsetin ve gallik asit gibi standart kimyasallarla kıyaslanarak PGPR bakterilerinin kekik bitkisi üzerindeki etkinlik derecesi belirlenmiştir. Bu çalışmada tuza toleranslı yabancı bitkilerin kök bölgelerinden izole edilen bitki büyümesini düzenleyici bakterilerin (PGPR) kekikin (*Thymus vulgaris* L.) normal şartlarda sekonder metabolitleri ve antioksidan-oksidan süreçleri, membran hasarı üzerine etkileri, ROS mekanizması araştırılmıştır.

Bu amaç için, olası bir olumsuz duruma karşı uygulanan bakterilerin etkisinin belirlenmesi için lipid peroksidasyon (MDA miktarı) seviyesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri analiz edilmiştir. Ayrıca hücrelerdeki enzimatik antioksidan sistemdeki değişimi takip etmek için apolastik antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POX) aktiviteleri, sekonder metabolitler, antioksidan aktivite ve uçucu bileşenler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur.

Uygulanan bakteri gruplarına bakıldığında *H. dabanensis* (TG-12) bakterisinin total fenolik madde miktarını kontrol grubu ve diğer bakteri uygulamalarına oranla önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında TG-12 bakterisinin total fenolik madde miktarını %26 gibi bir oranda, *H. arcis* (TG-4) bakterisinin ise total fenolik madde miktarında %4 oranında değişime neden olduğu tespit edilmiştir. Total fenolik madde miktarını arttıran her iki bakterinin aynı cinse ait tür olmaları dikkati çekmiştir. *S. succinus* (TG-16) total fenolik madde miktarında %12 ve *K. indalinina* (TG-20) ise %6 oranında total fenolik miktarında kontrol grubuna oranla bir azalma meydana getirmiştir. Bu sonuçlara bakılarak TG-12 ve TG-4 bakterilerinin kekik bitkisinde ya doğrudan bir mekanizma ile sekonder metabolit miktarını arttırdığı ya da bitkide stres oluşturarak total fenolik madde miktarında artış sağladığı söylenebilir. Total flavonoid içeriği sonuçları incelendiğinde TG-12 bakterisinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %2'lik bir oranda artış sağladığı görülmektedir. Uygulanan TG-12 bakterisi total flavonoid madde içeriğinde bir değişikliğe neden olmazken TG-16 ve TG-20 bakteri gruplarının ise kontrol grubu bitkisine oranla total flavonoid madde içeriğinde sırasıyla %5 ve %7 oranında bir azalma meydana getirdiği gözlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında özellikle TG-12 bakterisinin flavonoid içeriğini artırması önemli bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde gerek bitkisel savunmada gerekse diğer canlılar için önemli moleküller olan bitkisel sekonder metabolitlerin (fenolik bileşikler vb.) arttırılması için *H.dabanencis* ve *H.arcis* bakterileri alternatif uygulamalar olabilir. Literatürde, kekikte belirtilen bakteri grubu uygulamaları ile ilgili bir çalışma mevcut değildir ancak *Salvia officinalis* bitkisi üzerinde *P.fluorescens* ve *P.putida* bakteri suşlarının uygulanması sonucu flavonoidler, fenolikler ve esansiyel yağlar gibi sekonder metabolitlerin üretimi önemli derecede artmıştır. Benzer şekilde kadife çiçeği bitki tohumlarına *P. fluorescens* rizobakterisi ile inoküle edilmesi sonucunda esansiyel yağ ve fenolik madde içeriğinde değişimler meydana gelmiştir (del Rosario Cappellari et al. 2013; Ghorbanpour et al. 2016). Çalışmamızın sonuçları literatür ile uygunluk göstermektedir.

Serbest radikaller kararsız moleküller oldukları için kararlı bir yapıya ulaşmak isterler. Bunun için başka moleküllerden elektron alma eğilimleri vardır. Bu durum elektronu eksilen molekülün yapısının bozulmasına dolayısıyla hücrede hasarın meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu amaçla hücreler yapılarında meydana gelen serbest radikalleri gerek kendileri gerek dışardan aldıkları antioksidan içeriği yüksek maddelerle yok etmek isterler.

Çalışmada PGPR uygulanan kekik bitki gruplarının yapay bir radikal olan ABTS katyon radikali giderme aktivitesi trolox standart antioksidan çözeltisi ile kıyaslanmıştır. Bakteri uygulanan ve uygulanmayan kekik numunelerinde trolox standart antioksidanından daha yüksek bir aktivite tespit edilmiştir. 0,5-16,0 µg/ml konsantrasyon aralıklarında yapılan çalışmada artan konsantrasyonun ABTS katyon radikali giderme aktivitesini genel olarak arttırdığı görülmüştür. Grupların ABTS katyon radikali giderme aktivitesi 4 µg/ml konsantrasyonda karşılaştırıldığında trolox %71,4±1,3 etkili iken TG-4 bakteri uygulaması gruplar arasında %83,1±3,6 en düşük ve TG-12 bakteri uygulanan bitki grubu ise %88,1±1,3 ile en yüksek etkinliğe sahiptir. TG-12 bakterisi total fenolik ve flavonoid madde miktarında da artış sağlamıştır. ABTS katyon radikali giderme aktivitesinde sağladığı artış da sonuçların tutarlılığını göstermektedir. Dolayısıyla bu bakterinin antioksidan madde miktarında artışı sağladığı söylenebilmektedir.

DPPH hücre bütünlüğüne zarar veren sentetik bir serbest radikaldir. Bu çalışmada DPPH giderme aktivite tayini 2,0-64,0 µg/ml konsantrasyon aralıklarında çalışılmıştır. Yapılan çalışmada mikroorganizma uygulanan bitki gruplarının hepsinin antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Artan konsantrasyonla DPPH giderme aktivitesi artmıştır. Fakat DPPH süpürme aktivitesinin kontrol grubuna oranla uygulama gruplarında 2,0-16,0 µg/ml konsantrasyon aralığında azalma 32,0 ve 64,0 µg/ml konsantrasyonlarda ise kontrol grubuna yakın etki gösterdiği görülmüştür. Bu durum mikroorganizmaların bitkinin DPPH giderme aktivitesi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Bitkiler demir elementini Fe^{+2} formunda kullanabilirler. Buna rağmen demir doğada Fe^{+3} formunda bulunmaktadır. İndirgeme gücü çalışmasında demirin +3 formundan +2 formuna indirgenmesinin tayini amaçlanmıştır. Çalışmamızda uygulanan PGPR bakterilerinin kekik bitkisinde demir iyonları indirgeme aktivitesini ne kadar etkilediğini tayin etmek amacıyla bitki ekstraktlarının 2,0-500,0 µg/ml konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. Verilere bakıldığında kontrol grubu ve bakteri uygulanan bitki grupları, standart antioksidan olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkinlik göstermiştir. Artan konsantrasyon ile birlikte bütün uygulama gruplarında artan bir indirgeme gücü sözkonusu olmuştur. Bu da artan konsantrasyonun antioksidan kapasiteyi arttırdığının göstergesidir. İndirgeme gücü aktivitesinde kontrol grubu diğer gruplara oranla az da olsa daha etkili sonuç vermiştir.

Demir, canlıların yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için elzem olan birçok biyolojik olayda rol alır. Bunun için ekosistemi oluşturan bütün canlılarda demirin kullanılabilir forma dönüştürülmesi ve bağlanarak canlı yapısına katılması gerekmektedir. Bu çalışmada bazı bakteri gruplarının kekik bitkisinde şelatlama aktivitesini ne kadar değiştirdiği çalışılmıştır. Standart şelatlama ajanı olarak EDTA kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar EDTA ile karşılaştırılmıştır. 4,0- 1000,0 µg/ml konsantrasyon aralığında bitki ekstraktları kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında hem kontrol grubunda hem de bakteri uygulanan bitki gruplarında EDTA'ya kıyasla çok az etkinlik olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve uygulama grupları arasında önemli bir fark olmamıştır.

Çalışmamızda lipit peroksidasyonunun bir indikatörü olan MDA miktarı kontrol grubuna oranla TG-4 bakterisinde %20, TG-12 bakteri uygulamasında %24, TG-16 bakteri uygulamasında %16 ve TG-20 bakteri uygulamasında ise %9 oranında bir artışa neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ anlam derecesine göre önem arz etmektedir. Özellikle stres şartlarında üretilen aşırı ROS'ların hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerinde yıkıma (LPO) neden olduğu ve bunun bir indikatörü olan malondialdehid (MDA) üretiminin yükseldiği ile ilgili literatürde çalışmalar bulunmaktadır (Baran 2011; Yıldıztuğay 2011). Bu çalışmada da normal şartlarda kekik toprak bölgesine uygulanan 4 farklı bakteri suşunun MDA seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir (Tablo 4.6 ve Şekil 4.9). Bu durum başlangıçta bu bakterilerin strese neden olduğu anlamına gelebilir. Ancak literatürde aynı suşlarla yapılan çalışmada ise özellikle tuz stresi altındaki mısır bitkisinin uygulanan bakterilerin MDA oranını önemli oranda azalttığı belirtilmektedir (Aydın 2016). Çalışmada kullanılan bakteriler halotolerant özelliğine sahip olduğundan yaşayabildikleri en optimum ortam tuz seviyesinin normalden fazla olduğu ortamlardır. Mevcut çalışmada ise normal çevre ortamına (tuz fazlalığı olmayan) ekilen bakteriler 5 gün boyunca kekik bitkisinin bulunduğu ortamda bulunmuştur. Dolayısıyla ilgili bakteriler için uygun ortam olmaması bu bakterilerin etkinliğini tam gösterememesine neden olmuş olabilir.. Benzer şekilde başka bir bakteri suşu ile yapılan bir çalışmada; ağır metal stresi altındaki mısır da, *Proteus mirabilis* türü bakteri inokülasyonu yapılmıştır. Tek başına bakteri uygulaması normal şartlarda yetiştirilen kontrolüne göre MDA miktarında bir etki yapamazken, bakteri+metal stresi uygulaması tek başına metal stresi uygulanmış kontrolüne göre MDA miktarında önemli azalmalara neden olmuştur (İslam et al. 2014). Mevcut çalışmada da stres uygulanırsa ilgili bakterilerin MDA seviyesini düşürme potansiyeli yüksekti. Katalaz enziminin substratı olan hidrejen peroksit düzeyleri kontrol grubuna oranla TG-4, TG-12, TG-16 ve TG-20 bakteri uygulaması yapılan bitki gruplarında sırasıyla %45, 135, 51 ve 112 oranlarında artışa neden olmuştur. Süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülen, en aktif serbest radikal olan süperoksit anyon düzeyleri de MDA ve hidrojen peroksit düzeyleri ile paralel bir şekilde artış göstermiştir. Bu radikal düzeyleri de TG-4, TG-12, TG-16 ve TG-20 bakteri uygulamalarında sırasıyla %22, 59, 81 ve 53 düzeylerinde artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve POD aktivitelerine bakılmıştır. SOD enzimi düzeyi kontrol grubuna oranla hiçbir uygulama grubunda önemli bir düzeyde değişkenlik göstermemiştir. SOD enziminin substratı olan süperoksit anyonundaki artış SOD aktivitesinde bir artış sağlamamıştır.

Katalaz enzim aktivitesi TG-4, 12, 16 ve 20 bakterilerinde sırasıyla %33, 77, 78 ve 16 oranlarında artış göstermiştir. Substratı olan hidrojen peroksit miktarındaki artış elde edilen sonuçlarla tutarlıdır.

Peroksidaz enzim aktivitesi substratı olan hidrojen peroksit düzeyleri ile orantılı bir şekilde artış göstermiştir. TG-4, TG-12, TG-16 ve TG-20 uygulama gruplarında sırasıyla %42, 156, 45 ve 135 oranlarında artış gözlenmiştir.

Önemli ROS üyelerinden olan H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ seviyelerinin aşırı artması, bitkileri olumsuz etkileyen bir ortamın (stres faktörleri) olduğunu göstergesi olabilir. Oluşan stres faktörleriyle mücadele için bitkiler hücresel seviyede aşırı ROS oluşumunu durdurmak veya süpürmek için enzimatik (CAT, POX, SOD, APX, GR) ve enzimatik olmayan (tokoferol, Askorbik asit, GSH vb.) antioksidanlar ile cevap mekanizması oluştururlar. Hücrelerde aşırı H_2O_2 'i süpüren ve oksidatif hasarı azaltmak için görev yapan önemli enzimlerden birisi katalaz (CAT)'dır. Stres altındaki patatesten (Rahnama and Ebrahimzadeh 2005) CAT enzim aktivitesinin arttığı, semizotunda ise azaldığı (Yazıcı et al. 2007) belirtilmiştir. Benzer şekilde tuz stresi altındaki mısır bitkisine uygulanan *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii* ve mevcut çalışmada kullanılan bakteri suşları CAT ve POX aktivitelerini artırmıştır. Mevcut çalışmada da kekik kök bölgesine uygulanan bakteriler hem CAT hem de POX aktivitelerini artırması literatür ile iyi bir uyum göstermiştir.

$O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen SOD, oksidatif strese karşı oluşan ilk cevap mekanizmalarından birisidir Ağır metal stresine maruz kalan buğdaya uygulanan *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi SOD aktivitesinde önemli değişimlere neden olmuştur (İslam et al. 2014). Tuz stresi altındaki mısır bitkisine uygulanan TG-4, TG-8- TG-12 ve TG-20 bakteri suşları SOD aktivitelerini artırmıştır. Ancak mevcut çalışmada uygulanan bakteriler $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 seviyelerini artırmış SOD aktivitesini ise düşürmüştür. Bu durumun en büyük nedeni kekik kök ortamında bu halotolerant bakterilerin uygun büyüme ortamı olmamasından dolayı etki gösterememesi olabilir. Muhtemeldir ki kekik kök bölgesinde tuz oranı fazla olsaydı bu bakteriler için uygun yaşam olduğu için asıl etkilerini o zaman gösterebilirlerdi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan halotolerant özelliğindeki bakteriler kekik bitkisinin sekonder metabolit içeriğinde artışa neden olmuştur. Uygulanan bakteri suşları özellikle MDA, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin kısmi bir artışa neden olması kekikte oksidatif bir hasara neden olmuş olabilir. Uygulanan bakterilerin antioksidan enzimlerden CAT ve POD'un aktivitelerini artırması önemli bir sonuçtur. Uygulanan bakteriler özellikle ABTS radikali süpürme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve indirme gücünü artırması antioksidan mekanizmayı artırdığının bir göstergesi olabilir. Uygulanan bakterilerin uçucu bileşenlerin bazılarının miktarını artırması bitkinin biyolojik aktivitelerini değiştirebilir. Çalışma normal koşullardan ziyade özellikle tuz stresi altındaki kekik bitkisine uygulanması halotolerant özellikleri olan bakterilerin etkisini daha net ortaya çıkarmaya neden olabilirdi. İlgili bakterilerin tıbbi ve aromatik özelliğine sahip bitkilerde stres şartlarında etkinliğini göstermek için farklı çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

Acıbuca V, Budak DB (2018) Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi 33(1): 37-44

Agarwal S, Pandey V (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologina Plantarum* 48(4): 555–560

Albishi T, John JA, Al-Khalifa AS, Shahidi F (2013) Antioxidant, Anti-Inflammatory and DNA Scission Inhibitory Activities of Phenolic Compounds in Selected Onion and Potato Varieties. *Journal Of Functional Foods* 5(2): 930-939

Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J Plant Physiol* 159: 685–693

Arslan N, Baydar H, Kızıl S, Karık Ü, Şekeroğlu N, Gümüşçü A (2015) Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi p. 12-16

Asghari B, Khademian R, Sedaghati B (2020) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Confer Drought Resistance and Stimulate Biosynthesis of Secondary Metabolites in Pennyroyal (*Mentha Pulegium* L.) Under Water Shortage Condition. *Scientia Horticulturae* 263: 109-132

Aydın İ (2016) Halofitik Bitkilerin Rizosferinden İzole Edilen Halotolerant Bakteriler Kullanılarak Mısırdaki (*Zea mays* L.) Tuz Stres Toleransının Arttırılması Doktora Tezi Atatürk Üniversitesi Erzurum

Bakır Ö (2020) Sekonder Metabolitler ve Rollerini. Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi 2(4): 39-45

Baser K, Özek T, Kürkçüoğlu M, Tümen G (1994) The Essential Oil of *Origanum Vulgare* Subsp. *Hirtum* Of Turkish Origin. *Journal of Essential Oil Research* 6(1): 31-36

Bast A, Haenen GR, Doelman CJ (1991) Oxidants and Antioxidants: State Of The Art. *The American Journal of Medicine* 91(3): 2-13

Başer K (1998) Tıbbi ve Aromatik Yabancı Bitkilerimiz Tehdit Altında Mı?. *Tema Vakfı Faaliyet Dergisi* s. 44-47

Benidire L, Madline A, Pereira S, Castro P, Boularbah A (2021) Synergistic Effect of Organo-Mineral Amendments and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on The Establishment of Vegetation Cover and Amelioration of Mine Tailings. *Chemosphere* 262: 127803

Bøckman O (1997) Fertilizers and Biological Nitrogen Fixation As Sources Of Plant Nutrients: Perspectives For Future Agriculture. *Plant and Soil* 194(1): 11-14

Bohn T (2014) Dietary Factors Affecting Polyphenol Bioavailability. *Nutrition Reviews* 72(7): 429-452

Bozdemir Ç (2019) Türkiye’de Yetişen Kekik Türleri, Ekonomik Önemi ve Kullanım Alanları. *Turkish Bulletin Of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi 29(3): 583-594

Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y (2000) Recent Advances in The Use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Agriculture. *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry* p. 229-250

Chiappero J, Del Rosario Cappellari L, Alderete LGS, Palermo TB, Banchio E (2019) Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improve The Antioxidant Status in Mentha Piperita Grown Under Drought Stress Leading To an Enhancement of Plant Growth and Total Phenolic Content. *Industrial Crops and Products* 139: 111553

Davis PH (1970) *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol. 3 pp. 645

De Vleeschauwer D, Höfte M (2009) Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Advances in Botanical Research* 51: 223-281

Del Rosario Cappellari L, Santoro MV, Nieves F, Giordano W, Banchio E (2013) Increase Of Secondary Metabolite Content in Marigold By Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 70: 16-22

Desoky ES M, Saad AM, El-Saadony MT, Merwad AR M, Rady MM (2020) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Improvement in Antioxidant Defense System and Suppression Of Oxidative Stress For Alleviating Salinity Stress in Triticum Aestivum (L.) Plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 30: 101878

Devasagayam T, Tilak, J, Bloor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R (2004) Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Japi* 52(4): 794-804

Diplock A (1998) *Healty Lifestyles Nutrition and Physical Activity: Antioxidant Nutrients*. ILSI Europe Concise Monograph Series 59: Belgium

Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM (2003) Pathogen Self-Defense: Mechanisms To Counteract Microbial Antagonism. *Annual Review Of Phytopathology* 41(1): 501-538

Elstner EF, Heupel A (1976) Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta* 130: 175–180

Erdoğan M (2012) *Tanacetum Balsamita* L. Subsp. *Balsamita* Bitki Ekstrelerinin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Bingöl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 79

Esim N (2011) Nitrik Oksidin Mısırdaki (*Zea Mays*) Düşük Sıcaklık Stresi Toleransı Üzerine Etkisi [Phd] Atatürk Üniversitesi Erzurum

Esim N, Güneş H (2021) Effects of Drought and Salinity on Antioxidant Mechanisms and Secondary Metabolites in Anise (*Pimpinella anisum* L.) Leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 68(4): 708-717

Etesami H, Maheshwari DK (2018) Use Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR's) With Multiple Plant Growth Promoting Traits in Stress Agriculture: Action Mechanisms and Future Prospects. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 156: 225-246

Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-879

Fatnassi IC, Chiboub M, Saadani O, Jebara M, Jebara SH (2015) Impact Of Dual Inoculation with Rhizobium and PGPR on Growth and Antioxidant Status of *Vicia Faba* L. Under Copper Stress. *Comptes Rendus Biologies* 338(4): 241-254

Galambosi B, Rey C, Vouillamoz J (2009) Suitability of Swiss Herb Cultivars Under Finnish Climatic Conditions. Paper Presented At The Iv International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants-Isbmap2009 860 pp.173-180

Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I (2003) Different Responses Of Tobacco Antioxidant Enzymes to Light and Chilling Stress. *Journal of Plant Physiology* 160(5): 509-515

Gecibesler IH, Erdogan M (2019) A new nutraceutical resource from a rare native Plant growing in Turkey and for its spectro-chemical and biological insights: Endemic *Diplotaenia bingolensis* (Apiaceae). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223: 117-358

Ghorbanpour M, Hatami M, Kariman K, Abbaszadeh Dahaji P (2016) Phytochemical Variations and Enhanced Efficiency of Antioxidant and Antimicrobial Ingredients in *Salvia Officinalis* As Inoculated with Different Rhizobacteria. *Chemistry & Biodiversity* 13(3): 319-330

Glick BR (1995) The Enhancement Of Plant Growth By Free-Living Bacteria. *Canadian Journal Of Microbiology* 41(2): 109-117

Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion Of Plant Growth By Acc Deaminase-Producing Soil Bacteria. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research* 329-339

Haas D, D efago G (2005) Biological Control Of Soil-Borne Pathogens By Fluorescent Pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3(4): 307-319

Halliwell B, Gutteridge JM (1985) The Importance Of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases. *Molecular Aspects Of Medicine* 8(2): 89-193

He Y, Liu Y, Cao W, Huai M, Xu B, Huang B (2005) Effects of Salicylic Acid on Heat Tolerance Associated with Antioxidant Metabolism. *Crop Sci* 45: 988–995

He A, Niu S, Yang D, Ren W, Zhao L, Sun Y, Zhang J (2021) Two Pgpr Strains From The Rhizosphere Of Haloxylon Ammodendron Promoted Growth and Enhanced Drought Tolerance Of Ryegrass. *Plant Physiology And Biochemistry* 161: 74-85

Heywood V (1978) *Flowering Plants of the World*, Oxford Üniv. Press, London, p. 239

İbadova S (2006) Bazı Hypericum Türlerinin Fenolik Bileşimi ile Antioksidan ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi*

İlisulu K (1992) İlaç Ve Baharat Bitkileri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1256: 1-6

İlkimen H, Gülbandılar A (2018) Lavanta, Ada  ayı, Kekik ve Papatya Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 48(4): 241-246

İmriz G,  zdemir F, Topal İ, Ercan B, Taş M, Yakışır E, Okur O (2014) Bitkisel  retimde Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteri (PGPR)'ler ve Etki Mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 12(2): 1-19

Islam F, Yasmeen T, Ali Q, Ali S, Arif MS, Hussain S, Rizvi H (2014) Influence Of Pseudomonas Aeruginosa As PGPR On Oxidative Stress Tolerance in Wheat Under Zn Stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 285-293

Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H (2003) How Can Increased Use of Biological N₂ Fixation in Agriculture Benefit The Environment? *Plant And Soil* 252(1): 177-186

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja, K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 3954-3962

Kar Y (2008)  rekotu (Nigella Sativa L.) Tohumunun Doğal Antioksidan ve Alternatif Enerji Kaynağı Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, S. . Fen Bilimleri Enstitüsü Konya

Karabulut H, Gülay MŞ (2016) Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University* 1(1): 65-76

Kartal M, Erdem S (2012) Bitkisel Ürünlerde Dünya Pazarı ve Türkiye. *Mised, Türk Eczacıları Birliği Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi* s. 27-28

Kasnak C, Palamutoğlu R (2015) Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 3(5): 226-234

Kaur C, Kapoor HC (2002) Anti-Oxidant Activity and Total Phenolic Content Of Some Asian Vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* 37(2): 153-161

Kaur S, Mondal P (2014) Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. *J Microbiol Exp* 1(1): 00005

Ke T, Guo G, Liu J, Zhang C, Tao Y, Wang P, Chen L (2021) Improvement of The Cu and Cd Phytostabilization Efficiency of Perennial Ryegrass Through The Inoculation of Three Metal-Resistant PGPR Strains. *Environmental Pollution* 271: 116-314

Khan A, Ali L, Chaudhary HJ, Munis MFH, Bano A, Masood S (2016) *Bacillus Pumilus* Alleviates Boron Toxicity in Tomato (*Lycopersicum Esculentum* L.) Due To Enhanced Antioxidant Enzymatic Activity. *Scientia Horticulturae* 200: 178-185

Khanna K, Jamwal VL, Sharma A, Gandhi SG, Ohri P, Bhardwaj R, Ahmad P (2019) Supplementation With Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Alleviates Cadmium Toxicity in *Solanum Lycopersicum* By Modulating The Expression of Secondary Metabolites. *Chemosphere* 230: 628-639

Kıralan M, Ercöşkun H, Işıksal S (2004) Gıda Antioksidanları ve Etki Mekanizmaları. *Akademik Gıda* 2: 5-14

Kireççi OA (2018) Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 7(2): 473-483

Kohler J, Hernández JA, Caravaca F, Roldán A (2009) Induction of Antioxidant Enzymes is Involved in The Greater Effectiveness of A PGPR Versus Am Fungi with Respect To Increasing The Tolerance of Lettuce To Severe Salt Stress. *Environmental and Experimental Botany* 65(2-3): 245-252

Kraemer SM (2004) Iron Oxide Dissolution and Solubility In The Presence of Siderophores. *Aquatic Sciences* 66(1): 3-18

Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, Lindahl T (2001) Oxygen Free Radical Damage To DNA: Translesion Synthesis By Human DNA Polymerase H and Resistance To Exonuclease Action At Cyclopurine Deoxynucleoside Residues. *Journal of Biological Chemistry* 276(52): 49283-49288

Lake JA, Field KJ, Davey MP, Beerling DJ, Lomax BH (2009) Metabolomic and Physiological Responses Reveal Multi-Phasic Acclimation Of *Arabidopsis Thaliana* To Chronic Uv Radiation. *Plant, Cell & Environment* 32(10): 1377-1389

Lamb C, Dixon RA (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review Of Plant Biology* 48(1): 251-275

Li H, Qiu Y, Yao T, Ma Y, Zhang H, Yang X (2020) Effects of PGPR Microbial Inoculants On The Growth and Soil Properties of *Avena Sativa*, *Medicago Sativa*, and *Cucumis Sativus* Seedlings. *Soil and Tillage Research* 199: 104-577

Li X, Sun P, Zhang Y, Jin C, Guan C (2020) A Novel Pgpr Strain *Kocuria Rhizophila* Y1 Enhances Salt Stress Tolerance In Maize By Regulating Phytohormone Levels, Nutrient Acquisition, Redox Potential, Ion Homeostasis, Photosynthetic Capacity and Stress-Responsive Genes Expression. *Environmental and Experimental Botany* 174: 104-023

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556

Mark GL, Morrissey JP, Higgins P, O'gara F (2006) Molecular-Based Strategies To Exploit *Pseudomonas* Biocontrol Strains For Environmental Biotechnology Applications. *Fems Microbiology Ecology* 56(2): 167-177

Mazid M, Khan T, Mohammad F (2011) Role of Secondary Metabolites In Defense Mechanisms Of Plants. *Biology And Medicine* 3(2): 232-249

Miethke M, Marahiel MA (2007) Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3): 413-451

Mishra J, Arora NK (2018) Secondary Metabolites Of Fluorescent *Pseudomonads* In Biocontrol of Phytopathogens For Sustainable Agriculture. *Applied Soil Ecology* 125: 35-45

Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C (2002) Plant-Microbe Interactions and The New Biotechnological Methods of Plant Disease Control. *International Microbiology* 5(4): 169-175

Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant Cell Cultures-An Alternative and Efficient Source For The Production Of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science And Engineering* 2(1): 29-48

Mushtaq Z, Asghar HN, Zahir ZA (2021) Comparative Growth Analysis of Okra (*Abelmoschus Esculentus*) In The Presence of PGPR and Press Mud In Chromium Contaminated Soil. *Chemosphere* 262: 127-865

Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R (2004) Involvement of Secondary Metabolites and Extracellular Lytic Enzymes Produced By *Pseudomonas Fluorescens* in Inhibition Of *Rhizoctonia Solani*, The Rice Sheath Blight Pathogen. *Microbiological Research* 159(1): 73-81

Nishino H (1999) Cancer Prevention By Natural Carotenoids Antioxidant Food Supplements in Human Health 231-238

Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık. Ankara

Önen H (2003) Bazı Bitkisel Uçucu Yağların Biyoherbisidal Etkileri. Türkiye Herboloji Dergisi. 6(1): 39-47

Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal Y (2015) Secondary Metabolites of Plants and Their Role: Overview. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 9(3): 293-304

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases Have More Functions Than A Swiss Army Knife. Plant Cell Reports 24(5): 255-265

Patel D, Saraf M (2013) Influence Of Soil Ameliorants and Microflora On Induction of Antioxidant Enzymes and Growth Promotion Of *Jatropha Curcas* L. Under Saline Condition. European Journal Of Soil Biology 55: 47-54

Pavela R (2004) Insecticidal Activity Of Certain Medicinal Plants. Fitoterapia 75(7-8): 745-749

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free Radicals, Antioxidants In Disease and Health. International Journal Of Biomedical Science: IJBS 4(2): 89

Prior RL, Cao G (2000) Analysis Of Botanicals and Dietary Supplements For Antioxidant Capacity: A Review. Journal Of Aoac International 83(4): 950-956

Qadir M, Hussain A, Hamayun M, Shah M, Iqbal A, Murad W (2020) Phytohormones Producing Rhizobacterium Alleviates Chromium Toxicity In *Helianthus Annuus* L. By Reducing Chromate Uptake and Strengthening Antioxidant System. Chemosphere 258: 127-386

Rahnama H, Ebrahimzadeh H (2005) The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biologia plantarum* 49(1): 93-97

Ram R, Maji C, Bindroo B (2013) Role Of PGPR In Different Crops-An Overview. Indian Journal Of Sericulture 52(1): 1-13

Ratledge C, Dover LG (2000) Iron Metabolism In Pathogenic Bacteria. Annual Reviews In Microbiology 54(1): 881-941

Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA (2004) Biotechnological Applications of Peroxidases. *Phytochemistry Reviews* 3(1): 243-256

Riley MA, Wertz JE (2002) Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annual Reviews In Microbiology 56(1): 117-137

Saber M (2001) Clean Biotechnology For Sustainable Farming. *Engineering In Life Sciences* 1(6): 217-223

Saha A, Basak B (2020) Scope Of Value Addition and Utilization of Residual Biomass From Medicinal and Aromatic Plants. *Industrial Crops and Products* 145: 111-979

Saleem M, Asghar HN, Zahir ZA, Shahid M (2018) Impact Of Lead Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria On Growth, Physiology, Antioxidant Activities, Yield and Lead Content In Sunflower In Lead Contaminated Soil. *Chemosphere* 195: 606-614

Salla TD, Da Silva TR, Astarita LV, Santarém ER (2014) Streptomyces Rhizobacteria Modulate The Secondary Metabolism Of Eucalyptus Plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 85: 14-20

Sarma AD, Mallick AR, Ghosh A (2010) Free Radicals and Their Role In Different Clinical Conditions: an Overview. *International Journal Of Pharma Sciences and Research* 1(3): 185-192

Serteser A, Gök (2003) Doğal Antioksidanların Biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi s. 2-4

Shahid M, Ameen F, Maheshwari HS, Ahmed B, Alnadhari S, Khan MS (2021) Colonization of *Vigna Radiata* By A Halotolerant Bacterium *Kosakonia Sacchari* Improves the Ionic Balance, Stressor Metabolites, Antioxidant Status and Yield Under NaCl Stress. *Applied Soil Ecology* 158: 103-809

Shahidi F (2000) Antioxidants In Food and Food Antioxidants. *Food/Nahrung* 44(3): 158-163

Shazhni JA, Renu A, Vijayaraghavan P (2018) Insights Of Antidiabetic, Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Properties Of Antimicrobial Secondary Metabolites of Corm Extract From *Caladium X Hortulanum*. *Saudi Journal Of Biological Sciences* 25(8): 1755-1761

Siddiqui Z (2006) Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer The Netherlands 66: 3393-3398

Skaar EP (2010) The Battle For Iron Between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *Plos Pathogens* 6(8): E1000949

Tahir M, Ahmad I, Shahid M, Shah GM, Farooq ABU, Akram M, Ahmad S (2019) Regulation of Antioxidant Production, Ion Uptake and Productivity in Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Plant Inoculated With Growth Promoting Salt Tolerant *Bacillus* Strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 178: 33-42

Tan A (2010) Türkiye Bitki Genetik Kaynakları ve Muhafazası. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* 20(1): 7-25

Temel M, Tinmaz AB, Öztürk M, Gündüz O (2018) Dünyada ve Türkiye’de Tıbbi-Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Ticareti. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi 21: 198-214

Thakur M, Bhattacharya S, Khosla PK, Puri S (2019) Improving Production of Plant Secondary Metabolites Through Biotic and Abiotic Elicitation. Journal Of Applied Research On Medicinal and Aromatic Plants 12: 1-12

Tirry N, Kouchou A, Laghmari G, Lemjereb M, Hnadi H, Amrani K, El Ghachtouli N (2021) Improved Salinity Tolerance Of Medicago Sativa and Soil Enzyme Activities By PGPR. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 31: 101-914

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology 39(1): 44-84

Van Breusegem F, Dat JF (2006) Reactive Oxygen Species In Plant Cell Death. Plant Physiology 141(2): 384-390

Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1998) H₂O₂ and No: Redox Signals in Disease Resistance. Trends In Plant Science 3(9): 330-334

Van Loon L (2007) Plant Responses To Plant Growth-Promoting Rhizobacteria New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research p. 243-254

Van Loon L, Bakker P, Pieterse C (1998) Systemic Resistance Induced By Rhizosphere Bacteria. Annual Review of Phytopathology 36(1): 453-483

Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS (2004) Studies On The Production of Some Important Secondary Metabolites From Medicinal Plants By Plant Tissue Cultures. Bot. Bull. Acad. Sin 45(1): 1-22

Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for The Production of Plant Secondary Metabolites. Phytochemistry Reviews 1(1): 13-25

Ww N (1996) Lipids, Ch. 5. Food Chemistry, 3rd Ed., Or Fennema Editor. Marcel Dekker, Inc, New York p. 225-319

Xiao A, Li Z, Li WC, Ye Z (2020) The Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) On Arsenic Accumulation and The Growth of Rice Plants (Oryza Sativa L.). Chemosphere 242: 125-136

Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress. Trends In Plant Science 14(1): 1-4

Yasmeen T, Ahmad A, Arif MS, Mubin M, Rehman K, Shahzad SM, Alyemeni MN (2020) Biofilm Forming Rhizobacteria Enhance Growth and Salt Tolerance in Sunflower

Plants By Stimulating Antioxidant Enzymes Activity. *Plant Physiology and Biochemistry* 156: 242-256

Yazici I, Türkan I, Sekmen AH, Demiral T (2007) Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 61(1): 49-57

Ye Y, Tam NFY, Wong YS, Lu CY (2003) Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany* 49: 209–221

Yıldıztuğay E, Sekmen AH, Turkan I, Kucukoduk M (2011) Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgolensis* under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(8): 816-824

Zhang H, Tsao R (2016) Dietary Polyphenols, Oxidative Stress and Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Current Opinion In Food Science* 8: 33-42

Zhang XL, Guo YS, Wang CH, Li GQ, Xu JJ, Chung HY, Wang GC (2014) Phenolic Compounds From *Origanum Vulgare* and Their Antioxidant and Antiviral Activities. *Food Chemistry* 152: 300-306