

Biyolojik Mücadeleye Giriş

(Kısım 1: Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Mücadele)

Tarım; temeli çok eski tarihlere dayanan, insanların karnını doyurmak için belirli bir alanda aynı bitkiyi yetiştirmesidir. İlk çağlarda insanlar bunu kendi karınlarını doyurmak için yaparlarken yıllar içerisinde yavaş yavaş ticari bir hal almış, yetiştirilen ürünler başka ürün ya da objelerle takas edilmiş veya günümüzde olduğu gibi para karşılığı satılmıştır. Günümüzde tarımsız bir dünya düşünmek mümkün değildir. Yaklaşık 8 milyar civarına gelen dünya nüfusunun beslenmesi gerekmektedir ve bunun tek çaresi de tarımdır. Ancak günümüzde tarımdan bahsederken küçük aile işletmelerinden ziyade



adeta bir fabrika gibi işleyen büyük alanlarda yapılan devasa üretimler akla gelmektedir. Büyük alanlarda yapılan bu üretimler ile artan talebe cevap vermek mümkün olacaktır. İşin ticari boyutuna bakıldığında ise bu tür büyük tarımsal üretimin getirisi de aynı ölçüde büyük olmaktadır. Büyük alanlarda yapılan tarımsal üretimin başlangıç maliyeti büyük olsa da bu toplu üretimden dolayı ürünün birim fiyatı düşmekte ve aile işletmelerinin ya da küçük işletmelerin bu büyük işletmeler ile mücadelesini zorlaştırmaktadır. Tarım ne şekilde ve ne büyüklükte yapılırsa yapılsın elde edilen ürünün bizim zararlı diye isimlendirdiğimiz diğer organizmalardan korunması gerekmektedir. Yetiştirilen ürünleri bu organizmalardan korumak daha da ötesinde kalite ve miktarı arttırmak için zirai mücadele olarak adlandırılan bir takım işlemler yapılmaktadır. Bitki koruma olarak da adlandırılan bu çabalar içerisinde kültürel önlemler, karantina, dayanıklı çeşit kullanımı, fiziksel ya da kimyasal önlemler ve

biyolojik mücadele yer almaktadır. Tüm bu önlemlerin birlikte değerlendirildiği entegre mücadele olarak adlandırılan bir mücadele yöntemi daha vardır. Bu yöntemlere bakıldığında kimyasal mücadele günümüzde en çok kullanılan ve tercih edilen mücadele yöntemlerinden bir tanesidir. Sonuçlarının çok hızlı görüldüğü bu yöntem, bazı durumlarda diğer yöntemlere göre daha etkili ve ekonomiktir. Günümüzde ziraatten bahsederken kimyasal kullanılmadan yapılan





bir üretimden söz edilmesi neredeyse mümkün değildir. Tarım yani mono kültür bitki yetiştirilmesi ile doğal denge insan eliyle bozulmakta, kimyasal mücadele başta olmak üzere insanların bir takım korunma önlemleri almasını zorunlu kılmaktadır. Bilinçsiz ve yanlış kullanıldıkları zaman kimyasal ilaçların oluşturduğu bir çok sakınca herkes tarafından bilinmektedir. Kimyasal savaşım sorunları basit olarak; **sağlık boyutu, çevre kirliliği boyutu, dayanıklılık boyutu** ve **doğal denge boyutu** açısından incelenmektedir. Ancak genelde insan sağlığı ön plana çıkmakta, tüketicileri, sağlık kuruluşlarını bu konu tedirgin etmektedir. Tarımsal üretimde kullanılan kimyasallara **pestisit** adı verilmektedir. Pestisitler üretiminde çalışan işçiden son tüketicinin karnındaki

bebeğe kadar çok geniş bir insan kitlesini sağlık açısından tehdit edebilmektedir. İnsanlar bu kimyasallardan ya ani olarak (**akut**) ya da bunların vücutları içerisinde birikmesi sonucu zaman içinde sağlık sorunlarının çıkması (**kronik**) şeklinde etkilenirler. Tarım ürünlerindeki kimyasal kalıntıdan kaçmak son tüketici tarafından iyice yıkanması ile mümkün değildir. Tarımda **sistemik** olarak adlandırılan ve bitki dokusu içine işleyerek orada etki gösteren bir çok pestisit kullanılmaktadır. Ne kadar yıkanırsa yıkansın bu kimyasallardan arınmak neredeyse imkansızdır. Bu kimyasallar vücuda sadece ağız yoluyla alınmazlar, özellikle üretimleri ve kullanımları sırasında nefes ya da deri yoluyla da bünyeye alınarak daha büyük riskler oluştururlar. Kimyasal savaşımın neden olduğu sorunlar sadece sağlık açısından önemli değildir. Pestisitler özellikle çevreyi de kirletmektedir. Özellikle toprak ve suya bir şekilde geçmeleri ya da yıkanmaları sonucunda buraları kirletmektedirler. Düşünüldüğünde hazırlanan onca ilacın araziye uygulanmasından sonra hepsinin bitki üzerine gitmediği basit bir mantık ile görülebilir. Hedef dışına giden bu ilaç ilk önce toprağa daha sonra oradan da suya geçebilmektedir. Sadece bitki yüzeyinin ilaçlanması neredeyse imkansızdır (Ancak günümüzde sadece bitkilerin üzerine ilaçlama yapılmasına olanak sağlayan modern uygulama cihazları üzerine çalışılmaktadır). Hatalı bir uygulama yapılmaması durumunda dahi hedef dışına bu pestisitler taşınmaktadır. Buna ek olarak uygun dozun ya da püskürtme hacminin seçilmemesi durumunda ise bu olumsuzluk kat kat daha fazla olarak karşımıza gelmektedir. Tarım ilaçlarının olumsuz etkilerinden bir tanesi de hedef alınan organizmanın zaman içerisinde bu ilaçlara karşı dayanıklılık oluşturmasıdır. Bununla kalmayarak bu dayanıklılığın nesilden nesile geçmesi ile mevcut ilaçlarla mücadeleyi neredeyse imkansız hale getirmektedir. Dayanıklılık riski genelde sistemik etkili ilaçlarda ortaya çıkmaktadır. Aynı etkili maddeli ilaçların peş peşe kullanılmaması ve önerilen dozların dışına çıkılmaması bu sorun ile mücadelede üreticilere yardım edecektir. Kimyasal mücadelenin olumsuzluklarından bir tanesi de doğal dengeye olan etkileridir. Bilindiği üzere toprak canlı bir unsurdur. Toprak içerisinde; element döngülerinde, çürümeye, ayrıştırma işlevlerinde görev alan, belkide hastalık etmenlerini baskı altında tutan bir çok faydalı mikroorganizma yaşamaktadır. Kimyasal ilaçların



kullanımı ile bu mikroorganizma gruplarının ortadan kaldırılması toprağın canlılık özelliğinde azalmaya neden olacağından doğal denge etkilenecektir. Toprakta yaşayan diğer bitkiler ve böcekler de bu kimyasallardan etkilenmektedir. Herbir canlı ekosistem zincirinin bir halkasını oluşturmaktadır. Bu zincir üzerinde meydana gelen herhangi bir kopukluk kendiliğinden süre gelen dengenin bozulmasına neden olabilmektedir. İnsanlar tarım yaparak zaten doğal dengeyi bozmaktadırlar, ayrıca doğru yapmadıkları kimyasal mücadele ile bu olayı daha da baltalamaktadırlar.

Tüm bu olumsuzluklar düşünüldüğünde dahi kimyasal mücadeleden uzaklaşmak neredeyse mümkün değildir. Tarımsal savaşım yöntemleri içinde anılan biyolojik savaş kimyasal mücadelenin yerini almasından ziyade, bu uygulamaları azaltacak, doğal dengeyi bozmayacak, insana zararı olmayan bir alternatif arayışıdır.

Biyolojik savaş temel anlamda canlıyı canlıya kırdırmaktır, tarım yaparak bozduğumuz doğal dengeyi tekrar tahsis etmektir. Peki bu bahsedilen canlılar nelerdir. Birincisi mücadele edeceğimiz mikrobiyal hastalık etmenleridir. Bunlara **paraziter bitki hastalık etmenleri** de denilmektedir. Bu gözle görülemeyecek kadar ufak canlılar (mikroorganizmalar; başlıca funguslar bakteriler) bitkilerde hastalıklara neden olurlar. Genel anlamda her bitki grubunu hastalandıran ona özgü hastalık etmenleri vardır. Her hastalık etmeni her bitkiyi hastalandıramaz. Ancak farklı etmenler aynı bitki grubunda farklı hastalıklara neden olabilirler. Bu doğanın kendisinde olan bir olgudur. Onu zararlı veya hastalık olarak nitelendirmemiz tamamen doğa değil de insan gözünden bakıyor olmamızdır. Hastalık veya zararlı isminin olumsuzluğu tamamen insanın bunları düşman olarak görmesinde kaynaklanmaktadır. Çünkü insanlar tarım yaparak istedikleri bitkileri başka bir canlının yemesine fırsat vermeden hasat etmek isterler. Doğanın gözünde bitki üzerinde onla beslenen ve yaşaması için o bitkiye ihtiyaç duyan mikroorganizma da insan kadar masumdur. Ancak tarım yaparak insanoğlu onlara zararlı demiş ve tarım arazilerinde istememiştir. Buna benzer olarak bu zararlı/hastalık etmenlerini yiyen, onları öldürerek karnını doyuran diğer canlılara da yararlı demiştir. Çünkü düşman olarak nitelendirdiği canlıları yiyen bu canlılara “yararlı” isminden başka bir isim veremezdi. Dikkat edilecek olursa tüm bu kavramlar insan gözünden ele alınmıştır. Biyolojik savaşta zararlı veya hastalık etmenini bir şekilde durduran, öldüren, engel olan canlılar bizim gözümüzde **yararlıdır** (ve bundan sonra bu şekilde anılacaktır). Bitki hastalık etmenlerinin öldürülmesi ya da durdurulması için, onlara karşı kullanılan bu mikroorganizmalara **Biyolojik Savaş Elemanı, Biyolojik Savaş Ajanı** veya **antagonist** adı verilmektedir. Bu yararlı mikroorganizmalar hastalık etmenlerini çeşitli etki mekanizmaları ile öldürür ya da durdururlar. Bunlar genel olarak **antibiosis, yarışma, hiperparazitizm, hipovirulens, uyarılmış dayanıklılık** ve **çapraz koruma** olarak sıralanabilir.

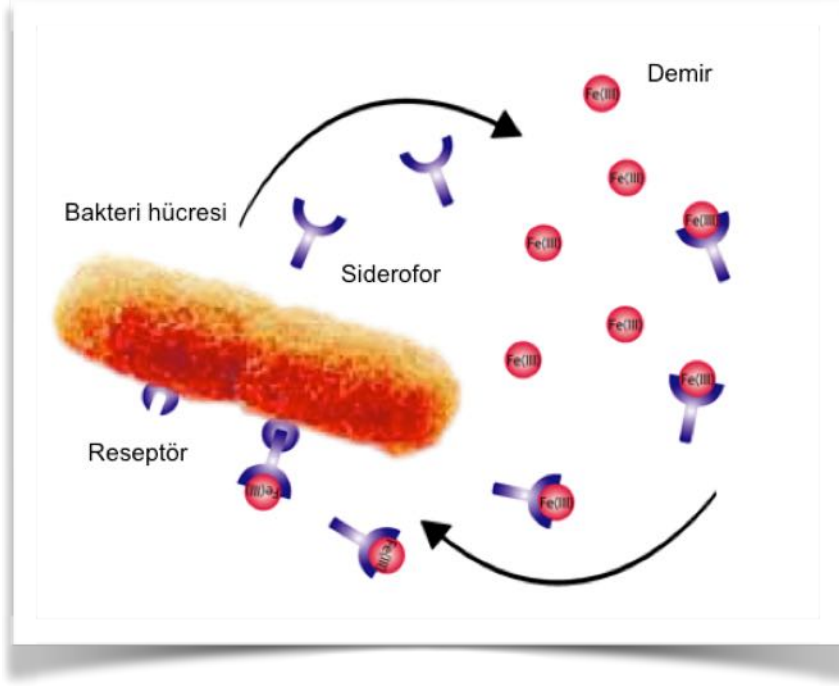
Antibiosis

Bir organizmanın, başka bir organizmayı ürettiği metabolitleriyle engellemesi ya da yıkıma uğratmasıdır. Bu metabolitlere genel olarak **antibiyotik** adı verilmektedir. Genellikle düşük moleküler ağırlıklı, uçucu olan ya da olmayan ve ortamda yayılabilen toksik bileşiklerdir. Bazı metabolitler enzim özelliğindedir ve hastalık etmeninin hücre kısımlarını yıkarak/eriterek (**litik**) etki gösterirler. Bu metabolitlerin üretilmesi için antagonistlerin bulunduğu ortamın besin içeriği önemlidir. Çünkü bu metabolitler ancak belirli besin koşulları oluştuğunda üretilirler. Bu nedenle laboratuvar ortamında etki gösteren bir antagonist doğa koşullarında etki göstermeyebilir. Laboratuvar koşullarında besin kıtlığı veya yokluğu çekilmez, besin içeriği açısından zengindir ve ayarlanabilir. Ancak doğa besin içeriği açısından kıttır. Besin içeriği açısından doğada belkide en zengin bölge topraktır. Toprakta özellikle bitkilerin kök bölgesinde yapılan biyolojik mücadele iyi sonuçlar verebilmektedir. Kök bölgesi (**Rizosfer**) bitki kökünden salgılanan besin değeri yüksek bazı maddelerce de zengindir. Bu besin maddeleri antagonistlerin burada gelişmesini teşvik edebilir ya da metabolit oluşturmalarını tetikleyebilirler. Kök bölgesinde kökü kılıf gibi saran antagonistler kök bölgesine özellikle kök hastalıklarının sokulmasına müsaade etmezler. Buna benzer olarak toprak üstü aksamda da biyolojik savaş yapılabilir. **Fillopleyn** olarak adlandırılan bu toprak üstü kısımlarda yapılan biyolojik savaşta seçilecek olan antagonistin kötü çevre koşullarına uygun olması gerekmektedir. Çünkü bu kısım doğrudan güneş gören, besin maddesi açısından yoksun, kuru ve sıcak bir bölgedir. Sayılan bu özellikler antagonistin etki göstermesi hatta yaşaması için uygun değildir.

Yarışma

İki ya da daha fazla mikroorganizmanın aynı şeye gereksinim duyduğunda bunu yalnızca birinin kullanarak diğerinin yararlanamaması durumunda ortaya çıkar. Bu **besin** için olabileceği gibi **yer** için de olabilmektedir. Yarışma genelde ortamda kıtlığı çekilen faktörler üzerinde yapılmaktadır. Örneğin bazı fungal hastalık etmenleri gelişebilmeleri için demire ihtiyaç duyarlar. Topraktaki demiri **siderofor** adı verilen bir metaboliti üreterek bağlar, bunu özel algılayıcıları ile yakalar ve kullanırlar. Bu metaboliti bir antagonist grubu bakteri de üretir. Bitkiye herhangi bir zararı olmayan bu antagonist grup bakteri topraktaki demiri aynı hastalık etmenine benzer olarak bağlar. Ancak bunların sayıları çok fazladır ve çok çabuk çoğalırlar. Buna ek olarak bu antagonistler hastalık etmeninin ürettiği sideroforların bağladığı demiri de kullanırlar. Buna karşın hastalık etmeni sadece kendi ürettiği sideroforları tanır. Böylece hastalık etmeni demir açısından yoksun kalır ve popülasyonunda bir azalma sağlanmış olur.

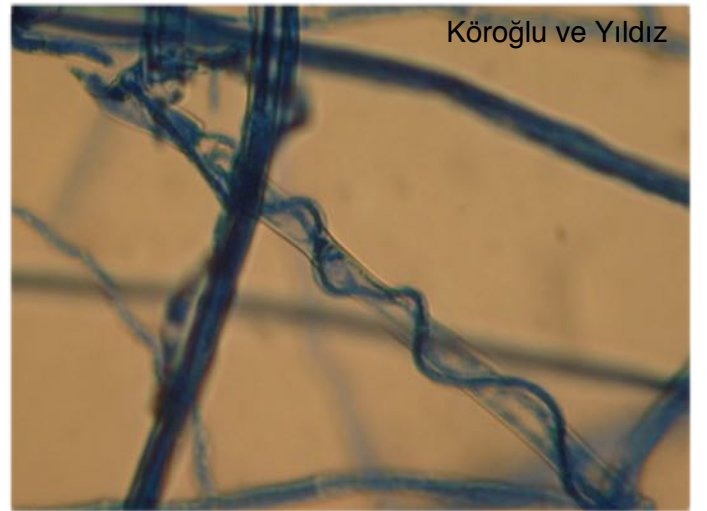
Başka bir yarışma türü de yer rekabetidir. Genelde aynı yeri paylaşan farklı bireyler aynı habitat içinde farklı alanlara yerleşirler. Bir yerin bir mikroorganizma grubu tarafından işgal edilmesi durumunda o bölgede farklı türlerin varlığına pek rastlanmaz. Bazı biyolojik savaş elemanları eğer hastalıktan önce o bölgeye gelir, yerleşir ve miktarını arttırırsa orada baskın tür pozisyonuna gelir. Bu bölge hastalık etmeni dahil diğer mikroorganizmalar tarafından tercih edilmez duruma gelmektedir.



Dona dayanıklı bazı bitkilerin yapraklarında su sıcaklığı 0°C'nin biraz altına düştüğü zaman oluşan buz; kristal oluşumunu başlatan buz çekirdeklerinin varlığını gösterir. Bu buz çekirdeği görevini abiyotik maddeler (toz, mineral vb.) üstlenebileceği gibi bazı mikroorganizma da olabilmektedir. Bu gibi kristal oluşumunu başlatıcı çekirdeklerin yokluğunda su -5 ya da -12°C de donmadan sıvı formda kalabilir. Eğer bitkide buz çekirdeği oluşturan bakteriler bu çekirdeği oluşumunu etkisiz kılan diğer bakteriler ile yer için yarışabilirse don zararı önlenir.

Hiperparazitizm

Genel olarak bitki patojeni etmenlere bitki paraziti mikroorganizmalar ya da etmenler de denilmektedir. Çünkü gelişmeleri için konukçu bir bitkiye gelmeleri ve onun üzerinden beslenmeleri gerekmektedir. Bu paraziter hastalık etmeni üzerinde başka bir mikroorganizma varsa ve bu mikroorganizma bu hastalık etmeni üzerinde besleniyorsa bizim yararımıza bir iş yapıyor demektir. Beslenme şekline bakılacak olursa onun ismi de parazittir. İşte bizim zararlı olarak nitelendirdiğimiz parazitin üzerindeki bu parazitlere **hiperparazit** yani parazitin paraziti adı verilmektedir. Özellikle bir grup yararlı fungus (*Trichoderma* spp.) bitkilerde hastalıklara neden olan zararlı bir grup fungusun üzerinde paraziter olarak gelişerek onları durdurmaktadır.



Hipovirulens

Bir virülens azalışı (hastalandırma şiddetinde azalma) olarak bilinen bu olgu, virüent bir patojen ve onunla akraba olan daha az virulent bireyler arasındaki bir olaydır. Fungusları enfekte eden virüslere **mikovirüs** adı verilmektedir. Mikovirüslerin çoğu herhangi bir belirti göstermeksizin konukçularında latent kalırlar. Ancak bulaştıkları patojen hücrelerinde virülens azalışına nede olurlar. Mikovirüsler hiflerin birbirine değmesi ile mikovirüsten ari bireylere geçebilmektedirler. Böylece mikovirüs bulaşan hastalık etmenlerinde bir virülens azalışı meydana gelmektedir. Mikovirüsler ile bulaşık bu virülensi düşmüş bireyler virülensi yüksek bireylere bu durumlarını bulaştırırlar ve biyolojik savaşta kullanılırlar. Hipovirüent terimi ilk kez 1900 lü yılların ortalarında İtalya ve Güney Fransa'da kestane ağaçlarında iyileşen kanserlerden elde edilen *Cryphonectia parasitica* ırklarını tanılamak için kullanılmıştır. Bu ırkların içindeki mikovirüslerin Amerika'daki hasta kestanelerdeki virüent *C. parasitica* ırklarına stoplazmik olarak aktarıldığı, bu hastalık yapma yeteneğinde olan ırkların artık virülensliklerini kaybettiği ve kanser yaralarının kapandığı tespit edilmiştir.

Uyarılmış Dayanıklılık

Hayvanlardaki bağışıklık sisteminden yapı ve işleyiş bakımından biraz farklı olsa da, bitkiler de hastalıklara karşı bir sistem ile karşı koymaya çalışırlar. Bitkilerde hastalıklara dayanıklılık mekanizmalarından birisi düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal maddelerin (**Fitoaleksinler**) hemen enfeksiyon yerinde ve çevresinde birikmesidir. Bu maddeler bitkide ön-enfeksiyon yoluyla, enfeksiyon ya da stresten hemen sonra birikirler ve bitkinin bu olumsuzluk ile baş etmesine yardımcı olurlar. Konukçu bitkinin hastalıklara dayanıklılık mekanizmaları sadece fitoaleksin sentezi ve birikmesi ile ilişkili değildir. Buna benzer olarak bitkiye saldıran patojenlerin çeşitli kısımlarını eritebilecek enzimler de dahil bir çok metabolitin üretilmesi de söz konusudur. Zararsız bir mikroorganizma, bir biyolojik savaş elemanı veya zayıf virulent bir patojen gerçek bir patojen gibi davranarak konukçu bitkinin savunma sisteminin tetiklenmesine, böylece konukçu bitkinin sonradan gelecek herhangi bir saldırıya hazır duruma gelmesine neden olabilmektedir. Buna uyarılmış dayanıklılık adı verilmekte ve biyolojik savaş yöntemi olarak kabul görmektedir. Uyarılmış dayanıklılık bitkinin her yerinde koruyuculuk sağlayabilmektedir. Yani kökten uyarılan bir konukçu yaprak enfeksiyonlarına karşı dayanıklı hale gelebilmekte ve etkisi çok uzun süreler boyu devam edebilmektedir. Patojenik olmayan mikroorganizmalar, özellikle bitki gelişimini uyarıcı kök bakterilerinin (**PGPR**) özel ırkları da sistemik dayanıklılığı uyarabilmektedir.

Çapraz Koruma

Çapraz koruma da uyarılmış dayanıklılık gibi bitkinin içinde oluşan bir biyolojik savaş mekanizmasıdır. Çapraz koruma antagonist organizma tarafından konukçu doku içinde patojene antibiosis, yer ve besin için yarışma, hifsel interferans ya da parazitizm gibi mekanizmalardan birisi ya da bunların kombinasyonu ile önlenmesini içermektedir. Uyarılmış dayanıklılığın etkisi dolaylıdır ve antagonist

tarafından uyarılır uyarılmaz mikroorganizmalara karşı bitkilerin aktif savunma mekanizmalarını harekete geçirmesiyle ilgilidir. Çapraz korumada kullanılan uyarıcı izolat ya önlemesi istenen patojenle akrabadır ya da diğer ürünlerin benzer dokularında patojendir. Bu akraba ırklar yanı ekolojik alana uyum sağlamış herhangi iki mikroorganizma gibi oradaki tüketilebilir benzer materyaller için yarışabilirler.

Biyolojik Savaş Elemanlarının Elde Edilme Süreçleri

Belirli bir bitkide, belirli bir hastalık etmenine karşı biyolojik savaşta kullanılacak olan mikrobiyal savaş elemanları doğada aranmasından ürün haline getirilinceye kadar bir dizi süreçten geçilmektedir. Bu adımları bilmek, gerek elde edilmesi gerekse kitle üretimi ve formülasyon haline getirilmesinde bize yardımcı olacaktır. Son aşamalarda bizi üretimde zor durumda bırakacak ya da insan sağlığıyla ilgili olabilecek biyolojik savaş ajanlarının ilk aşamalarda elenmesi gerekmektedir. Bu ve bunun gibi konular göz önünde bulundurularak bu aşamalar sıralanacak olursa;

- Biyolojik savaş elemanının (BSE) bulunması ve tanınması
- Etkinlik testleri
- Güvenlik testleri (Kullanıcı, çevre, hedef dışı organizmaların güvenliği)
- BSE'nin kalıtsal değişmezlik testi
- Kitle üretim potansiyelinin araştırılması
- Etkinliğini arttırabilecek taşıyıcı bi madde içinde BSE'nin formülasyonunun geliştirilmesi
- Etkinin değişmezliği ve raf ömrü testleri
- BSE nin pazar potansiyelinin araştırılması
- Ürünün maliyet analizi, yatırım/getiri oranının değerlendirilmesi
- Tarla denemelerinin yapılması
- Patent alınması
- Biyopreparatın ticari olarak değerlendirilip dağıtımının yapılması

Bu maddeler izlendiğinde ilk aşamalardaki potansiyel antagonistlere **antagonist aday** adı verilmektedir. Adımlar ilerledikçe ve etkinlikleri gerek laboratuvarında (**in-vitro**) gerekse arazide (**in-vivo**) ortaya kondukça antagonist adayından ziyade antagonist olarak adlandırılmaya başlanılır. Peki **etkili bir antagonistin ne gibi özellikleri olması gerekmektedir**. Bu sorunun cevabı aşağıda listelenmiştir;

- Genetik değişmezlik göstermelidir
- Yüksek ve sürekli etkililik göstermelidir
- Olumsuz çevre koşulları altında yaşamını sürdürebilmelidir.
- Antagonist birden fazla patojene etkili olmalıdır
- Kitle üretimi için pahalı olmayan ortamlarda geliştirilebilmelidir
- Depolama ile özelliğini uzun süre yitirmemelidir
- İlk başta insan olmak üzere, çevredeki diğer canlılara enfeksiyonel ya da ürettiği ikincil metabolitleri ile zararı olmamalıdır
- Standart fungusitlere dayanıklı olmalıdır
- Özellikle hasat sonrası hastalıklar için BSE diğer fiziksel ve kimyasal işlemlerin uygulanmasına uygun olmalıdır

Doğada BSE adayları aranırken konukçu bitki ve bu konukçu bitkide hasatlık yapan etmen iyi değerlendirilmeli, hastalığın ortaya çıktığı yer ve zamanda BSE'nin izolasyonuna özen gösterilmelidir. Çünkü bu zamanlarda izole edilen antagonistler tekrar bu zamanda kullanılacaklarından hem çevre koşullarına hem de buldukları ortama uyum sağlamaları konularında bir sıkıntı yaşanmayacaktır. Örneğin kışın izole edilen bir antagonistin yazın çalışması çoğu zaman çevre koşulları nedeniyle mümkün olamayabilecektir. Veya yaprak yüzeyinden izole edilen bir antagonistin kök bölgesinde çalışması zor olacaktır ya da tam tersi. Hastalanmış bitkilerin içinde sağlıklı görülen bitkiler antagonist arayışında hedeflenen bitkilerdir. Bu bitkiler bir şekilde hastalıklı alanlarda sağlıklı kalmayı başaran bitkilerdir ve belkide bunların kök bölgesinde, yüzeyinde veya içinde kendiliğinden bulaşan antagonistleri barındırarak bu özelliğe sahip olmuş olabilirler. Bu bitkiler izolasyon çalışmalarında özellikle göz önünde bulundurulmalıdırlar. Antagonistin etkili olabilmesi için uygun çevre koşullarında bulunması gerekmektedir, bu sorun onu bu söz konusu çevre koşullarında ve zamanda izole etmek ile aşılabilir. Antagonistler bitkinin yüzeyinde, kök bölgesinde (rizosfer) ya da bitkinin içinde (**endofitik**) aranarak izole edilebilirler. Toprak çok karmaşık bir yapıya sahiptir ve çok sayıda mikroorganizma barındırmaktadır. Toprağa uygulanacak antagonistin topraktaki diğer mikroorganizmalar ile uyum içinde olması gerekmektedir. Antagonistin topraktaki bu mikroorganizmaların oluşturduğu metabolitlerden etkilenmemesi ya da etkinliğini düşürmemesi gerekmektedir. Ayrıca kullanılacakları alanda rahat **kolonize** olmaları (çoğalarak sayılarını arttırmaları) ve orada baskın popülasyon haline gelmeleri gerekmektedir. Bu nedenle uygulandıkları bölgede olabildiğince uzun süre varlıklarını sürdürebilmelidirler. Buna ek olarak özellikle korunması için hedef alınan kültür bitkisi yüzeyinde, içinde ya da kök bölgesinde rahatlıkla üreyebilmeli ve bu bölgeleri kendine ekolojik habitat olarak seçmelidir. Özellikle bitkiler kendilerine özgü bir takım maddeler salgırlar. Örneğin kök bölgesinden bitki tarafından salgılanan ve bu bitkiye has olan bu maddelerin varlığında gelişebilen antagonistler vardır. Bu antagonistlerin bulunarak bunların kullanılması ekstra bir özellik kazandıracaktır.

Her zaman için laboratuvarda elde edilen sonuçlar arazide elde edilemeyebilir. Hatta çoğu araştırmacı laboratuvarda elde ettikleri olumlu etkileri arazide alamadıklarından söz etmektedirler. Çünkü laboratuvar gerek sıcaklık, gerekse besin açısından kontrollü koşullardır. Arazide ise homojen olmayan ve kıt sayılabilecek oranda besin vardır; sıcaklığı, nemi değişkendir. Bazı durumlarda antagonistler güneşte bulunan UV ışınlarına maruz kalarak ölebilmektedirler. Ayrıca yukarıda bahsedildiği üzere toprak canlı bir yapıdadır ve burada çalışmasını beklediğimiz antagonistin gelişmesini engelleyebilen mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Tüm bu koşullar düşünüldüğünde arazide antagonistin hedef patojenimize aynı laboratuvarda olduğu gibi etki göstermesi istenmektedir.

Laboratuvar testlerinin ilk aşaması **ikili kültür** çalışmalarıdır. Bu çalışmalar ile antagonist ve patojen besi yeri içinde bir araya getirilerek birbirine olan etkileri incelenmeye çalışılır. Genel olarak besi yerine antagonistler patojenden bir gün önce ekilirler. Antagonist ekiminden bir gün sonra ise patojen ekimi gerçekleştirilir. Bu bir günlük farkta antagonist eğer antibiyotik üretme kabiliyetindeyse besi yerinde yayılabilen metabolitlerini üretmeye başlar. Daha sonra patojen ekildiğinde patojen besi yerinde gelişmeye başlar ancak antagonistin ürettiği metabolitler ile karşılaştığında gelişmesine bu noktadan itibaren devam edemez ve antagonist ile patojen arasında patojenin gelişemediği bir alan oluşur, bu alana **engelleme zonu** adı verilir. Ve bu alanın büyüklüğü antagonistin ikili kültürde patojene olan etkisi ile doğru orantılıdır. Antagonistin ve patojenin ekildiği bu besi yerinin cinsi ve ekim yöntemleri kullanılan antagonist ve patojenin içinde buldukları canlı gruplarına (fungus, bakteri vs) farklılık gösterir.

Etkinlik testlerinin yapılmasından sonra antagonistik etki gösteren mikroorganizmalar daha sonraki laboratuvar çalışmalarında kullanılmak üzere saklanırlar. Özellikle bu antagonistlerin belirli bir sıcaklık



aralığında yaşaması istenir. Özellikle bir antagonist mikroorganizmanın doğada karşılaşılabileceği maksimum sıcaklıklarda gelişip gelişmediğinin incelenmesi gerekmektedir. Sıcaklık toleransı olmayan ve nisbeten yüksek sıcaklıklarda ölen mikroorganizmaların elenmesi gerekmektedir. Çünkü bunlardan daha sonra arazide koruma yapmaları istendiğinde yüksek sıcaklıklar ile karşılaştıklarında etki gösteremediği olabilmektedirler. İkili kültür testleri ile başlayan bu süreçte aynı zamanda elde edilen bu durdurucu etkilerin hangi metabolitler ile sağlandığının araştırılmasının da çok sayıda antagonist içinden en etkililerin seçiminde bize yardımcı olacaktır. Antagonistler çok sayıda antibiyotik, litik enzim ya da ikincil metabolit üretme yeteneğindedirler. Bir antagonist bu etkiyi sadece bir metaboliti ile yapabilirken çok sayıda metabolit de üretebilmektedir. Ne kadar çok sayıda patojene etkili ve ne kadar çok farklı metabolit üretirse o kadar çok arazide potansiyel kullanım olanağı bulacaktır.

Etkileri ve mekanizmaları belirlenen antagonistler tür düzeyinde tanılanmaya çalışılmalıdır. Günümüzdeki moleküler teknolojilerin gelişmesiyle beraber mikroorganizmaların hangi türde oldukları genlerine bakılarak çok kısa sürede anlaşılabilir. Antagonistlerin hangi türden olduğunu bilmemiz bize insan sağlığı açısından bir sıkıntının olup olmayacağı konusunda bilgi sağlayacaktır. Elde edilen tür isimleri literatür taranarak araştırılması gerekmektedir. Tıp literatürlerinde anılan, patojen ya da zayıflık patojenleri olarak saptanmış olan mikroorganizmaların çalışmadan çıkarılması gerekmektedir. Patojenlere etkili olsa da bu antagonistlerin kullanılmaması gerekmektedir.

Dikkat edilecek olursa izolasyon sırasında elde edilen çok sayıda antagonist adayı mikroorganizma olumlu ve olumsuz yönleri araştırılarak bir eliminasyon yöntemi izlenmektedir. Bu eliminasyonda olumlu yanları çok olan ve olumsuz yanı olmayan antagonistler seçilerek arazi denemelerine geçilmektedir.

Laboratuvar çalışmaları ile etkili olabileceği düşünülen antagonistler arazide denenmeden önce **iklim odası** olarak adlandırılan ve kontrollü koşullarda yetiştirilen bitkiler üzerinde denenmelidir. Antagonist, patojen ve bitki bu aşamada ilk kez bir araya gelmekte (eğer özel bir laboratuvar çalışması yapılmadı ise) ve etki incelenmektedir. İklim odası çalışmaları doğa çalışmalarına en yakın çalışmalardır. Burada yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar da antagonist adaylarının eliminasyonunda kullanılırlar. İklim odalarında sıcaklık, ışık, nem gibi çevre koşulları cihazlar tarafından ayarlanmakta ve bitkilerin yetiştirildikleri topraklar sterilize edilmektedir. Kontrollü olan bu koşullar aslında doğayı tam olarak yansıtmamaktadır. Sıcaklık, ışık ve nem doğada değişkenlik göstermektedir. Özellikle toprağın yapısı, içindeki canlı unsurların bulunması, su içeriği, pH'sı gibi bir çok faktör standart dışına çıkmaktadır. En önemlisi toprak canlı bir materyaldir. İklim odasında alınan olumlu sonuçlar arazi çalışmalarında olumsuzluğa dönebilir.



Hem laboratuvar hem de iklim odasında yapılan çalışmalar sonucunda etkili bulunan antagonistler arazide etkili bulunmayabilir. Bu nedenle laboratuvar ve iklim odası çalışmalarının arazi ortamını yansıtacak şekilde azami şekilde dikkat edilerek kurulması ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Dikkat edilecek olursa laboratuvarda etkili olduğu halde arazide etkinin alınmadığı durumlarla çok karşılaşıldığına değinilmiştir. Peki tam tersi bir durum karşımıza gelebilir mi? Evet. Örneğin laboratuvarda etkisiz olarak bulduğunuz bir antagonist adayı belki de eğer elenmeseydi arazide çok başarılı olabilecekti. Ancak bu silsile sırasında bir şekilde elenmiş olan bu antagonist adayı laboratuvarda uygun koşulların oluşturulmamasından dolayı maalesef gözden kaçabilecektir. Bundan dolayı antagonist adaylarının aranması sırasında; patojen, bitki ve çevre faktörleri olabildiğince iyi irdelenmeli ve çalışma kurgusu ona göre oluşturulmalıdır.

Herşey yolunda gittiği düşünülduğünde kitle üretimi ve formülasyon çalışmalarına geçilmesi gerekmektedir. Antagonistin kitle üretimine müsait olması gerekmektedir. Laboratuvarda antagonistin geliştirilmesi için kullanılan kimyasallar çok pahalıdır ve sadece çalışma yapacak kadar mikroorganizma üretilmektedir. Büyük kitleler halinde antagonistin üretilebilmesi için antagonistin kolaylıkla gelişebileceği, rahat ve her zaman temin edilebilir, ucuz bir maddeden besi yeri yapılması ve antagonistin bu besi yerinde geliştirilebilmesi gerekmektedir. Kitle halinde geliştirilen antagonistin doğada kullanabilecek bir formülasyona sokulması gerekmektedir. Bu formülasyon ile antagonist rafa konduğunda etkinliğini kaybetmemesi, raf ömrünün uzun olması, ufak bir ambalajı olması ve arazide uygulamasının kolay olması gerekmektedir. Zaten kimyasala bir alternatif olarak sunulan **biopreparatlar** (Biyolojik savaş ajanlarının formüle edilmiş ve ruhsatlanmış son halleri)'in uygulama zorluluğunun olmaması, üreticinin bunu tercih etmesi açısından oldukça önemlidir.