

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ANKARA İLİ TOPRAKLARINDAN BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE GENETİK
ÇEŞİTLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Dilek KAYA ÖZDOĞAN tarafından hazırlanan Ankara İli Topraklarından Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi adlı tez çalışması 15.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



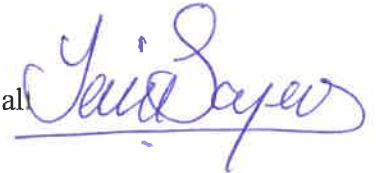
Üye : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. İrfan KANDEMİR
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Yeşim SOYER
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



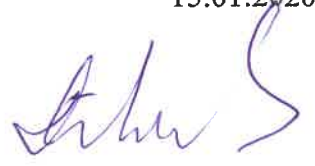
Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15.01.2020



Dilek KAYA ÖZDOĞAN

ÖZET

Doktora Tezi

ANKARA İLİ TOPRAKLARINDAN BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE GENETİK ÇEŞİTLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bitki büyümesini teşvik edici rizobakterlerin (BBTER), sürdürülebilir tarım sistemlerinin gelişimine ciddi bir katkı sağlama potansiyelleri bulunmaktadır. Genellikle BBTER'ler; bitkiler için belirli bileşiklerin sentezlenmesi, bazı besin maddelerinin topraktan alınmasını kolaylaştırmak ve bitkileri hastalıklardan korumak gibi, üç farklı şekilde işlev görmektedirler. Bu çalışmanın amacı; Ankara ilinden farklı bitki rizosferlerinden bitki büyümesini teşvik edici bakterileri izole etmek, genetik çeşitliliklerini ortaya koymak ve bitki büyümesini teşvik edici özelliklerini belirlemektir. İzolatların tanımlanması 16S rDNA sekans sonuçlarına göre yapılmış ve aynı zamanda AluI, HeaIII ve MspI enzimleri kullanarak ARDRA analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan 11 farklı cinse dahil (30 *Pseudomonas*, 15 *Arthrobacter*, 7 *Bacillus*, 4 *Phyllobacter*, 4 *Variovorax*, 3 *Olivibacter*, 3 *Enterobacter*, 1 *Strenotrophomonas*, 1 *Flavobacterium*, 1 *Caulobacter*, 1 *Paenibacillus*) dahil 70 bakteri suşunun in vitro şartlarda azot fiksasyon, fosfat ve potasyum çözme kapasiteleri, IAA (indol-3-asetik asit), siderofor üretme kapasiteleri ve bitki patojenlerine karşı antagonistik etkileri değerlendirilmiştir. 56 bakterinin azot fiksasyon kapasitelerinin mikro kjeldahl yöntemine göre 2,29-46,11 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışılan bakterilerden sadece *Paenibacillus polymxa* H8/2 suşunda *nifH* geni tespit edilmiştir. Tüm bakterilerde fosfor çözme kapasitesi 3,15-186,52 µg/mL arasında bulunmuştur. Triptofan eklenmiş besi ortamında IAA üretimleri 0,02-50,05 µg/mL arasında değişirken, bunlardan 32 adetinin siderofor üretebildiği saptanmıştır. Araştırmamızda kullandığımız bakterilerden 11 tanesi, denenen her iki fungusu karşı etkili olurken, 17 tanesi sadece *Fusarium culmorum*'a, 1 tanesi sadece *Sclerotium rolfsii*'a karşı etkili bulunmuştur. Bakterilerin azot fikse etme ve fosfor çözme kapasitelerinin bitki gelişimi üzerine etkisinin tespiti için sera denemeleri kurulmuş ve buğday bitkisi üzerine olumlu etkilere sahip oldukları tespit edilmiştir.

Ocak 2020, 120 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler, ARDRA, Azot fiksasyonu, Fosfor çözme, İndol asetik asit, Siderofor, Antagonistik etki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM SOILS OF ANKARA PROVINCE

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have the potential to make a significant contribution to the development of sustainable agricultural systems. Generally, BBTERs function in three different ways, such as the synthesis of certain compounds for plants, facilitating the uptake of certain nutrients from the soil and protecting plants from diseases. The aim of this study is to isolate plant growth promoting bacteria from different plant rhizospheres from Ankara province, to reveal their genetic diversity and to determine their properties that promote plant growth. The identification of the isolates was made according to the 16S rDNA sequence results and ARDRA analyzes were also performed using AluI, HeaIII and MspI enzymes. Nitrogen fixation, phosphate and potassium dissolving, IAA (indole-3-acetic acid) and siderophore production capacities of 70 bacterial strains including 11 different genera (30 *Pseudomonas*, 15 *Arthrobacter*, 7 *Bacillus*, 4 *Phyllobacter*, 4 *Variovorax*, 3 *Olivibacter*, 3 *Enterobacter*, 1 *Strenotrophomonas*, 1 *Flavobacterium*, 1 *Caulobacter*, 1 *Paenibacillus*) used in this study were evaluated in in-vitro conditions. Nitrogen fixation capacities of 56 isolates were found to vary between 2,29-46,11 µg / mL according to micro kjeldahl method. Among the bacteria studied, *nifH* gene was detected only in *Paenibacillus polymxa* H8 / 2 strain. Phosphorus dissolving capacity of all bacteria was found between 3,15-186,52 µg / mL. IAA production in tryptophan added medium varied between 0.02-50.05 µg / mL and 32 of them were found to be able to produce siderophore. While 11 of the bacteria used in our study were effective against both fungi tested, 17 were found to be effective only against *Fusarium culmorum* and 1 against *Sclerotium rolfsii*. In order to determine the effect of nitrogen fixation and phosphorus dissolving capacities of the bacteria on plant growth, greenhouse experiments have been established and it has been found that they have positive effects on wheat plant.

January 2020, 120 pages

Key Words: Plant growth promoting bacteria, ARDRA, Nitrogen fixation, Phosphorus dissolution, Indole acetic acid, Siderophore, Antagonistic effect

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'e; beni daima cesaretlendiren, destek ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Nefise AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)'e;

Tez izleme komitemde yer alan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Sümer ARAS (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi) ve Prof. Dr. Yavuz BEYATLI (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi)'ya;

Enerjileri ve güler yüzleriyle laboratuvar çalışmalarımı eğlenceli kılan Prokaryot Genetiği Laboratuvarındaki arkadaşlarıma;

Mensubu olmaktan mutluluk duyduğum Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü yönetimine, tez çalışmam süresince iş yükümü hafifletmek için ellerinden geleni yapan, çalışmalarımın deneysel aşamalarında bana yardımcı olan Mikrobiyal Gübre Araştırma Teknoloji Geliştirme ve Kültür Koleksiyonu Merkezi'ndeki çalışma arkadaşlarıma, İlhan GÜNGÖR ve Aynur DİLSİZ'e;

Bitki patojeni mikroorganizmaları temin etmemi sağlayan Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanları Dr. Aynur KARAHAN ve Dr. FilizÜnal'a;

Çalışmam boyunca sabırla ve gayretle bıkmadan benimle ilgilenen, yaşamımı mutluluk ve huzur içinde devam ettirmemi sağlayan, zor anlarımı kolaylaştıran canım eşim Nizamettin ÖZDOĞAN'a ve onlardan çaldığım zamanlar için beni affetmelerini dilediğim, motivasyon ve neşe kaynaklarım canımın içi kızlarım Ceren ve Defne 'ye;

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak sevgi ve destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan, eğitim hayatım boyunca bana benden çok güvenen canım annem Hülya KAYA ve ablam Özlem SOSYAL'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduğunu ve mutluluğumu paylaştığını hissettiğim, onun kızı olmaktan ömrüm boyunca gurur duyacağım, tezimi tamamlamadan kaybettiğim canım bitanem babam Eyüp KAYA'ya ithafen....

Dilek KAYA ÖZDOĞAN
Ankara, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	viii
Kısaltmalar	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Rizosfer	3
2.2 Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler.....	3
2.3 Direk Mekanizmalar	5
2.3.1 Azot fiksasyonu.....	6
2.3.2 Fosfor çözme	11
2.3.2.1 İnorganik fosforun çözünmesi.....	12
2.3.2.2 Organik fosforun çözünmesi	13
2.3.3 Potasyum çözme	14
2.3.4 Siderofor üretimi	15
2.3.5 Bitkisel hormon üretimi.....	17
2.3.5.1 Oksinler	17
2.3.5.2 Sitokininler.....	19
2.3.5.3 Giberellinler	20
2.3.5.4 Etilen	20
2.3.5.5 Absisik asit	20
2.4 Dolaylı Mekanizmalar.....	21
2.4.1 Antibiyotik üretimi.....	21
2.4.2 Litik enzim sentezi.....	22
2.4.3 Siderofor üretimi	23
2.4.4 Hidrojen siyanür (HCN) üretimi	23
2.4.5 Yarışma	23
2.4.6 ACC deaminaz aktivitesi	24
2.4.7 Uyarılmış sistemik direnç	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1 Materyal.....	26
3.1.1 Bakteriler	26
3.1.2 Test bitkisi.....	26

3.2 Yöntem	26
3.2.1 Toprak örneklerinin alınması	26
3.2.2 Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel analizleri	27
3.2.3 Topraktan bakteri izolasyonu	28
3.2.4 Bakterilerin tanımlanması.....	29
3.2.4.1 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu	29
3.2.4.2 16S rDNA dizi analizi.....	30
Çizelge 3.1 Enzim kesim protokolü.....	32
3.2.5 Bakterilerin azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenmesi.....	32
3.2.5.1 Kantitatif yöntemler	32
3.2.5.2 <i>nifH</i> geninin aranması	33
3.2.6 Bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin belirlenmesi	34
3.2.7 Bakterilerin potasyum çözme kapasitelerinin belirlenmesi.....	35
3.2.8 Bakterilerin siderofor üretme kapasitelerinin belirlenmesi	36
3.2.9 Bakterilerin indol asetik asit (IAA) üretme kapasitelerinin belirlenmesi	37
3.2.10 Bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	37
3.2.11 Sera denemeleri	38
3.2.11.1 Azot fiksasyonu sera denemesi	39
3.2.11.2 Fosfor çözme sera denemesi	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1 Toprak Örneklerinin Alınması	42
4.2 Toprak Örneklerinin Kimyasal ve Fiziksel Analizleri	42
4.3 Topraktan Bakteri İzolasyonu	44
4.4 Bakterilerin Tanımlanması	46
4.4.1 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu	46
4.4.2 16S rDNA dizi analizi.....	50
4.5 Bakterilerin Azot Fiksasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	61
4.6 Bakterilerin Fosfor Çözme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	68
4.8 Bakterilerin Siderofor Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	76
4.9 Bakterilerin İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi	78
4.10 Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	80
4.11 Sera Denemeleri	88
5. SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER DİZİNİ

L	Litre
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
μ m	Mikrometre
mm	Milimetre
mM	Mikromolar
μ g	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
rpm	Dakikada devir sayısı
ppm	Milyonda bir birim
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
kg/da	Kilogram/dekar
kb	Kilo baz
kob/mL	Mililitredeki koloni oluşturma birimi
Log	Logaritma
dS/m	Decisiemens/metre
NaCl	Sodyum klorür
N	Azot
P	Fosfor
K	Potasyum
Fe	Demir

Kısaltmalar

PBS	Tamponlanmış fosfat çözeltisi
OD	Optik yoğunluk
BBTER	Bitki büyümesini teşvik edici rizobakter
IAA	Indol-3-asetik asit
ACC	aminocyclopropane-1-carboxylic acid
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NBRIP	National Botanical Research Institute's Phosphate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Mo nitrojenaz enzim sistemi.....	9
Şekil 2.2 Major <i>nif</i> kümesi.....	9
Şekil 2.3 Minor <i>nif</i> kümesi.....	10
Şekil 2.4 IAA sentezi yolları.....	19
Şekil 4.1 Toprak örnekleme noktaları.....	42
Şekil 4.2 İzolatların nutrient broth besi ortamındaki koloni morfolojileri.....	46
Şekil 4.3 Üreaz testi.....	50
Şekil 4.4 Oksidaz testi.....	50
Şekil 4.5 16S rDNA PCR ürünleri agaroz jel görüntüleri.....	51
Şekil 4.6 UPGMA yöntemi kullanılarak 16S rDNA sekans sonuçları ile oluşturulan filogenetik ağaç.....	53
Şekil 4.7 İzolatların cinslere göre dağılımı.....	54
Şekil 4.8 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin AluI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.9 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin HeaIII enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.10 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin MspI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.11 Bakterilerin AluI, HeaIII, MspI enzimleri kullanılarak oluşturulan ARDRA paternlerinin, UPGMA ile elde edilen dendogramı.....	59
Şekil 4.12 Çoğaltılan <i>nif H</i> gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.13 Fosfor çözme kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.14 NBRIP katı besi ortamında fosfor çözme yeteneğinin belirlenmesi.....	71
Şekil 4.15 Bakterilerin potasyum çözme kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.16 Aleksandrov besi ortamında zon oluşumu.....	75
Şekil 4.17 CAS agarda siderofor üretiminin tespiti.....	78
Şekil 4.18 IAA üretimi deney tüpleri.....	80
Şekil 4.19 <i>Fusarium culmorum</i> 'a karşı antagonistik etki.....	82
Şekil 4.20 <i>Sclerotium rolfsii</i> 'ye karşı antagonistik etki.....	83
Şekil 4.21 <i>Pseudomonas tomato</i> 'a karşı antagonistik etki.....	84
Şekil 4.22 Antimikrobiyal aktive gösteren bakterilerin cinslere göre dağılımı.....	85
Şekil 4.23 <i>Paenibacillus polymyxa</i> H8/2 suşunun K0'a kıyasla verim parametrelerinde ve azot miktarlarında meydana getirdiği % değişim.....	89
Şekil 4.24 Bakteri uygulamalarının K0'a kıyasla fosfor miktarlarında meydana getirdikleri % değişim.....	92
Şekil 4.25 Bakteri uygulamalarının K0'a kıyasla verim parametrelerinde meydana getirdikleri % değişim.....	92
Şekil 5.1 Çalışmada kullanılan bakterilerin BBTE özellikleri.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Enzim kesim protokolü	32
Çizelge 3.2 Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçları (azot denemesi).....	40
Çizelge 3.3 Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçları (fosfor denemesi) ..	41
Çizelge 4.1 Toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	43
Çizelge 4.1 Toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (devam)	44
Çizelge 4.2 Bakteri izolatları ve izole edildikleri bölgeler	45
Çizelge 4.3 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonları	47
Çizelge 4.4 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre tanısı	52
Çizelge 4.5 H8/2 izolatu <i>nifH</i> gen bölgesi dizi analizi	63
Çizelge 4.6 Bakterilerin Kjeldahl yöntemine göre azot fiksasyon miktarları ve azotsuz besi ortamında üreme durumları	66
Çizelge 4.6 Bakterilerin Kjeldahl yöntemine göre azot fiksasyon miktarları ve azotsuz besi ortamında üreme durumları (devam)	67
Çizelge 4.7 Bakterilerin fosfor çözme miktarları.....	69
Çizelge 4.7 Bakterilerin fosfor çözme miktarları (devam)	70
Çizelge 4.8 Bakterilerin potasyum çözme miktarları.....	73
Çizelge 4.9 Bakterilerin siderofor üretim düzeyleri.....	77
Çizelge 4.10 Bakterilerin IAA üretim miktarları	79
Çizelge 4.10 Bakterilerin IAA üretim miktarları (devam).....	80
Çizelge 4.11 Bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri.....	86
Çizelge 4.11 Bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri (devam)	87
Çizelge 4.12 Azot sera denemesi sonucu elde edilen veriler	88
Çizelge 4.13 Fosfor sera denemesi sonucu elde edilen veriler	91

1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak, gıda maddelerine olan talep de artmaktadır. Yüksek verim artışını temel alan yoğun tarım uygulamaları; gerek gübreler ve gerekse bitki koruma ürünleri gibi farklı kimyasal ürünlerin kullanımını beraberinde getirmiştir. Kimyasal ürünler verimde önemli ölçüde artışa neden oldukları için, modern tarımın vazgeçilmez bir parçası olarak görülmektedir. Ancak toprak özelliklerinde ve çevresel kalitede önemli ölçüde yıkıcı değişimler yaratmaları ve yüksek maliyetleri gibi faktörler, kullanımına kısıtlamalar getirilmesini zorunlu kılmaktadır. Ürün verimini arttırmada önemli rolleri olan mikrobiyal inokulantlar ise; ucuz oluşları, kullanımının kolay oluşu ve en önemlisi toprak, bitki ve çevre üzerine olumsuz etkilerinin bulunmayışından dolayı, tüm dünyada popüler bir hal almıştır. Bitkisel üretimde verimliliğin artırılması, toprakların fiziksel ve kimyasal yapısının iyileştirilmesi, insan sağlığının korunması ve çevre kirliliğinin önlenmesi gibi temel gereksinimlerin sağlanabilmesi, büyük ölçüde organik ürünlerin kullanımına bağlıdır. Bu nedenle tarımsal alanda kullanılan kimyasal ürünlere karşı alternatif biyolojik ürünlerin geliştirilmesi ve kullanımının yaygınlaştırılması, sürdürülebilir tarımsal faaliyetler ve çevrenin korunması için önemli bir strateji olarak düşünülmelidir.

Tarımsal faaliyetlerde kimyasal gübre ve pestisitlere alternatif olarak, toprak canlılarının kullanımı büyük önem arz etmektedir. 1 hektar toprakta yaklaşık 4 ton mikroorganizma olduğu tahmin edilmekte olup, gezegendeki en büyük mikroorganizma rezervinin toprak olduğu bilinmektedir. Topraklarda; çok sayıda bakteri, mantar, alg, virüs, protozoa gibi organizmalarla birlikte, mikroskobik boyutlarda omurgasızlardan omurgalılara kadar değişen toprak canlıları karmaşık bir etkileşim içindedirler. Bu canlılar içerisinde bakteriler önemli bir yer tutmaktadır. Farklı cinslere dahil toprak bakterileri, toprak ekosisteminde çeşitli biyolojik aktivitelerle besin döngüsünü ve sürdürülebilir bitkisel üretimi dinamik hale getirmektedir. Rizosferdeki bitki bakteri interaksyonu, bitki sağlığı ve toprak verimliliğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Toprak bakterilerinin, bitkisel üretimde kullanılması için; bitkiye büyüme teşvik edici bileşikler salgılamak, fosfor, azot, kükürt, kalsiyum ve magnezyum gibi

bazı temel besin maddelerinin alımını sağlamak ve bitki hastalıklarının önlemek özelliklerinden en az birini barındırmaları gerekmektedir.

Tarımsal faaliyetlerin sürdürülebilir ve güvenli olarak yapılabilmesini sağlama hedefi doğrultusunda bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin kullanımı, dünya genelinde artış göstermektedir. Özellikle, azot fikse eden bakteriler (simbiyotik ve simbiyotik olmayan) ve fosfat (P) çözücü mikroorganizmalar kimyasal gübre kullanımının azaltılması amacıyla daha fazla önem kazanmakta ve küresel olarak pazarlanan mikrobiyal ürünlerin % 75'inden fazlasını oluşturmaktadır. Tarım üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle potansiyel mikrobiyal kaynakların taranması, tasarlanması, test edilmesi ve doğrulanması üzerine yürütülen temel ve uygulamalı araştırmalar, tarımsal mikrobiyoloji çalışmalarının odak noktası haline gelmiştir.

Kimyasal ürünlere dayalı tarımsal uygulamaların meydana getirdiği olumsuz etkiler hakkında artan farkındalıklar, arzu edilen mahsul üretimini elde etmek için büyüme teşvik edici ürün olarak kullanılacak, belirli bölgelere özgü mikrobiyal türlerin araştırılmasına ciddi bir ivme kazandırmıştır.

Bu çalışmada; öncelikle Ankara ili topraklarından çeşitli bitkilerin rizosferlerinden bitki büyümesini teşvik edici özellikte yerel bakterilerin izole edilmesi ve bu bakterilerin 16S rDNA analizine göre tanımlanması amaçlanmıştır. Tanımlanan bakterilerin ilk aşamada in vitro şartlarda bitki büyümesini teşvik edici özellikleri araştırılmış, daha sonra mikrobiyal gübre olarak kullanım potansiyelleri olan bakterilerin buğday bitkisi gelişimi üzerine etkileri, sera denemeleri ile değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Rizosfer

Rizosfer; kök sitemlerini etkileyen mikroorganizma aktivitelerinin gerçekleştiği, bitki köklerine bağlı toprağı içeren, kök yüzeyinden birkaç milimetre uzaklıktaki toprak bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Lynch 1990, Gray ve Smith 2005).

Toprak bakterileri, en fazla rizosferde bulunmaktadır. Bitki kökleri, su ve besin elementleri alımını mekanik olarak desteklemesinin ve kolaylaştırmasının yanısıra; vitaminler, şekerler, proteinler, karbohidratlar, organik asitler, amino asitler ve müsilaj gibi çeşitli bileşikler sentezlemekte, biriktirmekte ve salgılamaktadır (Brimecombe vd. 2000, Walker vd. 2003). Kök salgıları olarak adlandırılan bu bileşikler, aynı zamanda, birçok toprak mikroorganizması için cezbedici kimyasallardır. Söz konusu kök salgıları toprağın kimyasal ve fiziksel yapısını değiştirerek, rizosfer bölgesindeki mikrobiyal çeşitliliği belirlerler (Dakora ve Phillips 2002). Bitki mikroorganizma ilişkisi açısından kritik bir öneme sahip olan rizosferde, gramda 10^{10} dan daha fazla mikroorganizma ve 30000'den daha fazla bakteri türü yer almakta ve bu bakteriler rizobakter olarak adlandırılmaktadır (Mendes vd. 2011). Bitki ile ilişkili bakteriler, bitki üzerindeki etkileri dikkate alındığında; faydalı, zararlı ve nötr gruplar olmak üzere sınıflandırılırlar (Dobbelaere vd. 2003). Topraklarda bulunan bakterilerin sayısı ve çeşidi; sıcaklık, nem, tuzların ve diğerkimyasal maddelerin miktarı gibi ortam şartlarından etkilenmektedir. Toprak bu denli fazla sayıdaki bakteriye ev sahipliğı yapmasına rağmen, bu bakterilerin sadece % 1'i kültüre alınabilmektedir (Schoenborn vd. 2004). Yeni izolasyon teknikleri geliştirilmesi ve besin ortamlarının dizaynı ile bu oran yükseltilmeye çalışılmaktadır.

2.2 Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler

Bitkilerin kök bölgesinde yoğun olarak bulunan faydalı bakterilere; Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteriler (BBTER) (Plant Growth Promoting Rhizobacteria = PGPR) adı verilmektedir. BBTER terimi ilk kez Kloeper vd. (1980) tarafından, özellikle

patojenlere karşı biyokontrol amaçlı kullanılan ve bitki gelişimine katkı sağlayan florosan *Pseudomonas*'lar için kullanılmıştır. Daha sonra bu terim Kapulnik vd. (1981) tarafından bitki büyümesini direkt teşvik etme özelliğindeki rizobakterler için de kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde BBTER terimi, bir veya daha fazla mekanizma ile bitki büyümesini teşvik eden ve rizosferde yaşayan tüm bakteriler için kullanılmaktadır (Haghighi vd., 2011). PGPR'lar rizosfer bakterilerinin yaklaşık % 2-5'ini oluşturmaktadır (Antoun ve Klopper 2001). Bitki büyümesine olumlu etkisi olan bakterilerin; kökleri çevreleyen toprak bölgesine yerleşmek, topraktaki diğer mikroorganizmalar ile rekabet halinde gelişmek, çoğalmak, hayatta kalmak ve bitki büyümesini, gelişmesini desteklemek gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Klopper 1994).

BBTER'ler öncelikle, bitkilerle olan ilişkilerine göre; bitki kökü ile ilişkili ve serbest yaşayan rizobakterler olarak iki gruba ayrılmaktadırlar (Khan 2005). Bakteriler ile bitki kökleri arasındaki ilişkiler; simbiyotik, endofitik veya kök yüzeyinde yaşam olarak tanımlanmaktadır (Souza vd. 2015). Gray ve Smith (2005) bitki büyümesini teşvik edici bakterileri; köklerin etrafını saran toprakta yaşayan ve kök korteks hücreleri arasındaki boşluklarda kolonize olarak bitki büyümesini teşvik eden hücre dışı (ePGPR) bakteriler ve bitki hücrelerinin içinde nodül adı verilen özel yapıların içinde kolonize olan hücre içi (iPGPR) bakteriler olarak kategorize etmişlerdir.

BBTER'ler; çeşitli kimyasallar üreterek ve salgılayarak doğrudan veya dolaylı yollarla bitki büyümesini teşvik eden, heterojen bir bakteri grubudur (Glick 1995). Bu alanda yürütülen birçok çalışma *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospillum*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine dahil çeşitli türlerin bitki büyümesini teşvik edici bakteriler arasında yer aldığını ortaya koymuştur (Dutta ve Podile 2010, Xing vd. 2016, Solanki vd. 2017).

Bakterilerin bitki büyümesini etkileyen mekanizmaları, türler ve suşlar arasında farklılık gösterir ve bitki büyümesini teşvik etmek için tek bir mekanizmaları yoktur. Somer vd.

(2004), bitki büyümesini teşvik edici bakterileri, fonksiyonel aktivitelerine göre; biyogübreler (besin maddelerinin bitkiler için kullanılabilirliğini arttırmak), bitki stimülatörleri (genellikle fitohormonlar yoluyla bitki büyümesini teşvik etmek), rizoremediyatörler (organik kirleticileri parçalamak) ve biyopestisitler (özellikle antibiyotik ve antifungal metabolitler üreterek hastalıkların kontrol edilmesi) olarak sınıflandırmıştır. BBTER'ler, birçok farklı mekanizma ile bitki gelişmesini ve büyümesini etkileyebilirler. Direkt bitki büyümesini teşvik edici mekanizmalar; N, P, K gibi temel besin elementlerinin çeşitli sistemlerle kaynağından alımını kolaylaştırmak, indol asetik asit, giberellin, sitokinin gibi fitohormonları sentezlemek, siderofor üretmek, olarak özetlenebilir. Dolaylı mekanizmalar ise; hidrojen siyanit, fenazit ve birçok antimikrobiyal metabolitleri sentezlemek ve besin için yarışmacı koşullar yaratmak, indüklenen sistemik direncin ortaya çıkması ile bitki patojenlerine karşı direnci artırmak gibi özelliklerle tanımlanmaktadır (Glick 1995). Bunların yanısıra; BBTER'ler ağır metaller ve pestisitler gibi kirleticileri detoksifiye ederek, ortamı temizleme özelliğine sahiptir.

BBTER'lerin tarımsal ürünler için inokülant olarak kullanımının başarısı ve etkinliği; bitki genotipleri, bitki gelişim aşamaları, bitki savunma mekanizmaları, mikrobiyal topluluğun diğer üyeleri gibi bazı biyotik faktörlerden ve toprak yapısı, toprağın işlenme şekli ve iklim koşulları gibi abiyotik faktörlerden etkilenirler (Vacheron vd. 2013). Bitki kökleri, değişen çevresel şartlara karşı çok farklı salgılar üreterek, inokulantların verimliliği için en önemli faktör olan bitki bakteri etkileşimine katkıda bulunurlar. İnokulasyon verimliliğini etkileyen diğer önemli bir faktör ise; toprak tipi, besin elementi kompozisyonu, toksik metal konsantrasyonu, toprak nemi, mikrobiyal çeşitlilik ve toprak işlemeden kaynaklanan bozulmalar gibi, toprak sağlığı parametrelidir (Souza vd. 2015).

2.3 Direk Mekanizmalar

Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler; azot fiksasyonu, organik bileşiklerin mineralizasyonu, mineral besinlerin çözünmesi ve fitohormonların üretilmesi gibi mekanizmalarla, besin alımını veya besin kullanılabilirliğini arttırarak bitkilerin

büyümesini ve gelişmesini doğrudan etkileyebilirler (Bhardwaj vd. 2014). Bitki büyümesini doğrudan etkileyen bu mekanizmalar, mikroorganizma türü ve bitki çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Mikroorganizmaların biyogübre ve biyostimülatör olarak kullanımı, direk mekanizmalar arasında yer almaktadır.

Mahdi vd. (2010), biyogübreleri, taşıyıcı bir materyal ile paketlenmiş, tek başlarına veya kombinasyon halindeki bakteri, mantar ve alg kültürü olarak tanımlamıştır. Biyostimülatörler ise, bitki büyümesi düzenleyicileri veya fitostimülatörler olarak da adlandırılan organik kimyasal bileşiklerdir. Bitkiler bu kimyasal molekülleri sentezleyebilmelerine rağmen, yine de optimum performansları için büyük ölçüde dış beslemeye bağımlıdırlar. Bu dış besleme, ağırlıklı olarak BBTER'ler tarafından gerçekleştirilmektedir (Khalid vd. 2006).

2.3.1 Azot fiksasyonu

Azot, bitki gelişimi ve verimliliği için en önemli makroelementtir. Evrende en bol bulunan 5. element olan azot, protein ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin sentezinde anahtar rol oynaması açısından, tüm canlılar için hayati önem taşımaktadır. Doğadaki azotun ana kaynağı olan atmosferik azotun bitkiler tarafından kullanılabilmesi için dönüştürülmesi gerekmektedir.

Yıllık azot fiksasyon verimine yaklaşık % 65'lik katkı sağlayan ve belirli toprak bakterilerinin aktivitesi sonucu atmosferik azot gazının amonyağa çevrimi ile özetlenebilen biyolojik azot fiksasyonu, fotosentezden sonra meydana gelen en önemli ikinci proses olarak kabul edilmektedir (Fisher ve Newton 2002). Bu katkının % 83'ü simbiyotik birliktelikten sağlanırken, geri kalan kısmının serbest veya ilişkili yaşayan bakteriler tarafından sağlandığı düşünülmektedir (Graham 1988).

Biyolojik olarak azot fikse edebilen diazotrof mikroorganizmalar; serbest yaşayan, bitkilerle endofitik (bitki dokusu içerisinde) ilişki gösteren ve nodul adı verilen yapılar içerisinde bitkilerle ortak yaşam süren, simbiyotik bakterilerdir (Unkovich vd. 2008).

Azotobacter, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, azot fikse ettiği bilinen, ancak simbiyotik olmayan bakterilerdir (Hayat vd. 2010). *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* ve *Sinorhizobium* türleri ise, baklagillerle simbiyotik ilişki içerisindeki azot fikse edici bakterilerdir (Bottomley ve Maggard 1990).

Azot fiksasyon yeteneğine sahip bakteriler arasında rizobialar, baklagillerde nodul oluşturma yetenekleri ve bitkilere azot sağlama yolları en iyi tanımlanmış türlerdir (Premachandra vd. 2016). Birçok araştırmacı rizobiaların, baklagiller ile rotasyon ekim veya karışık ekim yapılan pamuk, tatlı mısır, mısır, buğday ve çeltik bitkisinin köklerinin iç dokularında kolonize olma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir (Spencer vd. 1994). Genellikle serbest yaşayan bakterilerin, bitkiler ile simbiyotik yaşayan bakterilere göre çok daha az miktarda azot fikse ettiği düşünülmektedir (James ve Olivares 1997).

Biyolojik azot fiksasyonu ile sağlanan fikse edilmiş azot, olduğu ortamda kullanılmasından dolayı gazlaşmaya ve çözünmeye karşı oldukça dirençlidir. Bu nedenle bu biyolojik proses, tarıma çok önemli sürdürülebilir bir katkı sağlamaktadır (Dixon ve Kahn 2004).

Azot (N_2) gazının amonyağa indirgenmesi; azot fikse edebilen tüm prokaryotlarda kompozisyonel ve fonksiyonel açıdan oldukça benzer olan nitrojenaz enzim sistemi tarafından katalizlenmektedir (Beringer ve Hirsch 1984). N_2 'nin biyolojik olarak indirgenerek amonyağa dönüşümünü katalizleyen nitrojenazlar, korunmuş yapıları ve mekanik özellikleri ile kompleks metalloenzimlerdir (Dixon ve Kahn 2004). Bu enzimin analogları, N_2 fikse etme yeteneğine sahip 100 den fazla bakteri türünde tespit edilmiştir.

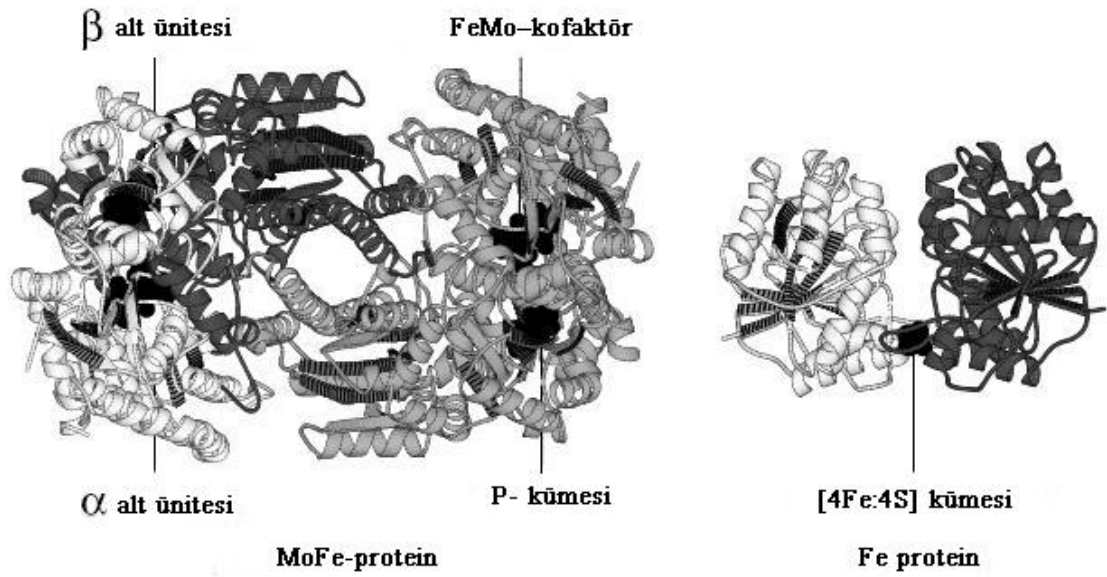
Nitrojenaz enzimi ilk defa 1960 yılında anaerob bir tür olan *Clostridium pasterianum*'dan izole edilmiştir. Günümüzde ise 30'dan fazla türde nitrojenaz enzimi izole edilerek tanımlanmıştır (Fisher ve Newton 2002). Azot fikse edebilen simbiyotik ve serbest yaşayan bakterilerde bulunan nitrojenaz enzimi (*nif* genleri tarafından

kodlanan enzim) tipik olarak 20 protein kodlayan ve 7 operon içeren, yaklaşık 20-24 kb büyüklüğünde bir küme içerisinde bulunmaktadır (Glick 2012). *Nif* (nitrogen fixation=azot tespiti) ismi ilk kez Valentine ve arkadaşları tarafından, azot fiksasyonu için gerekli genleri belirtmek amacıyla kullanılmış ve diğer araştırmacılar tarafından da kabul edilmiştir. Serbest yaşayan *Azotobacter vinelandii*'ye ait *nif* genleri, *Klebsiella pneumoniae*'nin *nif* genleri ile kıyaslanarak analiz edilmiş ve bu genler referans kabul edilerek tanımlamalar gerçekleştirilmiştir (Rubio ve Ludden 2002).

Tüm diazotroflar molibden nitrojenaz sistemine (Şekil 2.1) sahiplerdir. Bazı azot fikse eden bakteriler, belirli gelişme koşullarında molibden içermeyen nitrojenaz sistemlerine de sahip olabilirler. Molibden yerine vanadyum ve demir veya sadece demir içeren nitrojenazlara, alternatif nitrojenazlar adı verilmektedir (Bishop ve Jorerger 1990).

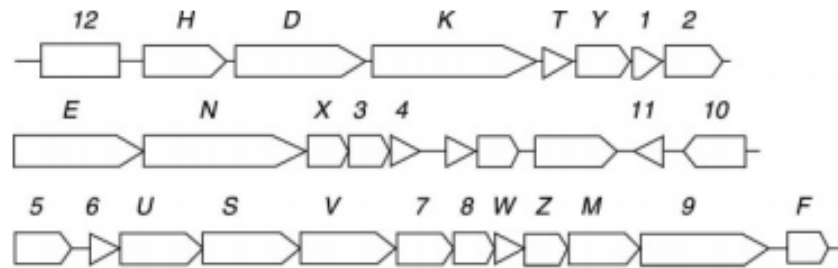
Molibden nitrojenaz, komponent I ve II olarak adlandırılan iki farklı çözünebilir metalloproteinden oluşmaktadır. Komponent I, sırasıyla *nifK* ve *nifD* tarafından kodlanan α ve β alt ünitelerinin iki kopyasını içermektedir. Her molekülü 2 Mo atomu içeren bu tetramer, 245 kDa (kilo Dalton) büyüklüğe sahiptir (Elmerich 1984). Komponent I, Mo ve Fe atomları içermekte ve sıklıkla MoFe proteini veya dinitrojenaz olarak adlandırılmaktadır (Beringer ve Hirsch 1984). MoFe proteini, P-demetleri (8Fe-7S cluster) ve FeMo kofaktör (Mo-7Fe-9S) olmak üzere iki tip metalsülfür demet içermektedir (Rees vd. 2005). Komponent II, *nifH* tarafından kodlanan α alt ünitesinin yaklaşık 55-65 kDa büyüklüğünde iki kopyasına sahiptir. Komponent II de Fe atomu içerdiğinden, bazen Fe proteini veya dinitrojenaz redüktaz olarak adlandırılır (Beringer ve Hirsch 1984). Fe proteini, alt ünitelerini kovalent olarak birbirine bağlayan bir metal demeti ([4Fe-4S] cluster) içermektedir.

Azot fikse etme yeteneğine sahip olduğu bilinmeyen birçok mikroorganizmanın taksonomik tanımlanması, azot fiksasyonunun genetik potansiyelini ortaya çıkaran *nifH* geninin tespiti yoluyla gerçekleştirilebilir (Zehr vd. 1995). *nifH* geni mikroorganizmalarda diazotrofik organizmaların genetik çeşitliliğinin tespiti ve incelenmesi için belirteç olarak kullanılmaktadır (Ueda vd. 1995).

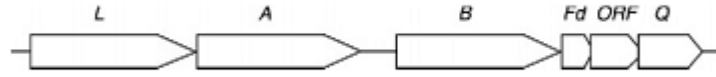


Şekil 2.1 Mo nitrojenaz enzim sistemi (Kraulis 1991)

Azotobacter vinelandii'de molibdenin yeterli olduğu durumlarda, nitrojenaz enzim sentezini kodlayan temel gen demetleri mutasyonel analizler kullanılarak sekanslanmış ve büyük ölçüde karakterize edilmiştir (Kennedy ve Bishop 2004). *A.vinelandii*'de *nif* spesifik genler iki farklı kümede gruplanmıştır. Bunlardan biri *nifHDKTYENXUSVWZMF* genleri ve *nif* genlerinin arasına serpiştirilmiş birkaç ORF'yi içeren major *nif* kümesi, diğeri ise *nifABQ*, *nifL* genleri ve *fdxN*'i içeren minor *nif* kümesidir (Şekil 2.2-2.3) (Rubio ve Ludden 2002).



Şekil 2.2 Major *nif* kümesi (sayılar ORF'leri, harfler *nif* genlerini göstermektedir)



Şekil 2.3 Minor *nif* kümesi

Vanadyum içeren nitrojenaz, *vnf* genleri tarafından kodlanan Nitrojenaz-2 enzim sistemi, Fe protein-2 olarak da adlandırılan dinitrojenaz redüktaz-2 ve VFe protein olarak da adlandırılan dinitrojenaz-2 olmak üzere, iki komponentten oluşmaktadır. Özdeş iki alt üiteden oluşan dimer yapıdaki Fe protein-2'nin her bir dimeri, dört Fe atomu ve dört kararsız sülfide sahiptir. Hekzamer yapıdaki VFe proteini, bir çift α ve β alt ünitesi ve bir çift γ alt ünitesinden oluşmaktadır. VFe proteininin her molekülü iki vanadyum atomu, 20 demir atomu ve 20 kararsız sülfid içermektedir (Kennedy ve Bishop 2004).

Demir içeren nitrojenaz, *anf* genleri tarafından kodlanan Nitrojenaz-3 enzim sistemi ise Fe protein-3 olarak adlandırılan denitrojenaz redüktaz-3 ve FeFe proteini olarak adlandırılan dinitrojenaz-3 olmak üzere iki komponentten oluşmaktadır. Dimer yapıdaki Fe protein-3'ün her bir dimeri dört Fe atomu ve dört kararsız sülfide sahiptir. Hekzamer yapıdaki FeFe proteini, bir çift α ve β alt ünitesi ve bir çift γ alt ünitesinden oluşmaktadır. FeFe proteininin her molekülü 24 demir atomu ve 18 kararsız sülfid içermektedir (Kennedy ve Bishop 2004).

Mo, V ve Fe nitrojenazlar, tüm organizmalarda substratın indirgenmesini aynı şekilde katalizlerler. Optimum koşullarda N_2 indirgenmesinin toplam reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir (Dixon ve Kahn 2004).



Azot indirgenmesinde elektronlar, düşük potansiyelli demir-kükürtlü proteinler olan ferrodoksinde veya flavodoksinde, dinitrojenaz redüktaza transfer edilir. Her elektron, transfer döngüsünde dinitrojenaz redüktaz, ferrodoksin/flavodoksin tarafından

indirgenir ve iki ATP molekülü bağlanır. ATP'nin bağlanması, dinitrojenaz redüktazın yapısını değiştirir ve dinitrojenaz ile dinitrojenaz redüktazın etkileşimine izin verecek şekilde, dinitrojenaz redüktazın indirgenme potansiyelini düşürür. Daha sonra, elektron transferine bağlı olarak ATP hidrolize edilir ve dinitrojenaz redüktaz, dinitrojenazdan ayrılır. Reaksiyonun devamında, tekrar indirgenme ve ATP bağlanma döngüsüne geri dönülür. Dinitrojenaz yeterince indirgendiğinde, azotun amonyağa indirgeneceği reaksiyon, FeMo kofaktör merkezinde gerçekleşir. Her elektron transfer aşaması, Fe ve MoFe proteininin kompleks oluşturmak için bir araya geldiği ve daha sonra ayrıldığı bir döngü içermektedir (Dixon ve Kahn 2004).

2.3.2 Fosfor çözme

Fosfor; azottan sonra bitki gelişimini kısıtlayan ve bitkilerden maksimum verim elde etmek için gerekli olan ikinci önemli elementtir. Fosfor (P), nükleik asitlerin, fosfolipitlerin ve adenosin trifosfatın (ATP) yapısal bir bileşeni ve özellikle fotosentez gibi önemli metabolik ve biyokimyasal yolların temel unsuru olduğundan, bitkiler için önemli bir besin elementidir (Khan vd. 2007, Richardson ve Simpson 2011).

Topraklar geniş bir fosfor rezervine (yaklaşık 400-1200 ppm) sahip olmasına rağmen, genellikle bitkiye yarayışlı formdaki fosfor oldukça düşük miktarda (1 ppm'in altında) bulunmaktadır. Bitkiler fosforu yalnızca monobazik (H_2PO_4) ve dibazik (HPO_4) iyonlar şeklinde alabilmektedir (Bhattacharyya ve Jha 2012). Bitkiler, fosforlu gübrelerin çok az bir kısmını kullanırlar. Kimyasal gübre olarak kullanılan çözülmüş inorganik fosfat, gübrelemenin hemen ardından immobilize olması nedeniyle, topraklarda bulunan çözünemez formdaki fosforun büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Richardson 1994, Yadav ve Dadarwal 1997). Toprakta fosfor, hem mineral (inorganik) ve hemde organik formda bulunmaktadır. Topraktaki çözünmeyen fosforun mineral formu; apatit, hidroksiapatit, oksiapatit ve zayıf çözünebilen Fe, Al, Mn bileşikleri şeklinde bulunur (Rodriguez ve Fraga 1999). Mineral P; killi topraklarda fiksasyon veya adsorbsiyon yoluyla kullanılamaz hale gelirken, alkali topraklarda Ca-P, Mg-P gibi katyonlarla ilişki vererek, asidik topraklarda ise Fe-P, Al-P gibi çökeltme reaksiyonlarını nedeniyle kullanılamaz forma dönüşür (Adnan vd. 2017). Topraktaki fosforun yaklaşık % 30-

50'sini oluşturan organik fosfor, çoğunlukla mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından sentezlenen inositol fosfat ve bunun yanısıra fosfomonoesterler, fosfolipitler, nükleik asitler ve fosfodiesterler gibi formlarda bulunmaktadır (Khan vd. 2007).

Organik ve inorganik formdaki fosforu mineralize edebilen ve çözebilen bakteriler, fosfat çözücü bakteriler (PSB) olarak adlandırılmakta, ekonomik ve çevre dostu olmaları yönüyle kimyasal gübrelemeye alternatif oluşturmaktadırlar (Khan vd. 2007). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter* en güçlü fosfat çözücü bakteriler olmak üzere *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium* ve *Serratia* cinslerine ait bazı türler de fosfat çözücü bakteriler olarak bilinmektedir (Whitelaw 2000, Bhattacharyya ve Jha 2012).

2.3.2.1 İnorganik fosforun çözünmesi

İnorganik fosforun bakteriler tarafından çözünmesini açıklayan birçok mekanizma vardır. Temel mekanizma; başta organik asitler, sideroforlar, protonlar, hidroksil iyonları ve CO₂ olmak üzere, mineral çözücü bileşiklerin bakteriler tarafından üretimidir (Sharma vd. 2013). Fosfat çözücü bakterilerin; glukonik asit, 2-ketoglukonik asit, laktik-izovalerik-izobutirik-asetik asit karışımı veya glikolik, oksalik, malonik ve suksinik asit gibi organik asitleri salgıladıkları tespit edilmiştir (Rodriguez ve Fraga 1999). Periplazmik boşlukta direk oksidasyon yolu ile sentezlenen organik asitlerin inorganik fosforu çözmesi, pH'ın düşürülmesi ve katyonların şelatlanması esasına dayanmaktadır (Behera vd. 2017). Bu şekilde hidroksil ve karboksil grupları, fosfatlara bağlı alüminyum fosfat (Al₃PO₄), demir fosfat (Fe₃PO₄) ve trikalsiyum fosfat (Ca₃(PO₄)₂) gibi bileşiklerdeki katyonları şelatlayarak fosforu alınabilir forma dönüştürürler (Goldstein 1995, Sagoe vd. 1998, Zhao vd. 2014).

İnorganik fosforun çözünmesinde bir diğer mekanizma ise, mikroorganizmalar tarafından sülfürik, nitrik ve karbonik asit gibi inorganik asitlerin salgılanmasıdır. İnorganik asitlerin salgılanmasının; mikrobiyal kükürt oksidasyonu, nitrat üretimi ve CO₂ oluşumunun bir sonucu olarak ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Sharma vd. 2013).

Ancak bu mekanizma organik asitlerle kıyaslandığında çok düşük bir etkinliğe sahiptir (Alori vd. 2017).

NH₄ asimilasyonundan kaynaklanan H salınımı, alternatif bir P çözme mekanizması olarak düşünülmektedir (Parks vd. 1990). Bazı mikroorganizmalar için NH₄ kaynaklı proton salınımı, P çözünürlüğünü teşvik eden tek mekanizma gibi görünmektedir.

2.3.2.2 Organik fosforun çözünmesi

Organik fosfor çözünürlüğü, organik fosfor minerilizasyonu olarak da adlandırılmaktadır. Başta inositol olmak üzere, topraktaki çeşitli organik fosfat bileşikleri alkali ve asit fosfatazlar tarafından substrat olarak kullanılarak inorganik forma dönüştürülürler (Beech vd. 2001). Organik formdaki fosforun minerilizasyonunda rol oynayan ilk enzim grubu, organik bileşiklerin fosfor esterini veya fosfoanhidrit bağı defosforile eden sipesifik olmayan asit fosfatazlardır (NSAPs). PSB'ler tarafından salgılanan NSAPs'ler arasında, üzerinde en yoğun çalışılan enzim, fosfataz olarak da adlandırılan fosfohomonoesterazlardır (Nannipieri vd. 2011). Fosfatazlar, optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerine bağlı olarak, asit ve alkali fosfatazlar olmak üzere iki grup altında sınıflandırılmaktadır (Jorquera vd. 2008). Asit fosfatazlar asidik topraklarda baskınken, alkali fosfatazlar nötr ve alkali topraklarda daha fazla bulunurlar (Renella vd. 2006)

PSB'ler tarafından, organik P minerilizasyonu için salgılanan bir diğer enzim grubu ise fitazlardır. Bu enzimler fitat şeklinde depolanan organik fosforun serbest kalmasında ve bitkiler tarafından alımında rol oynar (Richardson ve Simpson 2011). Bitki tohumlarında ve polenlerde depolanan başlıca P formu olan fitat, inositollerin birincil kaynağı ve topraktaki organik P'nin başlıca bileşenidir (Richardson 1994). Fosfotazlar ve C-P liyazlar, organofosfatların C-P bağı parçalayarak P'un serbest kalmasını sağlarlar (Rodriguez vd. 2006).

2.3.3 Potasyum çözme

Bitki gelişimi için gerekli üçüncü temel makroelement olan potasyum; hücre büyümesinde, enzim, protein, selüloz ve vitaminler gibi moleküllerin salgılanmasında kilit rol oynamaktadır (Verma vd. 2017).

Potasyum toprakta suda çözünür, değişebilir, değişmez ve mineral olmak üzere dört formda bulunur. Suda çözünür potasyum, bitkiler ve mikroorganizmalar için direkt alınabilir formdadır. Ancak yıkanarak kaybolma potansiyeli vardır. Kil minerallerine ve humik maddelere elektrostatik olarak bağlanmış olan değişebilir formdaki potasyum, bitkiler tarafından kolayca alınabilir özelliktedir (Barre vd. 2008). Ancak bu formlar toprakta bulunan potasyumun; sırasıyla, yaklaşık % 0,1-0,2 ve % 1-2'sini oluştururlar (Sparks 1987). Değişmez ve mineral formdaki potasyum bitkiler tarafından çok yavaş alınır ya da hiç alınmaz (Pal vd. 2001). Topraklarda potasyum, en fazla mika (muskovit, biotit) ve feldispat gibi birincil yapılara bağlı şekilde mineral formda bulunur. Potasyum feldispat, potasyumu toprak çözeltisine direkt olarak verebilirken, mikalar içerisindeki potasyum elektrostatik güçlerle sıkıca tutulur. Ana kayadan oluşan K-feldispat ve mikalardan oluşan ikincil toprak mineralleri, bitki tarafından alınabilir potasyumun kaynağıdır (Singh ve Goulding 1997).

Toprak mikroorganizmaları potasyumun çevriminde, çözünmez formdaki potasyumu bitkinin kullanabileceği forma dönüştürebildikleri için, kilit rol oynamaktadır. *Acidithiobacillus*, *Agrobacterium*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Myroides*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, ve *Sphingomonas* cinslerine dahil bazı türlerin potasyum çözücü özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Verma vd. 2017).

Potasyum çözücü bakteriler (KSB), salgıladıkları organik asitler vasıtasıyla direkt potasyum bileşiklerini çözebilir ya da silikon ve alüminyum gibi katyonları şelatlayarak potasyumun serbest kalmasını sağlayabilirler. Potasyum çözücü bakteriler sitrik asit, tartarik asit ve glukonik asit gibi organik asitleri salgılamaları sonucu, potasyumu

feldspar ve illite çözüdürerek bitkilerin kolayca alabileceği forma dönüştürürler. Mineral fosfatın çözünmesinde en etkili asitler, glikolik ve suksinik asit olarak bilinmektedir (Prajapati ve Modi 2012, Zarjani vd. 2013).

2.3.4 Siderofor üretimi

Demir (Fe); fotosentez, solunum, klorofil biyosentezi ve biyolojik azot fiksasyonu gibi birçok prosese katkı sağladığı için, bitkiler ve mikroorganizmalar için önemli bir mikroelementtir (Dixon ve Kahn 2004). Demir, toprakta yer alan en yaygın 4. element olmasına rağmen, oksijenli ortamlarda mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından alınamayan, hidroksi ve oksihidroksi Fe^{+3} iyonları şeklinde bulunur (Rajkumar vd. 2010). Mikroorganizmalar ve bitkiler, yüksek miktarda demire ihtiyaç duyduklarından, yeterli demir eldesi için yarış içindedirler. Fe'in çevreden biyoalımının düşük olmasından dolayı, mikroorganizmalar siderofor üretmek gibi spesifik stratejiler geliştirmişlerdir. Sideroforlar; özellikle Fe'in sınırlı olduğu durumlarda mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından üretilen düşük moleküler kütleli (200-2000 Da) sahip metal şelatlayıcı ajanlardır (Schwyn ve Neilands 1987). Demiri mineral ve organik bileşiklerden ayırmak için çözücü olarak davranan sideroforlar; *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* ve *Rhizobium* gibi birçok bakteri tarafından sentezlenirler (Glick vd. 1999, Loper ve Henkels 1999).

Sideroforlar, ferrik iyonları koordine etmek için yüksek afiniteli bir ligand kümesi sağlayabilen, yan zincirler ve fonksiyonel gruplar içeren küçük peptidik moleküller olarak tanımlanırlar (Crosa ve Walsh 2002). Bakteriyal sideroforlar; yapısal özellikleri, ligand tipleri ve demirle uyumlu fonksiyonel gruplarına göre; katekolatlar, karboksilatlar ve hidroksamatlar olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılmaktadırlar (Matzanke 1991, Crowley 2006). Bunların yanısıra; ana fonksiyonel grupların karışımını içeren bakteriyel sideroforlar da vardır (Cornelis 2010). Bilinen 500'e yakın siderofordan yaklaşık 270 tanesinin kimyasal yapısı tanımlanmıştır (Neilands 1981, Hiden ve Kang 2010).

Demirin siderofor aracılığıyla çözünmesi ile ilgili farklı mekanizmalar öngörülmektedir. En genel mekanizma; siderofor-Fe (III) kompleksinin mineral yüzeyde oluşması, daha sonra çevresindeki toprak çözeltisine aktarılması ve mikroorganizmalar veya bitkiler tarafından alınabilmesi için uygun hale gelmesi, şeklinde özetlenebilir (Kalinowski vd. 2000, Kraemer 2004).

Mikroorganizmalarda, siderofor aracılı demir alımı, hem reseptöre ve hem de enerjiye bağımlı bir süreçtir (Sigel ve Sigel 1998). Mikroorganizmalar farklı siderofor-Fe transfer sistemlerine sahiptir. Bu sistemler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında da farklılık gösterir. Gram-negatif bakteriler, hücre yüzeyindeki siderofor-Fe (III) kompleksini tanıyan TonB bağımlı dış membran reseptörleri içerirler (Krewulak ve Vogel 2008). Fe-siderofor kompleksi, dış membran reseptör proteinleri FecA ve FepA aracılığıyla hücre içine alınır. Daha sonra ATP bağlanma kaseti (ABC) transport sistemi olarak adlandırılan FecC,D,E ve FepC,D,E proteinlerine transfer edilir ve Ton B membran proteininin yardımı ile siderofor-Fe kompleksi sitoplazmaya taşınır (Davidson ve Nikaido 1991, Boos ve Eppler 2001). Gram-pozitif bakterilerde dış membran reseptörleri yoktur. Bu nedenle siderofor-Fe (III) kompleksi; periplazmik boşluk olmadığı için, hücre zarına tutunmuş periplazmik siderofor bağlayıcı proteinler tarafından tutulur (Fukushima vd. 2013). Daha sonra Gram negatif bakterilerde olduğu gibi, sitoplazmaya taşınır (Braun ve Hantke 2011).

Bitki rizosfer bölgesindeki sideroforların en önemli biyoteknolojik kullanımı, bitkiye demir sağlamak ve kökü istila eden parazitlere karşı ilk savunma görevi görmektir. Mikrobiyal sideroforların, Fe alımının düşük olduğu durumlarda bitkilere Fe sağladığı bilinmesine rağmen, bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır (Crowley 2006). Bitkilerin, mikrobiyal sideroforlar aracılığıyla Fe alımına ilişkin iki muhtemel mekanizma önerilmektedir. Bunlardan birincisi, yüksek redoks potansiyeline sahip mikrobiyal sideroforlardır ve bunlar Fe (II)'nin bitkinin taşıma sistemine geçişini azaltır. Bu mekanizmada; mikrobiyal siderofor-Fe(III) kompleksi, sideroforun demirden ayrıldığı düşünülen bölge olan bitki köklerindeki apoplasta taşınır (Mengel 1995). Sonuç olarak kökte yüksek Fe konsantrasyonunun artışına sebep olan Fe (II) apoplastta kalır (Kosegarten vd. 1999). İkinci mekanizmada ise; mikrobiyal sideroforlar topraktaki

demiri şelatlar ve sonra fitosideroforlar ile ligand değişimi yapar (Masalha vd. 2000). Bu mekanizma; mikrobiyal sideroforların ve fitosideroforların kararlılığı, konsantrasyonu ve kök çevresinin redoks potansiyeli ve pH durumu gibi birçok parametreye bağlıdır (Crowley 2006).

Sideroforlar sadece demir ile değil; Al, Cd, Cu, Pb ve Zn gibi ağır metallere de kompleks oluştururlar (Neubauer vd. 2000, Kiss ve Farkas 1998). Sideroforların bu özellikleri, Fe dışındaki belirli metallere için güçlü bir afinite ve seçiciliğe sahip olabileceği anlamına gelen ligand fonksiyonlarından kaynaklıdır (Hernlem vd. 1999). Böylece sideroforlar, biyoremedasyon sağladığı gibi, bitkilerin ağır metal stresini de hafifletmiş olur (Belimov vd. 2005, Diels vd. 2002).

2.3.5 Bitkisel hormon üretimi

Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler, bitki düzenleyicileri olarak da adlandırılan bitki hormonlarını sentezleyip salgılayarak bitki büyümesi ve gelişmesinde düzenleyici rol oynarlar. Bitki düzenleyicileri, bitkilerin fizyolojik süreçlerini son derece düşük konsantrasyonlarda dahi etkileyebilen organik moleküllerdir (Dobbelaere vd. 2003). En iyi bilinen bitki düzenleyicileri; oksinler, gibberellinler, sitokinler, etilen ve absisik asit olarak beş sınıfa ayrılmaktadırlar (Zahir vd. 2004) .

2.3.5.1 Oksinler

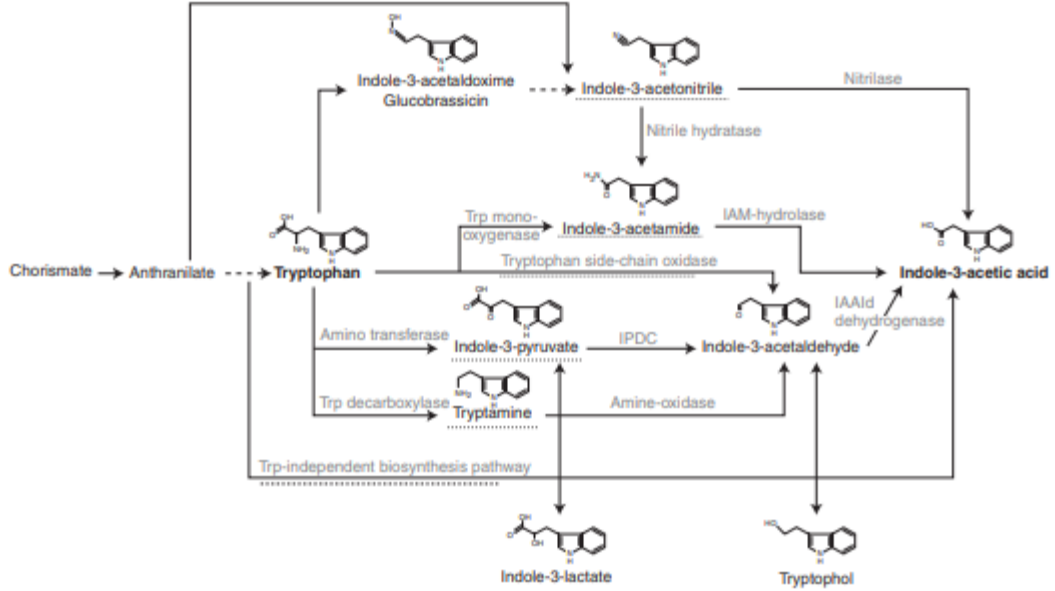
Oksinler, bitkinin hayatındaki birçok büyüme ve fizyolojik sürecin koordinasyonunda temel bir rol oynayan, bitki gelişimi için gerekli olan bitki hormonlarıdır. Indol-3-asetik asit (IAA) bitkiler, bakteriler ve funguslar tarafından üretilen ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış doğal oksindir. IAA, bitki hücre bölünmesini, büyümesini ve farklılaşmasını etkiler, tohum ve yumru çimlenmesini uyarır, ksilem oranını ve kök gelişimini artırır, vejetatif büyümeyi kontrol eder, ışığa, yerçekimine tepkilere aracılık eder, fotosentez, pigment oluşumu ve çeşitli metabolitlerin biyosentezini etkiler ve stres koşullarına karşı bitkiyi korur (Tsavkelova 2006, Spaepen ve Vanderleyden 2011).

Çeşitli bitki rizosferlerinden izole edilen mikroorganizmaların yaklaşık % 80'inin sekonder metabolit olarak oksin sentezlediği ve salgıladığı bilinmektedir (Patten ve Glick 1996). *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Arthrobacter* cinslerine dahil bakterilerin, bazı aktinomisetler ve fungusların IAA üreterek bitki büyümesini teşvik ettiğine dair birçok bilimsel veri mevcuttur (Khamna vd. 2010, Reineke vd. 2008).

Bakteriler tarafından salgılanan IAA'nın, bitkiler tarafından alınması sonucu bitki IAA havuzu değişir ve böylece bakteriler tarafından salgılanan IAA birçok bitki gelişim sürecine etki etmiş olur (Spaepen vd. 2007, Glick 2012). Bunların yanısıra bakteriyal IAA kök yüzey alanını ve boyunu arttırarak, bitki besin elementlerinin alımını teşvik eder ve bitki hücre duvarlarını gevşeterek, rizosfer bakterilerinin büyümesini desteklemek için ek besin sağlayan kök salgılarını arttırır (Glick 2012).

IAA triptofan bağımlı veya triptofan bağımsız olmak üzere iki farklı yolla sentezlenebilmektedir. IAA'nın ana öncüsü olarak tanımlanan triptofan, IAA biyosentezinin seviyesini değiştiren en önemli moleküldür (Zaidi vd. 2009). Bakterilerde IAA sentezi kök salgılarındaki öncüllerin varlığına bağlıdır. Triptofan bağımlı IAA sentezinde, genetik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak, değişik ara ürünler ile karakterize edilen farklı yollar tanımlanmıştır. Bilinen başlıca 5 yolağın olmasına rağmen, bu yolağlardaki tüm genler, kodlanmış enzimler ve ara ürünler henüz belirlenememiştir (Şekil 2.4). Çeşitli patojenlerde bulunan Indol-3-asetamid (IMA) aracılı IAA yolağı, yüksek miktarlarda IAA üreterek bu suşların virülansına katkıda bulunmaktadır. Bu yolağa aynı zamanda azot fikseri *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* türlerinde de rastlanmıştır. Indol-3-pürivat (IPA) bitkilerde oksin üretimi için ana yolağdır. Bu yolağa bazı fitopatojenlerde, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* ve *Rhizobium* gibi bitkiye faydalı bakterilerde ve siyanobakterilerde rastlanmaktadır. Triptamin yolağında, triptofan öncelikle triptamine dekarboksile edilir ve sonrasında aminoksidazlar tarafından IAA'ye dönüştürülür. Bir diğer yolağ olan indol-3-asetonitril (IAN) yolağı bitkilerde uzun yıllardır çalışılmış, ancak halen tam anlamı ile açıklanamamıştır. Bakterilerde ise IAN yolağına özgü bazı nitrilazlar tespit edilmiştir. Triptofan sentez izyolu mutantlarının

analizi, bitkilerin triptofan öncüsü olmadan da IAA'yı sentezleyebildiğini göstermiş ve bu triptofan bağımsız yolaktaki dallanma noktasının, indol-3 gliserol fosfat veya indol olduğu ortaya konmuştur (Spaepen ve Vanderleyden 2011).



Şekil 2.4 IAA sentezi yolları (Ahemad ve Kibret 2014)

2.3.5.2 Sitokininler

Sitokininler, tanımlaması ve miktar tayini zor olan ve bitkilerde genellikle düşük miktarlarda bulunan, önemli bitki hormonlarıdır. Bitkiler üzerindeki en önemli etkileri; hücre bölünmesini, kök gelişimini ve kılcal kök oluşumunu teşvik etmektir (Frankenberger ve Arshad 1995). Bu molekül, endojen olarak bitkiler tarafından üretilebilmekte veya eksojen olarak BBTER'ler yoluyla edinilebilmektedir (Pospisilova 2003). Bitkiler ve mikroorganizmalar, 30'dan fazla bitki büyümesini teşvik eden sitokinin grubu bileşik sentezleyebilmektedir. Rizosferde bulunan mikroorganizmaların yaklaşık % 90'ının in vitro şartlarda sitokinin sentezleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Barea vd. 1976).

2.3.5.3 Gibberellinler

Gibberellinler; kök uzaması, endosperm metabolizması, tohum çimlenmesinin desteklenmesi ve meyve gelişimi gibi birçok önemli bitki fonksiyonunun yerine getirilmesinde rol almaktadır (George vd. 2008). Gibberellinler; mantarlar ve bitkiler tarafından sentezlenmenin yanı sıra, bakteriler tarafından da sentezlenirler (MacMillan 2002). Bitkilerde, fotosentetik işlemlerin gerçekleşmesinde hayati rolleri nedeniyle gibberellinler ve üretici cinsler, birçok bitkinin stres toleransını artırabilen önemli bitki gelişimi biyodüzenleyicileri olarak kabul edilirler (Kang vd. 2009). BBTER'lerin, gibberellik asidin sentezi yoluyla bitki büyümesini nasıl arttırdığına dair kesin mekanizmalar henüz anlaşılmamıştır. 100 den fazla gibberellin bilinmekte olup, en yaygın olarak tanınan gibberellin, GA3 olarak da adlandırılan gibberellik asittir. Bitkilerde en aktif gibberellin ise, kök uzamasından sorumlu olan GA1'dir (Davies 1995).

2.3.5.4 Etilen

Etilen, bitki büyümesi, gelişimi ve olgunlaşması ile ilgili tüm mekanizmaların düzenlenmesinde görev alan, düşük konsantrasyonlarda etki gösteren ve endojen olarak üretilen, gaz halindeki bir fitohormondur (Saleem vd. 2007). Etilen, olgunlaşma hormonu olarak tanınmasına ek olarak, kök ve kılcak kök oluşumunu da teşvik edebilmektedir. Ayrıca, çimlenmeyi uyarır ve tohumların dormansini bozar (Esashi 1991). Bununla birlikte, eğer çimlenmeden sonra etilen konsantrasyonu yüksek kalırsa, kök uzaması inhibe olur (Jackson 1991).

2.3.5.5 Absisik asit

Absisik asidin stoma kapanmasındaki birincil rolü ve bitki tarafından alımı ve taşınması iyi tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, absisik asidin kurak ve yarı kurak iklimler gibi su stresi yaşanan ortamlarda rizosferde bulunmasının, bitki gelişimi için son derece önemli olduğu kanıtlanmıştır (Frankenberger ve Arshad 1995).

2.4 Dolaylı Mekanizmalar

Dolaylı mekanizmalar, bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin, bitkilerin doğal direncini artıran maddeler üreterek fitopatogenlerin bitkiler üzerindeki zararlı etkilerini önlemesi ve ayrıca bitkilerin çevresel stres altında (abiyotik stres) aktif olarak büyümesine veya bitkilerin enfeksiyonlardan (biyotik stres) korumasına yardımcı olan bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Akhgar vd. 2014, Singh ve Jha 2015).

Bitki hastalıklarının etkisini azaltan faydalı toprak mikroorganizmalarının kullanılması, biyolojik kontrol olarak adlandırılırken; kullanılan bu mikroorganizmalar, biyokontrol ajanları olarak tanımlanmaktadır (Kandel vd. 2017). Bir patojene karşı inhibisyon etkisine sahip olan mikroorganizmalar ise, antagonistler olarak adlandırılmaktadır (Dixon ve Kahn 2004).

Bakteriyal biyokontrol ajanlarının antagonistik aktiviteleri; patojenik mantar hücrelerini parçalayabilen kitinazlar, glukanaazlar, proteazlar ve lipazlar gibi hidrolitik enzimlerin sentezi, besin ve yaşam alanı için rekabet, bitkide etilen seviyesini modüle etmeye etki eden ACC seviyesinin ACC-deaminaz enzimi ile düzenlenmesi, siderofor ve antibiyotik üretimi, uyarılmış sistemik direnç gibi mekanizmaları içermektedir (Beneduzi vd. 2013). Bunların yanısıra hidrojen siyanür üretimi de etkili mekanizmalardan biridir. Siderofor, bakteriyosin ve antibiyotik sentezi, bir antagonistin fitopatogen proliferasyonunu en aza indirmek veya önlemek için kullanabileceği en etkili ve en iyi bilinen mekanizmalardan üçüdür (Dixon ve Kahn 2004).

2.4.1 Antibiyotik üretimi

Antibiyotikler, bitkilerde toprak kaynaklı enfeksiyonların baskılanmasında rizobakterilerin sahip olduğu oldukça etkili bir mekanizmadır (Handelsman ve Stab 1996). Bakteriler tarafından farklı antibiyotiklerin sentezi, bitki patojeninin, genellikle mantarların çoğalmasını önleme kabiliyetiyle ilişkili bir özelliktir (Compant vd. 2005).

Çoğu biyolojik kontrol ajanı BBTER'ler, mantar patojenlerini inhibe eden bir veya birkaç antibiyotik grubu üretmektedirler (Haas ve Defago 2005).

Bacillus sp. ve *Pseudomonas sp.* antibiyotik üreterek patojen mikroorganizmaları inhibe eden BBTER'lerin başında gelmektedir (Ulloa-Ogaz vd. 2015). Mantar ve bakteri süşlarından izole edilmiş çok sayıda antibiyotik, patojenlerin hücre duvarı sentezini önleyen, hücrelerin zar yapılarını bozan ve ribozomun küçük alt biriminde protein sentezi başlatma komplekslerinin oluşumunu engelleyen etki mekanizmalarına sahiptir (Maksimov vd. 2011).

Mikrobiyal savunma sistemlerinde kullanılan bakteriyosinler; Riley ve Wertz (2002) tarafından yapılan bir incelemeye göre, geleneksel antibiyotiklerden farklı olarak, genellikle antagonistik spektrumuna sahiptirler ve sadece üreten tür ile yakından ilişkili bakteriler için toksiktirler.

2.4.2 Litik enzim sentezi

Biyokontrol ajanları tarafından toprak kaynaklı patojenleri kontrol etmek için kullanılan ana mekanizmalardan bir diğeri, hücre duvarı yapısını parçalayan enzimlerin üretilmesidir (Kobayashi vd. 2002). Kitinaz, selülaz, $\beta\beta$ -1,3 glukanaz, proteaz ve lipazlar gibi litik enzimleri sentezleyen biyokontrol bakterileri, birçok patojenik mantarın hücre duvarını parçalama yeteneğindedir. Kitinaz ve $\beta\beta$ -1,3 glukanaz, fungal hücre duvarının ana bileşeni olan çözünmeyen lineer yapılı b-1, 4-N asetilglukozaminin polimeri olan kitini parçalar. Böylece rizobakteriler, hedef patojenin hücre duvarlarının yapısal bütünlüğünü etkilemiş olur (Budi vd. 2000)

Bu enzimlerin birini veya birçoğunu sentezleyebilen bakteriler; *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfisii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* gibi patojenik funguslara karşı biyokontrol aktivitesi göstermektedir (Frankowski 2001).

2.4.3 Siderofor üretimi

Sideroforlar zararlı pestisitlere karşı, çevre dostu alternatifler olarak da bilinmektedirler (Schenk vd. 2012). Bakteriler tarafından salgılanan siderofor, bitkiye besin elementi olarak katkı sağlamasının yanısıra (doğrudan etki), ortamdan demiri uzaklaştırmak suretiyle bitki patojenlerinin eliminasyonunu gerçekleştirerek de etki gösterebilir (dolaylı etki). BBTER'lerin salgıladıkları sideroforlar, bazı fitopatojenlerin yeterli miktarda demir almasını önleyerek, çoğalma kabiliyetlerini sınırlar. Bu mekanizmanın, sideroforların demire karşı patojen funguslardan daha fazla afiniteye sahip olmalarından dolayı etkili olduğu düşünülmektedir (Klopper vd. 1980). Patojenlerin baskılanması; demir eksikliğinden kaynaklanan büyümenin baskılanması, nükleik asit sentezininin düşmesi, sporülasyonun inhibisyonu ve hücre morfolojisinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Mathiyazhagan vd. 2004). Biyokontrol amacıyla kullanılan rizobakteriler arasında floresans özellik içeren *Pseudomonas* türleri, farklı bitkilerin rizosferindeki demir için (Fe^{+3}) en önemli yarışmacıları teşkil etmektedir. Söz konusu rizosferde floresans pigmentli piyoverdinler (psöyodobaktinler) ve floresans olmayan piyokellinler olmak üzere iki ana tip siderofor bulunmaktadır (Lemanceau vd. 1993, Leeman vd. 1995).

2.4.4 Hidrojen siyanür (HCN) üretimi

HCN, iyi çalışılmış uçucu bir biyokontrol ajanıdır. HCN, Gram negatif bakteriler tarafından, HCN sentaz aracılığı ile glisinden üretilen bir sekonder metabolittir (Castric 1994). Siyanür iyonu, metalloenzimleri, esas olarak da sitokrom c oksidazdaki bakırı inhibe eder (Blumer ve Haas 2000).

2.4.5 Yarışma

Bazı dolaylı kanıtlar, patojenler ile BBTER'ler arasındaki rekabetin, bitkilerde hastalık etkisini ve şiddetini sınırlayabileceğini göstermektedir. Yararlı toprak bakterileri bitki yüzeylerini hızlı bir şekilde kolonize eder ve mevcut besinlerin çoğunu kullanarak

patojenlerin büyümesini zorlaştırır (Glick 2012). BBTER'ler besin kullanımı sonucu teşvik ettiği doğal büyümenin yanı sıra; içerdikleri flagellar yapılar, lipopolisakkaritler, kemotaksi yetenekleri ve salgılanan kök eksüdalarının kullanılması gibi diğer özelliklerinin de rekabeti arttırdığı saptanmıştır (Lugtenberg ve Kamilova 2009).

2.4.6 ACC deaminaz aktivitesi

Bitkiler tipik olarak, stresin bitki üzerindeki etkilerini arttıran etileni sentezleyerek fitopatojenlerin varlığına yanıt verirler (Abeles vd. 1992). Bitkilerde fitopatojenlerin neden olduğu zararı azaltmanın bir yolu bitkinin etilen tepkisini azaltmaktır (Glick ve Bashan 1997). Bunu başarmanın en basit yöntemi ise; ACC deaminaz sentezleyen BBTER'lerin varlığının artırılmasıdır (Glick vd. 1998).

Etilen, bitki büyüme düzenleyicisi olmasının yanı sıra, aynı zamanda stres fitohormonu olarak da işlev görmektedir. Abiyotik ve biyotik stres koşullarında (patojen hasarı, sel, kuraklık, tuz, organik ve inorganik kirlenici maddeler dahil), etilen üretimi büyük ölçüde hızlanır ve köklerin büyümesini dolayısıyla bitkinin büyümesini olumsuz etkiler (Souza vd. 2015). Çeşitli çevresel stres koşullarına cevap olarak artan etilen miktarı, stresin bazı septomlarını artırabilmekte veya olumsuz koşullar altında bitki sağkalımını artıran tepkilere yol açabilmektedir.

Bitkilerde etilen seviyesini azaltmayı hedefleyen mekanizmalar, halen önemli bir araştırma konusudur. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri, bakteriler tarafından sentezlenen 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminazın aktivitesinden yararlanmaktır (Farajzadeh vd. 2012). Bu sayede bitkilerde etilen biyosentezinin öncüsü olan ACC'yi hidrolize edilebilmektedir (Yang ve Hoffman 1984). Bitki köklerinden salınan ACC, toprak mikroorganizmaları tarafından alınır ve ACC deaminaz enzimi tarafından hidrolize edilir. Böylece ortamdaki ACC miktarı azalmış olur. Bu hidrolizin ürünleri, amonyak ve asetobutirat, bakteri tarafından büyüme için azot ve karbon kaynağı olarak kullanılır (Klee vd. 1991).

ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu bilinen cinsler arasında *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* ve *Rhizobium* yer almaktadır (Zahir vd. 2009, Kang vd. 2010).

2.4.7 Uyarılmış sistemik direnç

Uyarılmış sistemik direnç (ISR), belirli bir çevresel uyarana yanıt şeklinde ortaya çıkan gelişmiş bir savunma mekanizması olarak tanımlanmış, fizyolojik bir durumdur. Bir savunma mekanizması olan sistemik kazanılmış dirençten (SAR) farklı olarak, ISR patojenlerin primer enfeksiyonunu takiben, tüm bitkide aktive olur (Ryals vd. 1996). ISR ve SAR farklı sinyal yollarından etkilenen mekanizmalardır. SAR, salisilik asit (SA) ve ISR indüksiyonu, jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) sinyal yollarına gereksinim duyar (Van Loon vd. 1998).

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler, birçok bitkide çeşitli çevresel streslere karşı sistemik direnç sağlamaktadırlar (Prathap ve Ranjitha 2015). BBTER'lerdeki ISR; salisilik asit, siderofor, lipopolisakarit, flagella, N-asil homoserin lakton molekülleri ve antibiyotik üretimi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu biyolojik kontrol mekanizmasına *Bacillus*, *Pseudomonas* ve enterobakterilerde yaygın olarak rastlanır (Jourdan vd. 2009). ISR pozitif bakteriler, uyarılmış defans mekanizmaları ile patojen ataklarına karşı daha hızlı ve güçlü reaksiyon verirler. ISR, direnç indükleyici BBTER ile patojen arasında herhangi bir doğrudan etkileşim gerektirmez (Bakker vd. 2007). Bitkilerde direnç indüklendiğinde, patojenik mantarlara, bakterilere ve virüslere karşı spesifik olmayan bir koruma ortaya çıkmaktadır (Silva vd. 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Bu çalışmada; Ankara'nın ilçelerinden alınan 26 toprak örneğinden izole edilen 70 adet bakteri suşu, *Staphylococcus aureus*, *E.coli* ATCC 25922 ve *Azotobacter vinelandii* indikatör bakterileri ve bitki patojeni *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium culmarum*, *Pseudomonas tomato* bakteri ve mantarları kullanılmıştır.

Bakteriler nutrient agar ve azotsuz Burk's agar ortamlarında 5 ± 3 °C'de ve nutrient broth'a % 60'lık steril gliserol ilave edilerek, -80 °C'de saklanmıştır. Çalışma materyalleri nutrient broth ortamında 5 ± 3 °C'de haftalık transferlerle korunmuştur

3.1.2 Test bitkisi

Sera denemelerinde test bitkisi olarak Tosunbey buğday (*Triticum sp.*) çeşidi kullanılmıştır. Tosunbey (Ekmeklik Buğday); kılçıklı ve beyaz başaklı, beyaz tanelidir. Alternatif gelişme tabiatlı, soğuğa, kurağa ve yatmaya dayanıklı, gübreye tepkisi iyi olan bir çeşittir. Bin tane ağırlığı 28-35 g, hektolitre ağırlığı 79-80 kg, sedimentasyonu 50-66,3, protein oranı % 13-14, yumuşama değeri 55-80 arasında olup, ekmeklik kalitesi olarak 1. sınıfta yer almaktadır. Sarı ve kara pasa dayanıklıdır. İç Anadolu ve Geçit bölgelerinin taban ve yarı taban alanlarına önerilmektedir (Anonim 2019).

3.2 Yöntem

3.2.1 Toprak örneklerinin alınması

Bakteri izolasyonu için kullanılacak olan topraklar, Ankara ilinin farklı noktalarındaki mera alanlarından Mayıs-Temmuz aylarında rastgele örnekleme ile, iyi gelişme

göstermiş bitkilerin rizosfer toprağından 0-20 cm derinlikten alınmıştır. Yaklaşık 1 kg alınan toprak numuneleri, +4⁰ C’de laboratuvara transfer edilmiş ve analize alınincaya kadar +4⁰ C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel analizleri

Alınan toprak numunelerinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için yapılan analizler, 2 mm elekten geçirilmiş hava kuru toprakta gerçekleştirilmiştir.

Toprak bünyesi: Bu testte ıslak elemeli Bouyoucos yöntemi kullanılmış ve analiz sonuçlarına göre bünye sınıfının belirlenmesinde toprak sınıflandırma üçgeninden yararlanılmıştır (Uzunoğlu 1992).

-Elektriksel İletkenlik (EC, dS/m): Richards (1954) tarafından önerildiğı şekilde hazırlanan su ile doymuş toprakta tespit edilmiştir.

-Toprak reaksiyonu (pH): Richards (1954) tarafından önerildiğı şekilde hazırlanan su ile doymuş toprakta gerçekleştirilmiştir.

-Kireç (%): Çağlar (1949) tarafından önerildiğı şekilde HCl ile muamele edilmiş toprak örneğı Scheibler Kalsimetresi ile analiz edilmiştir.

-Organik madde (%): Richards (1954) tarafından önerildiğı şekilde, modifiye edilmiş Walkley-Black yöntemine göre, FeSO₄ ile titre edilerek saptanmıştır.

-Toplam N (%): Dumas metoduna göre, elementer analiz cihazı (Leco truspec CHN-S ABD) ile toprak numunesinin yüksek sıcaklıkta yakılması gerçekleştirilmiş ve elementer forma dönüşen azot tespit edilmiştir.

-Bitki tarafından alınabilir fosfor (kg/da) : Olsen vd. (1954) tarafından önerildiğı şekilde, 0,5 M Sodyum bikarbonat ile ekstrakte edilerek belirlenmiştir.

-Bitki tarafından alınabilir potasyum (kg/da): Richards (1954) tarafından önerildiği şekilde 1 N Amonyum asetat ile ekstrakte edilen toprak numunesinin içerdiği alınabilir potasyum, flame fotometrede belirlenmiştir.

3.2.3 Topraktan bakteri izolasyonu

Aseptik koşullarda laboratuvara getirilen toprak örnekleri, steril kaplarda net ağırlıkları 10 g olacak şekilde tartılarak, 90 mL steril fizyolojik su (% 0,9 NaCl) içeren 250 mL'lik cam şişelere aktarılmıştır. Tam homojenizasyonun sağlanması amacıyla 30 dk çalkalanan örneklerin 10^{-8} düzeyine kadar hazırlanan seri dilüsyonlarından 100 µL alınarak, iki paralelli olacak şekilde azotsuz Burk's Agar ve Nutrient Agar içeren Petri'lere yayma ekim yöntemiyle inoküle edilmiş ve ortamlar 28 ± 2 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda farklı koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçilmiş ve saflaştırılmak amacıyla, azotsuz Burk's agar ve Nutrient Agar ortamına çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve tekrar 28 ± 2 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen saf suşlar, Nutrient broth ve azotsuz Burk's broth besiyerlerine aktarılmış ve kod numaraları verilmiştir (Somasegaran ve Hoben 1994, Upadhyay vd. 2009).

Nutrient Broth ve Agar (Merck, Germany)

Et ekstraktı	1	g
Maya ekstraktı	2	g
Pepton	5	g
NaCl	5	g
Distile su	1000	mL
Agar agar	15	g

Sterilizasyon, 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

pH $7,4 \pm 0,2$ (sterilizasyondan önce)

Azotsuz Burk's Broth ve Agar (Subba Rao 1977)

Magnezyum sülfat	0,2	g
Dipotasyum fosfat	0,8	g
Monopotasyum fosfat	0,2	g

Kalsiyum sülfat	0,13	g
Ferrik klorit	0,00145	g
Sodyum molibdat	0,000253	g
Sükroz	20	g
Distile su	1000	mL
Agar agar	15	g

Sterilizasyon, 121 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

3.2.4 Bakterilerin tanımlanması

3.2.4.1 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu

İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonları; Gram boyanma özellikleri, katalaz, oksidaz ve üreaz testi sonuçlarına göre yapılmıştır.

Katalaz testi için, Nutrient Agar ortamında geliştirilen koloniler öze yardımı ile alınarak lama aktarılmış, üzerine % 30’luk H₂O₂ damlatılmış ve mikroskop altında gaz kabarcıklarının çıkışı gözlenmiştir. Oksidaz testi için, Nutrient Agar ortamında geliştirilen kolonilerin üzerine % 1’lik tetrametil-p-fenilendiamin damlatılmış ve mavi renk dönüşümü pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Üreaz testi için ise, üre içeren agar besi ortamına mikroorganizma ekimi yapılmış ve 48 saat inkübasyon sonunda besi ortamının kırmızı/pembe renge dönüşümü pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Holt vd. 1994).

Üre Agar Ortamı (Cristensen 1946)

Pepton (et)	1	g
Glukoz	1	g
NaCl	5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Fenol kırmızısı	0,012	g
Distile su	1000	mL
Agar agar	12	g

Sterilizasyon, 121 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Sterilizasyonun ardından üre agar ortamı 45 °C'ye kadar soğutulmuş ve üzerine 50 mL/L olacak şekilde filtreden geçirilmek suretiyle sterilize edilmiş % 40'luk üre çözeltisi eklenmiştir.

3.2.4.2 16S rDNA dizi analizi

İzolatların 16S rDNA dizi analizi esasına göre tanımlanması; genomik DNA izolasyonu, 16S ileri (5'-3') ve 16S geri (3'-5') evrensel primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgelerinin çoğaltılması, çoğaltılan bölgelerin baz dizilimlerinin belirlenmesi ve elde edilen bulguların veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz sıraları ile karşılaştırılması sonucu, gerçekleştirilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu için, izolatlar 10 mL Nutrient broth ortamına % 1 oranında inoküle edilmiş ve 28±2 °C'de 150 rpm çalkalama hızında 24 saat süre ile geliştirilmiştir. Bu süre bitiminde 1.5 mL kültür mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 12500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Üst sıvı ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücre çökeltisi 567 µL Tris EDTA tampon içerisinde çözülmüştür. Üzerine 30 µL % 10 SDS ve 3 µL proteinaz K aktarılıp karıştırılmış ve 37 °C'de 1 saat tutulmuştur. Bu aşamadan sonra ortam, 100 µL 5M NaCl ilave edilerek karıştırılmıştır ve 80 µL CTAB/NaCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu ortam kesik mikropipet uçları kullanılarak beyaz partikül yapısı oluşuncaya kadar iyice karıştırılmış ve 65 °C'de 10 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi bitiminde ortam üzerine 0.75 mL kloroform/izoamil alkol (24/1 hacim/hacim) aktarılıp tekrar karıştırılmış ve 12500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek, oluşan üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Alınan üst faz üzerine 0.75 mL fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1 hacim/hacim) ilave edilmiş ve 12500 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin sonunda tüplerdeki üst sıvı yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bu sıvının üzerine, toplam hacmin 0.6'sı (~350 µL) oranında izopropanol ilave edilmiştir. Tüpler beyaz çökelti oluşuncaya kadar öne arkaya hareket ettirilerek karıştırılmıştır. Daha sonra 12500 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti üzerine 350 µL % 70'lik etanol eklenerek tekrar 12500 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Üst sıvı dikkatli bir şekilde ortamdan

uzaklaştırılmış ve kromozomal DNA örneği oda sıcaklığında kurutulmuştur. Son aşamada DNA çözeltisi 100 µL TE tampon içerisinde yaklaşık 1 saat muamele edilerek çözülmüştür (Wilson 2001). Genomik DNA ların saflık durumu nanodrop ölçümü yapılarak ve % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Elde edilen genomik DNA örnekleri PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Toprak kaynaklı bakterilerden izole edilen genomik DNA üzerindeki 16S rDNA bölgeleri; 16S ileri (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') ve 16S geri (5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3') primerler kullanılarak (Edwards vd. 1989), thermal cycler (Techne- TC-512, England)'da çoğaltılmıştır. Bu amaçla, toplam hacim 50 µL olacak şekilde, sırasıyla; 34.75 µL moleküler steril su, 5 µL 10xPZR tamponu, 1 µL deoksinükleotidtrifosfat (10 mM dNTP) karışımı, 1 µL 16S ileri ve 1 µL 16S geri primer, 0.25 µL Taq DNA polimeraz enzimi, 4 µL 25 mM MgCl₂ ve 3 µL genomik DNA ilave edilip, tüm bileşenler pipetle iyice karıştırılmıştır. PZR tüpleri, cihaza yerleştirilerek bir çevrimi; 95 °C'de 45 saniye (zincirin açılması), 55°C'de 45 saniye (bağlanma), 72 °C'de 2 dakika (zincir uzaması) ile tanımlanan, toplam 35 çevrimlik PZR protokolü uygulanmıştır (Blaiotta vd. 2002).

Elde edilen PZR ürünleri % 1 agaroz içeren jelde yürütülmüş ve 16S rDNA gen bölgesini içeren DNA fragmentlerinin büyüklükleri 100 bp'lik (Solis Bio) marker kullanılarak tanımlanmıştır.

PZR ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizleri BM Biyoteknoloji (Ankara/Türkiye) tarafından yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmış, tarama sonucu aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir. 16S rDNA bölgelerine göre filogenetik ağaç; elde edilen sekansların Clustal W kullanılarak hizalanmasının (aligned) ardından, UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) metodu kullanılarak MEGA X programında oluşturulmuştur.

3.2.4.3 Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA:Amplified rDNA Restriction Analysis)

İzolatlardan 16S rDNA gen bölgelerinin HaeIII (BsuRI), AluI, MspI (HpaII) (Thermo scientific) restriksiyon enzimleri ile kesim işleminin gerçekleştirilmesi için, çizelge 3.1’de verilen protokol takip edilmiştir. Enzim ile muamele edilen PZR ürünleri, 37 °C’de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında restriksiyon endonükleazların aktivitesini sonlandırmak amacıyla, PZR tüpleri 80 °C’de 20 dakika bekletilmiştir. Kesimi tamamlanmış PZR ürünleri % 2,5 agaroz içeren jelde yürütülmüş ve agaroz jel üzerinde oluşan bantlar görüntülenmiştir (Upadhyay vd. 2009).

Çizelge 3.1 Enzim kesim protokolü

Reaksiyon Bileşenleri	µL
PZR ürünü	10
NF su	18
Enzim Tamponu	2
Enzim	1

Jel görüntüleri Phoretix 1D yazılımı (Total Lab, UK) kullanılarak analiz edilmiştir. İzolatlar arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram; kesim ardından oluşan bantlar arasındaki benzerliğin “Dice product moment correlation coefficient (Dice korelasyon katsayısı)” değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra, UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılması sonucu çizilmiştir.

3.2.5 Bakterilerin azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenmesi

3.2.5.1 Kantitatif yöntemler

Bakterilerin azot fikse etme yetenekleri belirlemek için öncelikle azotsuz besi ortamında gelişme durumları gözlenmiş, daha sonra Bremner (1965) tarafından önerilen mikro

Kjeldahl metodu kullanılarak azot fiksasyon miktarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, azotsuz Burk's besi ortamında 18-24 saat süreyle aktive edilen kültürlerden, 20 mL azotsuz Burk's broth besiyerlerine % 1'lik inokülasyonlar yapılmış ve sürekli havalandırılmalı şartlarda, 150 rpm çalkalama hızında, 28±2 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından bakteri üremesi gerçekleşen kültür ortamındaki azot; bu ortamlardan alınan 5 mL örnek üzerine 15 mL sülfürik asit ve kjeldahl tableti eklendikten sonra, 400 °C'de 2 saat yakılarak ekstrakte edilmiştir. Yakmanın ardından % 4'lük borik asit ve % 50'lik NaOH kullanılarak destilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Destilasyon sonrası 3 damla metil kırmızısı brom krezol yeşili indikatörü damlatılarak ve 0,01 N H₂SO₄ ile titrasyon yapılarak toplam azot miktarları belirlenmiştir (Upadhyay vd. 2015). İzolatlar tarafından fikse edilen azot miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% N = \frac{14x(T - B)xNx100}{Ax1000}$$

N: Standart asidin kesin normalitesi

T: Titrasyonda numune için harcanan standart asit miktarı (mL)

B: Titrasyonda şahit için harcanan standart asit miktarı (mL)

A: Numune ağırlığı (g)

3.2.5.2 *nifH* geninin aranması

nifH gen bölgesinin (360 bp) çoğaltılması için *pol* F 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC - 3' ve *pol* R 5'- ATSGCCATCATYTCRCCGGA - 3' ileri ve geri primerleri kullanılmıştır (Poly vd. 2001). Bu amaçla reaksiyon ortamında toplam hacim 25 µL olacak şekilde, sırasıyla; 15,3 µL moleküler steril su, 2,5 µL 10xPZR tamponu, 0,5 µL deoksiniükleotidtrifosfat (10 mM dNTP) karışımı, 1,25 µL ileri ve 1,25 µL geri primer, 0,2 µL Taq DNA polimeraz enzimi, 2 µL 25 mM MgCl₂ ve 2 µL genomik DNA ilave edilip, tüm bileşenler pipetle iyice karıştırılmıştır. PZR tüpleri, cihaza yerleştirilerek bir çevrimi 94 °C'de 1 dakika (zincirin açılması), 53 °C'de

1 dakika (bağlanma), 72 °C'de 5 dakika (zincir uzaması) ile tanımlanan, toplam 30 çevrimlik PZR protokolü uygulanmıştır.

Elde edilen PZR ürünleri % 1 agaroz içeren jelde yürütülmüş ve *nif H* gen bölgesini içeren yaklaşık 360 bazlık DNA fragmentlerinin büyüklükleri 100 bp marker (Solis bio) kullanılarak tanımlanmıştır.

3.2.6 Bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin fosfor çözme kapasiteleri, Mehta ve Nautiyal (2001) tarafından tanımlanan protokole göre kalitatif olarak belirlenmiştir. İzolatlar, öncelikle NBRIP sıvı besi ortamında 3 gün boyunca, 30±1 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda izolatlar, Ca₃(PO₄)₂ ve pH indikatörü olarak brom fenol mavisi içeren NBRIP katı besi ortamına 10 µL inoküle edilerek nokta ekim yapılmış ve 30±1 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin etrafında oluşan şeffaf zonlar pozitif sonuç olarak kabul edilmiş ve fosfor çözme katsayıları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Perez vd. 2007).

$$\text{Fosfor Çözme Katsayısı} = \frac{\text{koloni çapı} + \text{zon çapı}}{\text{koloni çapı}}$$

Fosfor çözme kapasitesinin kantitatif olarak belirlenmesi için ise; Ca₃(PO₄)₂ içeren 10 mL NBRIP sıvı besi ortamına % 1 bakteri inokülasyonu yapılmış ve bu tüpler 150 rpm karıştırma hızında, 30±1 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri üremesi gerçekleşen tüpler 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı başka bir tüpe alınmıştır. Bu üst sıvılarda fosfor miktarları, ICP – OES (Varian 720) cihazında ölçülmek suretiyle, izolatların fosfor çözme yetenekleri belirlenmiştir. Bakteri inokülasyonu yapılmamış Ca₃(PO₄)₂ içeren NBRIP sıvı besi ortamı, bu denemelerde kontrol olarak kullanılmıştır.

NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) Besiyeri (Nautiyal 1999)

MgCl ₂ ·6H ₂ O	5	g
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,25	g
KCl	0,2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	g
Glukoz	10	g
Bromophenol blue	0,025	g
Agar	15	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyon, 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

pH 6,8 ± 0,02 (sterilizasyondan önce)

3.2.7 Bakterilerin potasyum çözme kapasitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin potasyum çözme kapasiteleri, Aleksandrov besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Kalitatif olarak, Aleksandrov besi ortamına izolatlar nokta ekim yöntemi ile ekilmiş ve 28±2 °C'de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakterilerin etrafında oluşan şeffaf zonlar, pozitif sonuç olarak kabul edilmiş ve Khanderparkar's oranına göre hesaplamalar yapılmıştır.

Khanderparkar's oranı = Şeffaf zon çapı / koloni çapı

Potasyum çözme kapasitesinin kantitatif olarak belirlenmesi için ise, 10 mL Aleksandrov sıvı besi ortamı içeren tüplere % 1 bakteri inokülasyonu yapılmış ve tüpler 150 rpm çalkalama hızında, 28±2 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri üremesi gerçekleşen tüpler 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı başka bir tüpe toplanmıştır. Flame fotometre cihazında kültür üst sıvılarındaki potasyum miktarları ölçülerek, izolatların potasyum çözme yetenekleri belirlenmiştir. Bakteri inokülasyonu yapılmamış Aleksandrov sıvı besi ortamı ise, kontrol olarak kullanılmıştır (Parmar ve Sindhu 2013).

Aleksandrov Besiyeri (Prajapati ve Modi 2012)

Magnezyum sülfat	0,5	g
Kalsiyum karbonat	0,1	g
Potasyum alüminyum silikat	2	g
Ferrik klorit	0,005	g
Kalsiyum fosfat	2	g
Glukoz	5	g
Agar	15	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyon, 121 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

pH 7,2± 0,2 (sterilizasyondan önce)

3.2.8 Bakterilerin siderofor üretme kapasitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin siderofor üretme kapasitelerinin belirlenmesi için, Schwyn ve Neilands (1987) tarafından önerilen Modifiye Chrome Azurol S agar kullanılmıştır. İzolatlar besiyerine nokta ekim yöntemi kullanılarak ekilmiş ve 28±2 °C’ de 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakterilerin etrafında oluşan sarı-turuncu renge dönüşüm, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiş ve oluşan zon çapı (mm) ölçülmüştür.

Modifiye Chrome azurol S (CAS) Agar

Chrome azurol S (CAS)	0,06	g
Demir (III) solüsyonu	10	mL
Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA)	0,073	G
Nutrient agar	18	G
Distile su	990	mL

0,06 g CAS, 50 mL distile suda çözülmüştür. Demir (III) çözeltisi; 0,0027 g FeCl₃.6H₂O, 10 mM 10 mL HCl asit içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 0,073 g HDTMA 40 mL distile su ile çözülmüştür. Bu üç çözelti yavaşça karıştırılıp, meydana gelen mavi sıvı 121 °C’ de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Aynı anda 900 mL’lik Nutrient agar hazırlanmış ve pH 6,8’e ayarlanarak, 121 °C’ de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilize edilen iki çözelti karıştırılarak Petri kaplarına dökülmüştür.

3.2.9 Bakterilerin indol asetik asit (IAA) üretme kapasitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin IAA üretim miktarlarının belirlenmesi için ilk aşamada; % 0,1 triptofan içeren nutrient broth ortamında, 150 rpm çalkalama hızında, 28 ± 2 °C’ de 7 gün inkübe edilen kültürler, 10.000 rpm’ de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve oluşan üst sıvıdan 2 mL alınmıştır. Bu üst sıvı 2 damla ortofosforik asit ve 4 mL Salkowski ayıracı (Gordon ve Weber 1951) eklenerek karıştırılmış ve 30 dakika karanlık bir ortamda renk değişimi için bekletilmiştir. Indol asetik asit ile 10, 20, 30, 40, 50 ppm lik standartlar hazırlanmış ve numune gibi muamele edilmiştir. UV spektrofotometrede (Thermo Scientific Genesys 10S VIS) 530 nm dalga boyunda yapılan okumalar sonucu standart eğri çizilerek IAA miktarları belirlenmiştir (Ahmad vd. 2005).

Salkowski Ayıracı

% 35’lik perklorik asit	50 mL
0,5 M FeCl ₃ çözeltisi	1 mL

3.2.10 Bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Bakterilerin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi için çift kültür deneyi (dual culture assay) yapılmıştır (Berg vd. 2002). Seçilen bitki patojeni fungusların aktif kültürlerinden hazırlanan yaklaşık 5 mm çapındaki agar diskleri, Potato Dextrose Agar ve Nutrient Agar (1:1) besi ortamı içeren Petri’lerin orta noktasına yerleştirilmiştir. Ardından 28 ± 2 °C’ de 2 gün 150 rpm de Nutrient Broth besi ortamında geliştirilen yaklaşık 10^8 kob/mL yoğunluktaki bakteri süspansiyonu, fungal diskten 2,5 cm uzaklığa çift taraflı olarak çizgi ekim yapılmış ve 28 ± 2 °C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri inokülasyonu yapılmamış Petri kutuları kontrol olarak kullanılmıştır. Antifungal aktivite; patojen fungusların gelişiminin engellenmesinin ölçülmesi ile hesaplanmıştır. % inhibisyon aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir;

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(C - T) \times 100}{C}$$

C: Kontrol petrisindeki fungal üremenin çapı

T: Test organizması varlığında fungal üremenin çapı

Potato Dextrose Agar (Merck, Germany)

Potato infusion	4	g
D(+) Glukoz	20	g
Agar	15	g
Distile su	1000	mL

Sterilizasyon, 121 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi için, seçilen bitki patojeni bakterilerin yaklaşık 10^8 kob/mL yoğunluktaki süspansiyonlarından nutrient agar besi ortamına 100 µL yayma ekim yapılmıştır. Bitki patojeni bakterileri içeren Petri plakları üzerine; Nutrient Broth besi ortamında 150 rpm çalkalama hızında, 28 ± 2 °C’ de 2 gün geliştirilen ve yaklaşık 10^8 kob/mL yoğunlukta hücre içeren bakteri süspansiyonları, Petri plaklarına yerleştirilen 5 mm çapındaki steril kağıt diskler üzerine 10 µL damlatılmış ve 28 ± 2 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kağıt disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonu oluşumu incelenerek, sonuçlar değerlendirilmiştir (Jetiyanon ve Kloepper 2002).

3.2.11 Sera denemeleri

Sera denemesinde test bitkisi olarak kullanılan buğday tohumları, yüzey sterilizasyonunu sağlamak için % 2’lik NaOCl ile 3-5 dakika muamele edilmiş ve ardından steril su ile 5-7 kez durulanmıştır. Sterilizasyonu sağlanan tohumlar, optik yoğunluğu OD 620: 0,08 (yaklaşık 10^8 hücre/mL) olan bakteri süspansiyonunda 4 saat bekletilmiştir. Bakteri süspansiyonu ile muamele edilmeyen tohumlar kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Denemede kullanılacak hava kuru topraklar, 121 °C'de 1 saat süre ile sterilize edilmiştir. Denemede 2 kg lık saksılara, 2 cm derinliğe 10 adet tohum ekilmiş ve çimlenmeden sonra saksıdaki bitki sayısı 5'e seyreltilmiştir.

Bitkilerin sulama miktarı; toprağın tarla kapasitesine göre belirlenerek, tartım esasına göre tamamlanmıştır.

10 hafta sonra hasat edilen bitkilerde; bitki boyu, gövde ve kök kuru/yaş ağırlığı gibi büyüme parametreleri ile, kök ve gövde de toplam azot, fosfor, toprakta toplam azot, alınabilir fosfor miktar tayinleri yapılmıştır.

Bitki örneklerinde yapılan analizler;

-Toplam N: Dumas metoduna göre Leco truspec CHN-S elementer analiz cihazında yapılmıştır (Kacar ve İnal 2008).

-Toplam P: Yaş yakma yöntemine göre elde edilen bitki çözeltilisindeki fosfor, vanadomolibdofosforik sarı renk yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Kacar ve İnal 2008).

Denemelerden elde edilen veriler SPSS-22 paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, farklanmaları önemli bulunan verilere Duncan testi uygulanmıştır.

3.2.11.1 Azot fiksasyonu sera denemesi

nif H gen varlığı tespit edilen H8/2 suşu ile Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü serasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak sera denemesi kurulmuştur.

Deneme konuları; K0: B0 + G0

K1: B0 + G1

K: B + G2

B0 : Bakteri aşısız

B : Bakteri ile aşıllı

G0 : Gübresiz

G1 : Optimum gübreli

G2: Azot hariç optimum gübreli

Bitki için gerekli olan bitki besin elementleri toprak analiz sonuçları esas alınarak çizelge 3.2’de verildiği gibi, sulama suyuna ilave edilmiştir. Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçlarına göre; fosfor ve potasyum içeriği yeterli olduğu için fosfor ve potasyum gübrelemesi yapılmamıştır. Sadece K1 konusunun ihtiyacı olan azot hesaplanarak (0,08 gr saf azot/saksı) amonyum nitrat formunda seyreltmenin ardından sulama suyuna eklenerek verilmiştir.

Çizelge 3.2 Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçları (azot denemesi)

Su ile Doygunluk (%)	Bünye Sınıfı	EC (dS/m)	pH	Kireç (%)	Bitkiye Yarayışlı P ₂ O ₅ (kg/da)	Bitkiye Yarayışlı K ₂ O (kg/da)	Organik Madde (%)	Toplam Azot (%)	Tarla Kapasitesi (%)	Solma Noktası (%)	Hacim Ağırlığı (g/cm ³)
62	CL	0,62	7,78	18,4	11,4	118	1,87	0,12	28,10	15,20	1,24

3.2.11.2 Fosfor çözme sera denemesi

İn vitro fosfat çözme yetenekleri 40 mg/L’nin üzerinde olduğu belirlenen suşlar ile Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü serasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak sera denemesi kurulmuştur.

Deneme konuları; K0: B0 + G0

K1: B0 + G1

K: B + G2

B0: Bakteri aşısız

B: Bakteri ile aşıllı

G0: Gübresiz

G1: Optimum gübreli

G2: fosfor hariç optimum gübreli

Sera denemesi konuları

A6/2	B5/2	Ç1/7
G3/7	BP2/3	H8/2
K1	P5/1	K0

Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçlarına (Çizelge 3.3) göre potasyum gübrelemesi yapılmamış K1 konusunun ihtiyacı olan azot (0,09 gr saf azot/saksı) amonyum nitrat formunda ve fosfor (0,09 gr saf fosfor/saksı) triple super fosfat formunda seyreltmenin ardından sulama suyuna eklenerek verilmiştir. Deneme konularına azot (0,09 gr saf azot/saksı), amonyum nitrat formunda seyreltmenin ardından sulama suyuna eklenerek verilmiştir.

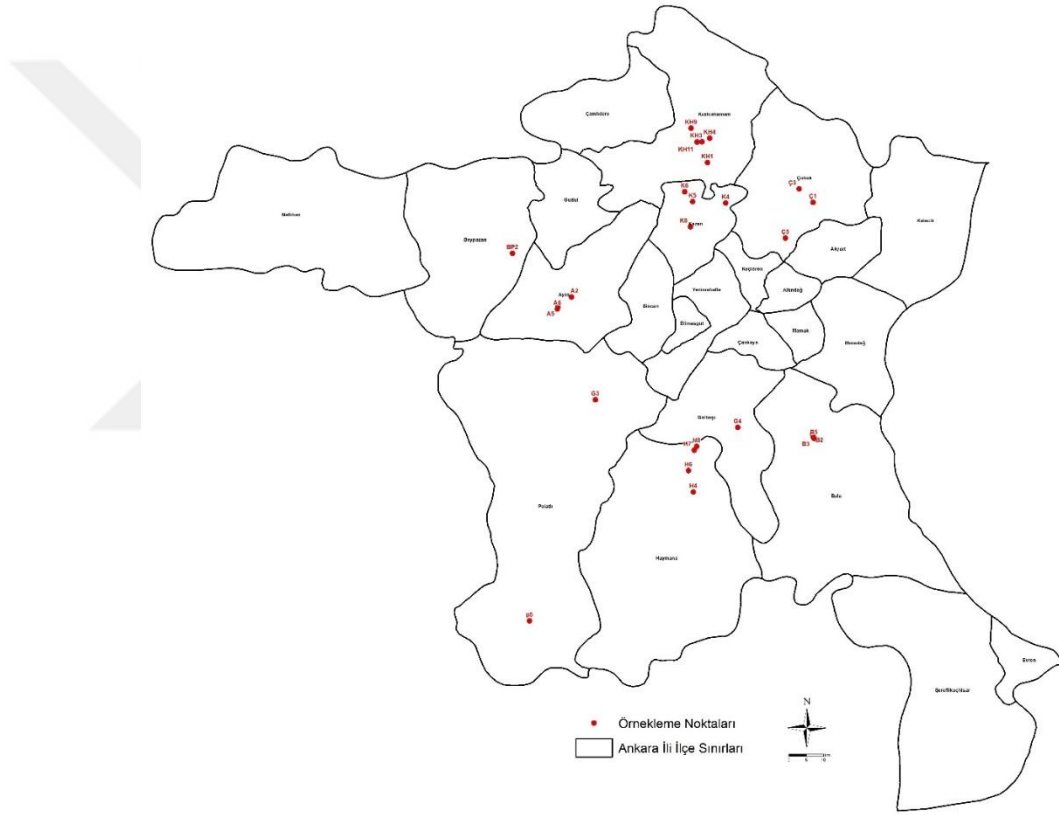
Çizelge 3.3 Sera denemesinde kullanılan toprağın analiz sonuçları (fosfor denemesi)

Su ile Doymunluk (%)	Bünye Sınıfı	EC (dS m-1)	pH	Kireç (%)	Bitkiye Yarayışlı P ₂ O ₅ (kg/da)	Bitkiye Yarayışlı K ₂ O (kg/da)	Organik Madde (%)	Toplam Azot (%)	Tarla Kapasitesi (%)	Solma Noktası (%)	Hacim Ağırlığı (g/cm ³)
62	CL	0.70	7.63	7,9	2,0	94	0,98	0,08	23,60	10,88	1,34

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Toprak Örneklerinin Alınması

Bitki büyümesini teşvik edici bakteri izolasyonu için; Mayıs-Temmuz aylarında Ayaş, Kızılcahamam, Kazan, Gölbaşı, Haymana, Bala, Çubuk, Beypazarı, Polatlı (Şekil 4.1) ilçelerindeki mera alanlarında iyi gelişme gösteren bitkilerin rizosfer topraklarından rastgele örnekleme yöntemine göre, 26 adet toprak örneği alınmıştır.



Şekil 4.1 Toprak örnekleme noktaları

4.2 Toprak Örneklerinin Kimyasal ve Fiziksel Analizleri

Bakteri izolasyonu yapılan toprakların verimlilik analizleri ve bazı fiziksel özellikleri çizelge 4.1’de verilmiştir. Bakteri izolasyonu gerçekleştirilen topraklar, fiziksel yapılarına göre; killi (13 adet) ve killi tınlı (13 adet) olarak tespit edilmiştir. Topraklar

kimyasal özelliklerine göre incelendiğinde; 1 toprak hafif tuzlu, diğer topraklar tuzsuz, 9 toprak nötr, 1 toprak hafif asidik, 16 toprak hafif alkali, 7 toprak az kireçli, 2 toprak kireçli 10 toprak orta kireçli, 2 toprak fazla kireçli, 5 toprak çok fazla kireçli olarak tespit edilmiştir. Toprakların verimlilik durumları incelendiğinde; bitki tarafından alınabilir fosfor 3 toprakta çok fazla, 3 toprakta yeterli seviyede, 11 toprakta az, 9 toprakta çok az; alınabilir potasyum 24 toprakta yeterli, 2 toprakta çok az; azot durumları da, 22 toprakta yeterli, 3 toprakta az, 1 toprakta çok az olarak saptanmıştır. Toprakların organik madde durumları; 19 toprakta düşük, 7 toprakta ise orta seviyede belirlenmiştir.

Zhang vd. (2006) toprağın organik karbon ve azot, Palmer ve Young (2000) ise; pH, kil ve organik madde miktarlarının, bakterilerin çeşitliliğini önemli ölçüde etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Belirtilen özellikler açısından toprak örneklerimizi değerlendirdiğimizde; pH ve kil seviyeleri farklılık göstermemekle birlikte, tamamının mikroorganizma gelişimi için optimum seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Organik madde ve azot seviyeleri, mikroorganizmalar için önemli yapısal bileşenler olmaları nedeniyle, bakteri üremesi ve çeşitliliğinde kritik değişkenlerdir. Bakteri izolasyonunda kullanılacak toprak örneklerinin yukarıda ifade edilen özellikleri, esasen bu literatür verilerinin sınanması amacı ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Numune Adı	Su ile Doymunluk (%)	Bünye Sınıfı	EC (dS m ⁻¹)	pH	Kireç (%)	Bitkiye Yarayışlı P ₂ O ₅ (kg da ⁻¹)	Bitkiye Yarayışlı K ₂ O (kg da ⁻¹)	Organik Madde (%)	Toplam Azot (%)
Kızılcahamam 1	52	CL	0,62	6,50	<TEDB	12,41	18,99	1,07	0,11
Kızılcahamam 2	80	C	0,69	6,43	<TEDB	2,64	83,08	1,36	0,11
Kızılcahamam 3	58	CL	0,38	6,74	<TEDB	2,54	55,13	1,39	0,14
Kızılcahamam 9	52	CL	0,21	6,70	<TEDB	5,18	55,13	1,45	0,13
Kızılcahamam 11	69	CL	0,76	7,50	4,76	1,26	80,07	1,68	0,17

Çizelge 4.1 Toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (devam)

Kazan 4	65	CL	0,61	7,60	5,49	0,33	130,55	1,03	0,13
Kazan 5	51	CL	0,24	7,10	<TEDB	0,19	15,69	0,36	0,06
Kazan 6	73	C	0,68	7,80	14,28	5,07	205,87	0,36	0,07
Kazan 8	71	C	0,83	7,65	13,15	13,15	224,79	0,98	0,13
Ayaş 2	64	CL	0,59	7,79	7,56	7,72	170,41	1,04	0,17
Ayaş 5	71	C	0,32	7,96	11,40	4,25	239,50	1,10	0,16
Ayaş 6	62	CL	0,38	7,77	7,89	6,02	149,86	0,83	0,15
Beypazarı 2	76	C	0,87	7,84	28,11	2,85	513,75	1,76	0,11
Gölbaşı 3	66	CL	0,86	7,70	19,58	3,34	68,49	1,05	0,09
Gölbaşı 4	95	C	0,89	7,63	8,19	2,00	417,66	2,62	0,11
Çubuk 1	135	C	1,86	7,15	8,56	5,86	43,01	3,62	0,13
Çubuk 3	82	C	0,62	7,94	<TEDB	3,48	105,60	1,70	0,10
Çubuk 5	69	CL	0,71	8,40	7,39	1,72	55,13	0,18	0,08
Haymana 4	66	CL	0,79	6,98	<TEDB	5,43	74,18	2,85	0,02
Haymana 6	71	C	0,10	7,71	3,46	4,15	50,13	1,05	0,09
Haymana 7	75	C	0,74	7,60	22,39	2,35	138,13	3,61	0,11
Haymana 8	72	C	0,36	7,68	48,20	3,10	188,00	1,55	0,10
Bala 2	66	CL	0,88	7,60	10,77	1,95	102,24	1,68	0,09
Bala 3	132	C	2,30	7,15	13,41	4,21	47,71	3,35	0,13
Bala 5	117	C	1,02	7,24	14,00	6,69	63,00	2,67	0,11
Polatlı 5	56	CL	0,36	7,69	46,80	5,00	207,00	2,51	0,10

TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır. C: Killi CL: Killi Tınlı

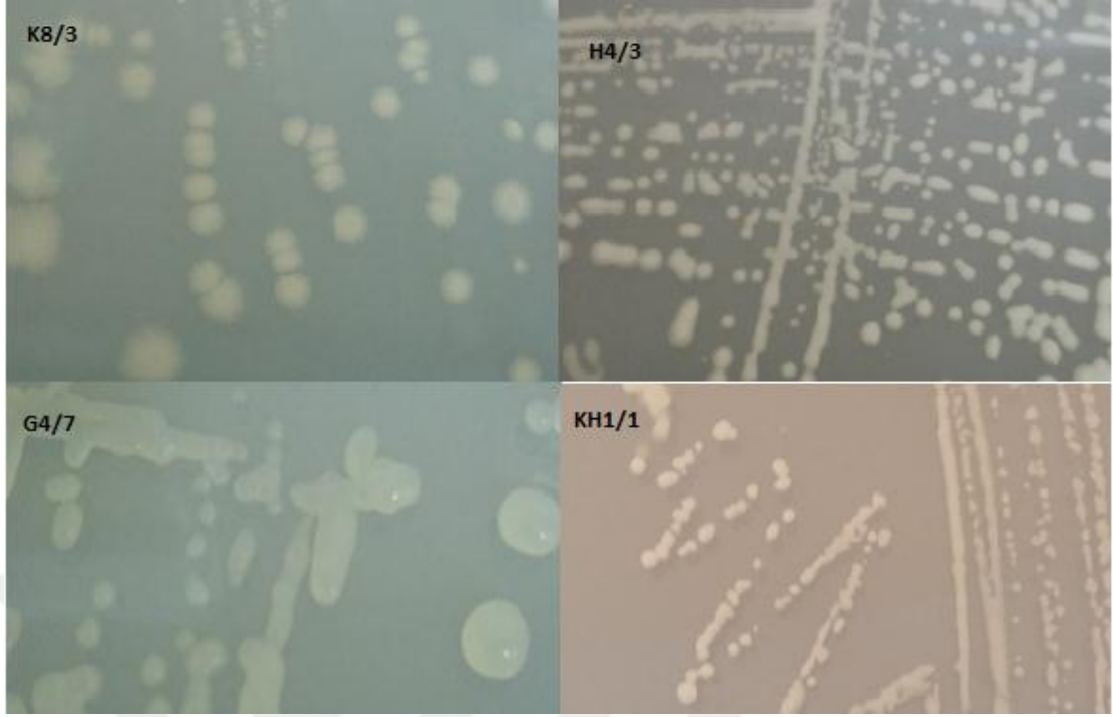
4.3 Topraktan Bakteri İzolasyonu

Ankara ilinin 26 farklı noktasından alınan toprak örneklerinden, azotsuz Burk's besi ortamına ve Nutrient Agar besi ortamına yapılan ekimlerin sonucunda, farklı morfolojik yapıya sahip koloniler seçilmiş ve saflaştırma gerçekleştirilerek toplam ve 70 adet izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Topraktan izole edilen bakterilerin tümünün

bitki büyümesini teşvik edici özelliklere sahip olma potansiyelleri düşünülerek, saflaştırılan tüm bakteriler ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere stoğa alınmıştır.

Çizelge 4.2 Bakteri izolatları ve izole edildikleri bölgeler

İzole edildiği yer	İzolat	İzole edildiği yer	İzolat
Kızılcacahamam	KH1/1	Bala	B3/5
	KH1/2		B5/2
	KH4/1		B5/4
	KH4/2	Çubuk	Ç1/1
	KH9/1		Ç1/3
	KH9/2		Ç1/4
Kazan	K5/1		Ç1/6
	K6/1		Ç1/7
	K8/1		Ç3/1
	K8/2	Ç3/2	
	K8/3	Ç5/1	
Ayaş	A2/1	Gölbaşı	Ç5/3
	A2/3		Ç5/4
	A2/4		G3/1
	A5/1		G3/2
	A5/2		G3/3
	A6/1		G3/4
	A6/2		G3/5
	A6/3		G3/6
	A6/4		G3/7
	Kazan		K4/1
K4/3		G4/2	
Kızılcacahamam	KH11/1	G4/3	
	KH11/3	G4/4	
	KH3/1	G4/5	
Haymana	H4/1	Beypazarı	G4/6
	H4/2		G4/7
	H4/3		G4/9
	H6/1		BP2/1
	H6/2		BP2/2
	H7/1		BP2/3
	H7/2		BP2/4
	H7/4	Haymana	H8/1
Bala	B2/1	Polatlı	H8/2
	B3/2		P5/1
	B3/4		



Şekil 4.2 İzolatların nutrient broth besi ortamındaki koloni morfolojileri

4.4 Bakterilerin Tanımlanması

4.4.1 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu

İzolatların morfolojik karakterlerini belirlemek amacıyla Gram boyanma özelliklerine bakılmış ve mikroskop incelemesi yapılarak, hücrelerin morfolojik yapıları da belirlenmiştir. İzolatların yaklaşık % 67'si (47 izolat), Gram negatif suşlardan oluşmaktadır. Farklı coğrafi bölgelerde yürütülen çalışmalar sonucunda birçok araştırmacı, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzer şekilde, rizosfer topraklarında Gram negatif bakterilerin daha baskın olduğunu tespit etmiştir (Joshi ve Bhatt 2011, Pathania vd. 2014). Özetle bizim verilerimiz, rizosferde dominant floranın Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulduğu genellemesini destekler niteliktedir.

Diğer yandan örneklerimizde; 59 bakterinin katalaz, 58 bakterinin oksidaz ve 43 bakterinin de üreaz enzimi üretebildiği saptanmıştır. Katalaz testinde *Staphylococcus aureus* pozitif kontrol, oksidaz ve üreaz testlerinde *E.coli* ATCC 25922 suşu pozitif

kontrol olarak kullanılmıştır. İzolatlarda morfolojik yapı; kok, basil veya oval olabilmekle birlikte, basiller dominant morfotip olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3 ve 4.4).

Çalışma konumuzu teşkil eden bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin de içerisinde bulunduğu toprak bakterileri, yüksek düzeyde heterojenite göstermektedir. Rizosfer bu açıdan toprak çeşitliliğini tam olarak yansıtmaya bile, büyük oranda benzerliklere sahiptir (Dutta ve Podile 2010, Xing vd. 2016, Solanki vd. 2017). Bizim elde ettiğimiz veriler de bu genel literatür verileri ile uyum göstermektedir. Bu nedenle izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlere dayanılarak tanımlanması ciddi yanılgılara yol açabilmektedir. Özellikle yakın akrabalık ilişkisi olan türlerin tanımlanmasında genetik testlerin daha güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle, tanımlama çalışmalarına bu testlerle devam edilmiştir.

Çizelge 4.3 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonları

İzolat No	Gram Boyama	Morfoloji	Oksidaz	Üreaz	Katalaz
KH1/1	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
KH1/2	G (+)	basil	(+)	(+)	(+)
KH4/1	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
KH4/2	G (-)	kok	(+)	(+)	(+)
KH9/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
KH9/2	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
K5/1	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
K6/1	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
K8/1	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
K8/2	G (-)	basil	(+)	(-)	(-)
K8/3	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
A2/1	G (-)	oval	(+)	(-)	(+)
A2/3	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
A2/4	G (+)	basil	(-)	(-)	(+)
A5/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
A5/2	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
A6/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)

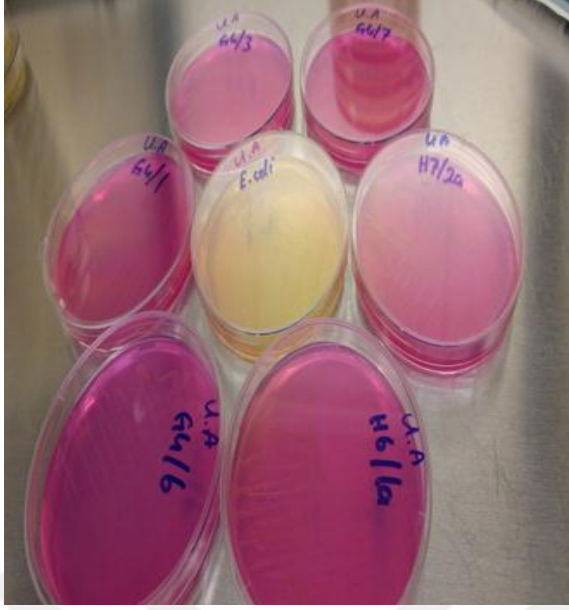
Çizelge 4.3 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonları (devam)

A6/2	G (-)	kok	(+)	(+)	(+)
A6/3	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
A6/4	G (-)	oval	(+)	(-)	(+)
K4/1	G (-)	oval	(+)	(+)	(-)
K4/3	G (-)	kok	(+)	(+)	(+)
KH11/1	G (-)	oval	(+)	(+)	(-)
KH11/3	G (-)	basil	(-)	(-)	(+)
KH3/1	G (+)	basil	(+)	(+)	(+)
H4/1	G (+)	basil	(+)	(+)	(+)
H4/2	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
H4/3	G (+)	basil	(-)	(+)	(+)
H6/1	G (+)	basil	(+)	(+)	(+)
H6/2	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
H7/1	G (+)	basil	(-)	(-)	(+)
H7/2	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
H7/4	G (-)	basil	(+)	(-)	(-)
B2/1	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
B3/2	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
B3/4	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
B3/5	G (+)	basil	(-)	(-)	(+)
B5/2	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
B5/4	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
Ç1/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
Ç1/3	G (-)	basil	(+)	(+)	(-)
Ç1/4	G (-)	basil	(+)	(-)	(+)
Ç1/6	G (-)	kok	(-)	(+)	(+)
Ç1/7	G (-)	basil	(+)	(+)	(-)
Ç3/1	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
Ç3/2	G (-)	kok	(-)	(+)	(+)
Ç5/1	G (+)	basil	(-)	(-)	(+)
Ç5/3	G(+)	basil	(-)	(+)	(+)
G3/1	G (-)	kok	(+)	(+)	(+)

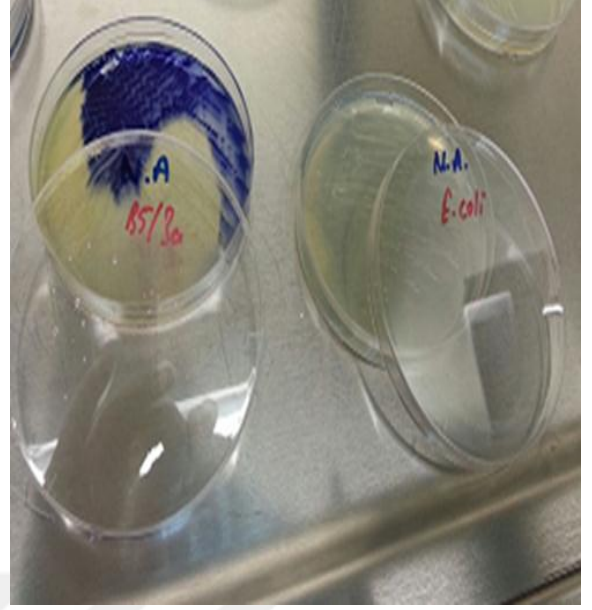
Çizelge 4.3 İzolatların morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonları (devam)

G3/2	G (-)	basil	(+)	(-)	(-)
G3/3	G (-)	basil	(+)	(+)	(-)
G3/4	G (+)	basil	(-)	(-)	(-)
G3/5	G (+)	basil	(+)	(+)	(+)
G3/6	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
G3/7	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
G4/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
G4/2	G (-)	oval	(+)	(+)	(-)
G4/3	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
G4/4	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
G4/5	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
G4/6	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
G4/7	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
G4/9	G (-)	oval	(+)	(+)	(+)
BP2/1	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
BP2/2	G (+)	basil	(-)	(+)	(+)
BP2/3	G (-)	basil	(+)	(+)	(+)
BP2/4	G (+)	basil	(-)	(-)	(+)
H8/1	G (-)	kok	(-)	(-)	(+)
H8/2	G (+)	basil	(+)	(-)	(+)
P5/1	G(+)	basil	(+)	(-)	(+)

-: Negatif sonuç +: Pozitif sonuç



Şekil 4.3 Üreaz testi

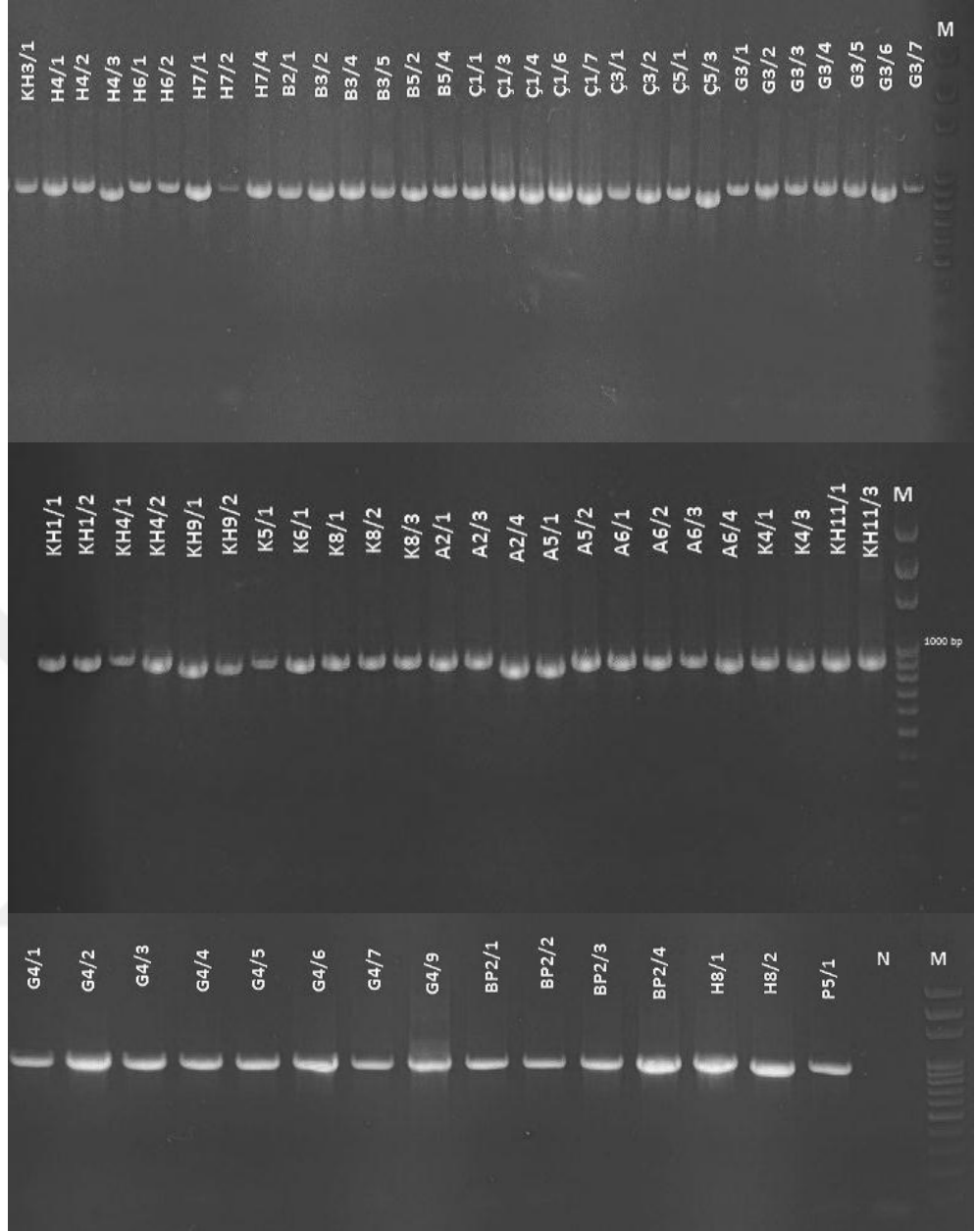


Şekil 4.4 Oksidaz testi

4.4.2 16S rDNA dizi analizi

Ankara ili topraklarından izole edilen bakteri örneklerinden 16S rDNA primerleri kullanılarak çoğaltılan PZR ürünlerinin jel görüntüleri (Şekil 4.5) ve bu çoğaltılan bölgelerin dizi analizinden elde edilen baz sıralarının NCBI BLAST veri tabanında gerçekleştirilen karşılaştırmalı yorumlarından ortaya çıkan tanı sonuçları, Çizelge 4.4'de verilmiştir.

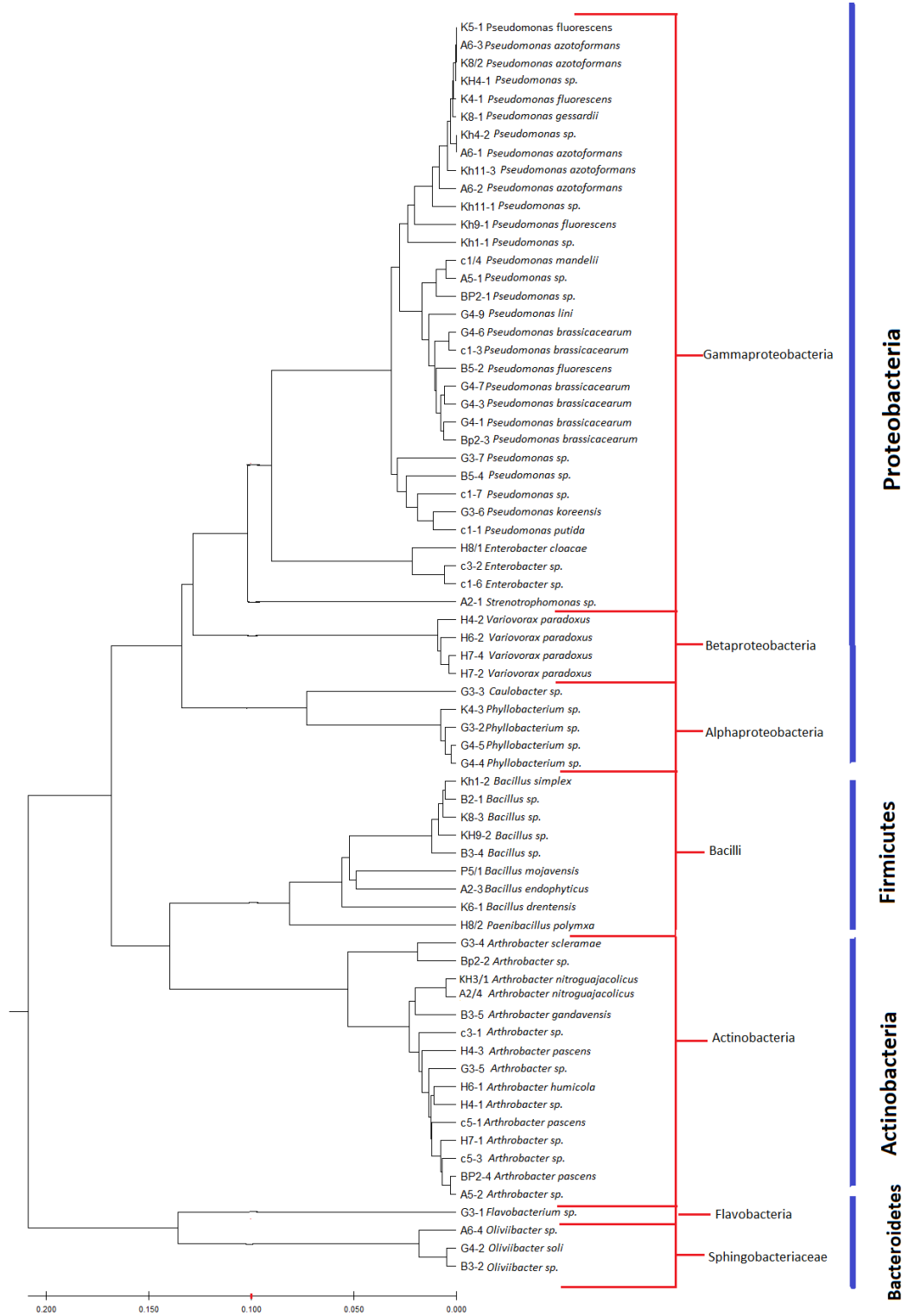
Çalışmamızda Ankara ilinden alınan toprak örneklerinden izole edilen 70 bakterinin 16S rDNA sonuçlarına göre; 11 farklı cinse dahil olduğu (% 41'i *Pseudomonas*, % 21'i *Arthrobacter* ve % 11'i ise *Bacillus*) tespit edilmiştir (Şekil 4.7). *Proteobacteria* filumu 42 adet izolat ile en baskın grubu oluşturmuş, bunu 15 izolat ile *Actinobacteria* filumu takip etmiştir (Şekil 4.6).



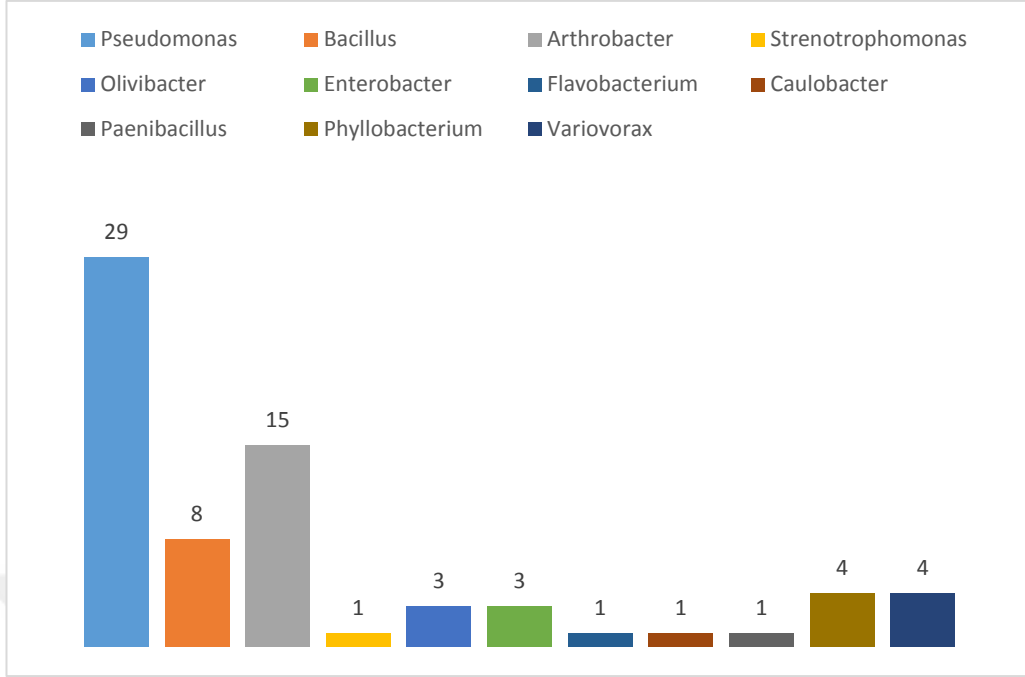
Şekil 4.5 16S rDNA PCR ürünleri agaroz jel görüntüleri

Çizelge 4.4 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre tanısı

İzolat Kodu	16S rDNA tanısı	İzolat Kodu	16S rDNA tanısı
KH1/1	<i>Pseudomonas sp.</i>	B3/4	<i>Bacillus sp.</i>
KH1/2	<i>Bacillus simplex</i>	B3/5	<i>Arthrobacter gandavensis</i>
KH4/1	<i>Pseudomonas sp.</i>	B5/2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
KH4/2	<i>Pseudomonas sp.</i>	B5/4	<i>Pseudomonas sp.</i>
KH9/1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ç1/1	<i>Pseudomonas putida</i>
KH9/2	<i>Bacillus sp.</i>	Ç1/3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
K5/1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ç1/4	<i>Pseudomonas mandelii</i>
K6/1	<i>Bacillus drementensis</i>	Ç1/6	<i>Enterobacter sp.</i>
K8/1	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Ç1/7	<i>Pseudomonas sp.</i>
K8/2	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Ç3/1	<i>Arthrobacter sp.</i>
K8/3	<i>Bacillus sp.</i>	Ç3/2	<i>Enterobacter sp.</i>
A2/1	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Ç5/1	<i>Arthrobacter pascens</i>
A2/3	<i>Bacillus endophyticus</i>	Ç5/3	<i>Arthrobacter sp.</i>
A2/4	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	G3/1	<i>Flavobacterium sp.</i>
A5/1	<i>Pseudomonas sp.</i>	G3/2	<i>Phyllobacterium sp.</i>
A5/2	<i>Arthrobacter sp.</i>	G3/3	<i>Caulobacter sp.</i>
A6/1	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	G3/4	<i>Arthrobacter scleramae</i>
A6/2	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	G3/5	<i>Arthrobacter sp.</i>
A6/3	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	G3/6	<i>Pseudomonas koreensis</i>
A6/4	<i>Olivibacter sp.</i>	G3/7	<i>Pseudomonas sp.</i>
K4/1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G4/1	<i>Pseudomonas sp.</i>
K4/3	<i>Phyllobacterium sp.</i>	G4/2	<i>Olivibacter soli</i>
KH11/1	<i>Pseudomonas sp.</i>	G4/3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
KH11/3	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	G4/4	<i>Phyllobacterium sp.</i>
KH3/1	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	G4/5	<i>Phyllobacterium sp.</i>
H4/1	<i>Arthrobacter sp.</i>	G4/6	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
H4/2	<i>Variovorax paradoxus</i>	G4/7	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
H4/3	<i>Arthrobacter pascens</i>	G4/9	<i>Pseudomonas lini</i>
H6/1	<i>Arthrobacter humicola</i>	BP2/1	<i>Pseudomonas sp.</i>
H6/2	<i>Variovorax paradoxus</i>	BP2/2	<i>Arthrobacter sp.</i>
H7/1	<i>Arthrobacter sp.</i>	BP2/3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
H7/2	<i>Variovorax paradoxus</i>	BP2/4	<i>Arthrobacter pascens</i>
H7/4	<i>Variovorax paradoxus</i>	H8/1	<i>Enterobacter cloacae</i>
B2/1	<i>Bacillus sp.</i>	H8/2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
B3/2	<i>Olivibacter sp.</i>	P5/1	<i>Bacillus mojavenis</i>



Şekil 4.6 UPGMA yöntemi kullanılarak 16S rDNA sekans sonuçları ile oluşturulan filogenetik ağaç



Şekil 4.7 İzolatların cinslere göre dağılımı

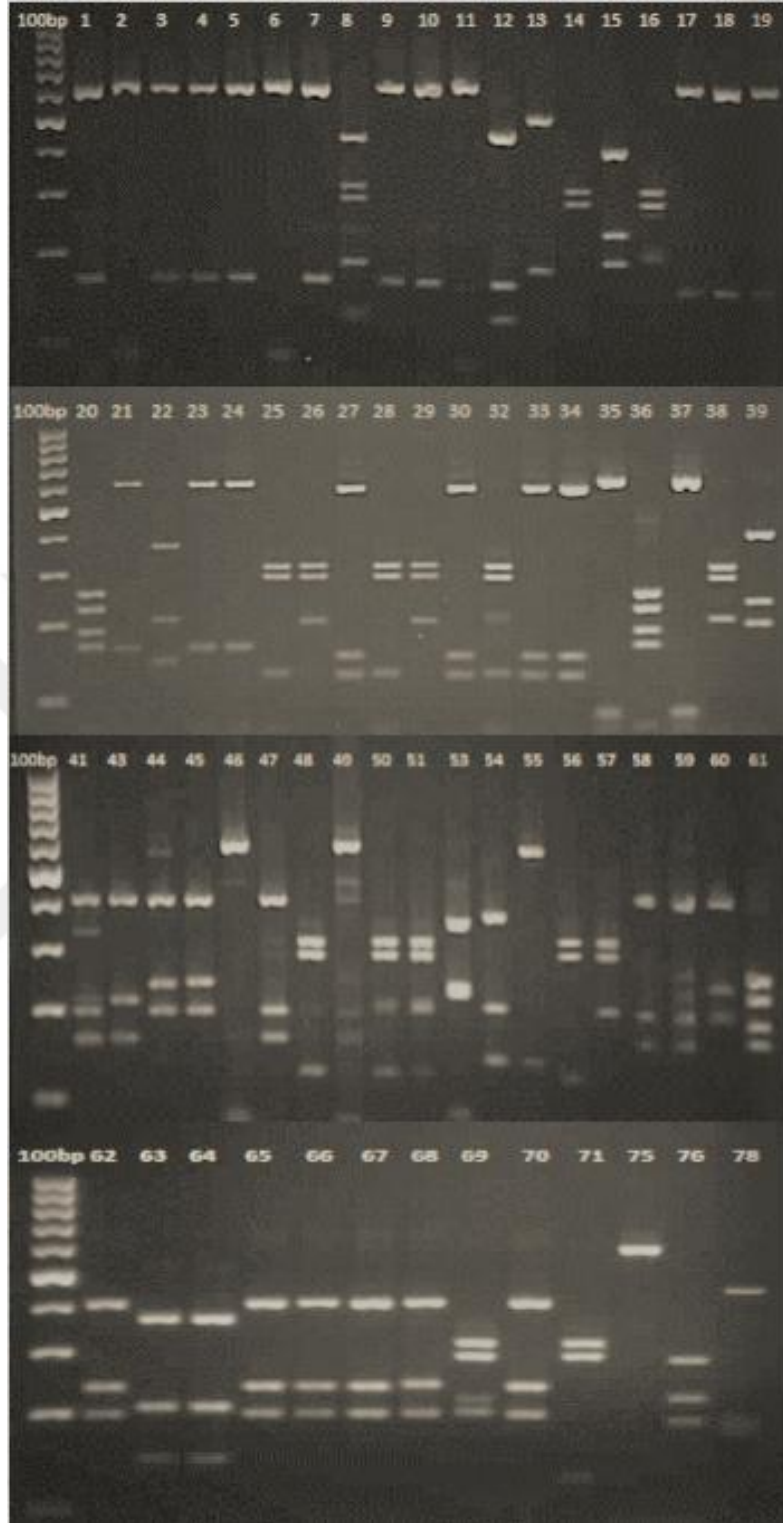
4.4.3 Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA)

Ankara ilinin farklı noktalarından izole edilen 70 bakterinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla ayrıca ARDRA analizleri gerçekleştirilmiştir. ARDRA tekniği, rizobakterilerin ve özellikle *Pseudomonas*'ların genetik çeşitliliklerinin araştırılmasında yoğunlukla kullanılmaktadır (Santoro vd. 2016). Bakterilerin 16S rDNA bölgelerinin AluI, HaeIII, MspI enzimleri ile kesimi sonrasında % 2,5'luk agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen (Şekil 4.8, 4.9, 4.10) bantlar arasındaki benzerlikler Dice korelasyon katsayısı kullanılarak UPGMA ile kümeleme işlemine tabi tutulmuş ve dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.11). AluI enzimi 12 kesim paterni oluştururken, HaeIII ve MspI sırasıyla 9 ve 12 kesim paterni oluşturmuştur.

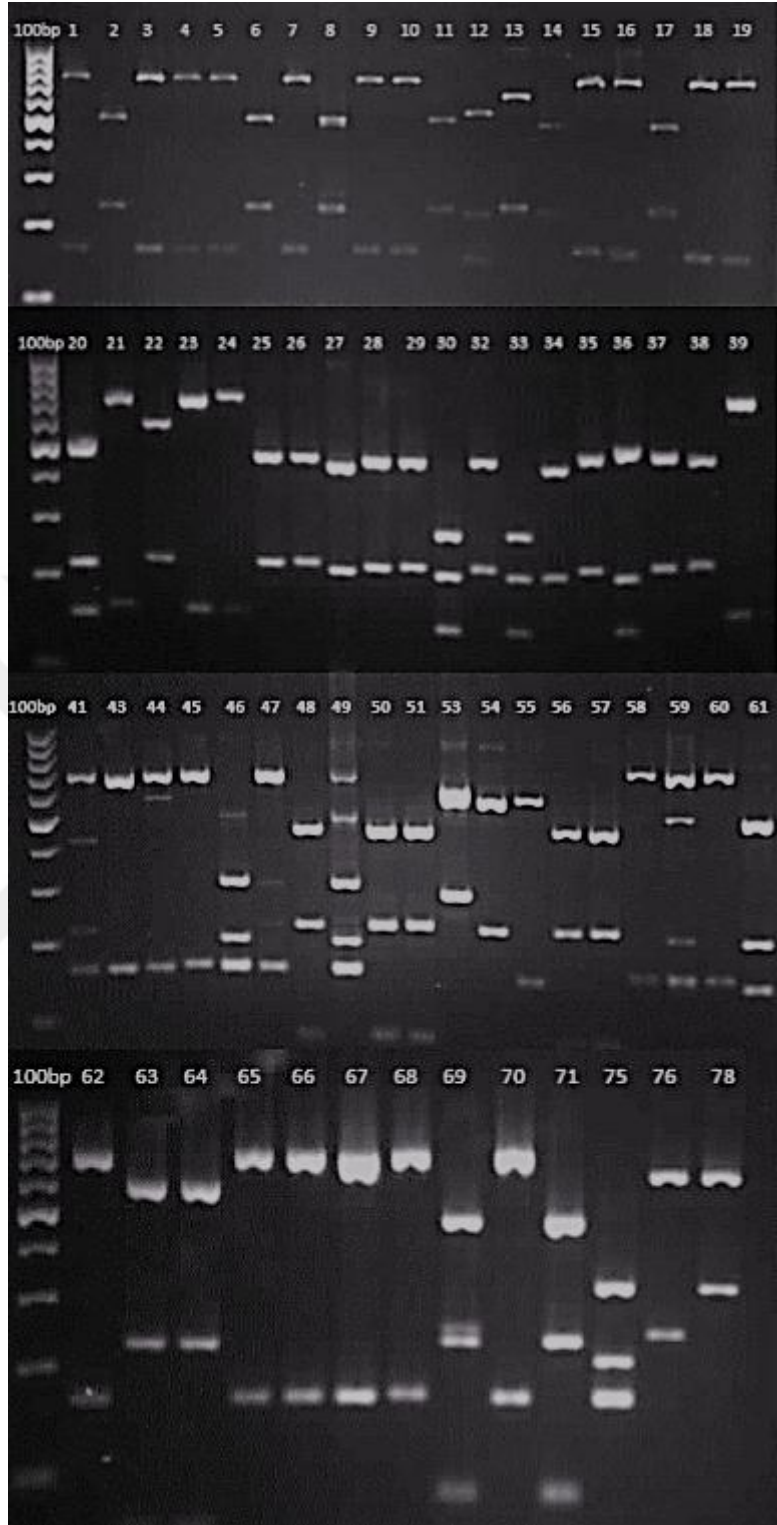
AluI, HaeIII ve MspI enzimlerinin oluşturduğu kesim paternlerine göre oluşturulan dendrogramda (Şekil 4.11) % 40 benzerlik oranı uygulandığında, 6 ana grup oluşmuştur. % 80 benzerlik oranı dikkate alındığında ise, 17 genotipik grup meydana gelmiştir. Daha ileri incelemelerde; A grubunun 5 alt gruba, C grubunun 3 alt gruba, D grubunun 5 alt gruba, F grubunun ise 2 alt gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. B ve E

grupları ise alt gruplara ayrılmamış ve sırasıyla *Caulobacter sp.* ve *Strenotrophomonas sp.* olmak üzere birer adet bakteri içerdiği görülmektedir. A ana grubunda yer alan 1, 2 ve 3. alt gruplar *Pseudomonas*, 4. alt grup *Variovorax*, 5. alt grup *Enterobacter* cinsine dahil türleri içermektedir. C ana grubunda yer alan 7 ve 8. alt gruplar *Bacillus*, 9. alt grup *Olivibacter* cinsine dahil türleri, D ana grubunda yer alan 10. alt grup *Flavobacterium*, 11 ve 12. gruplar *Bacillus*, 13. alt grup *Paenibacillus*, 14. alt grup ise *Phyllobacterium* cinsine dahil türleri içermektedir. F ana grubunda yer alan 16 ve 17. gruplar *Arthrobacter* cinsine dahil türlerden oluşmuştur.

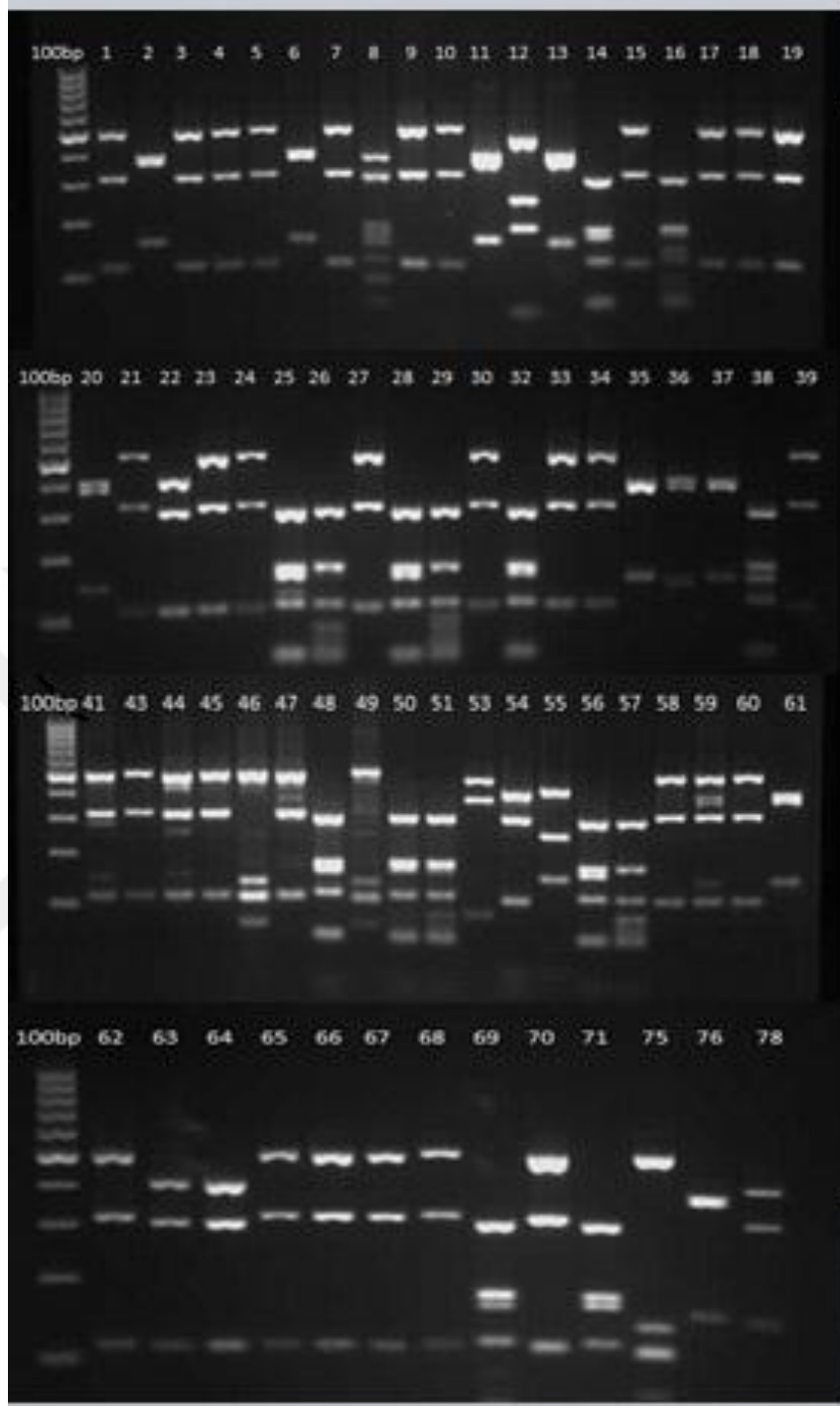




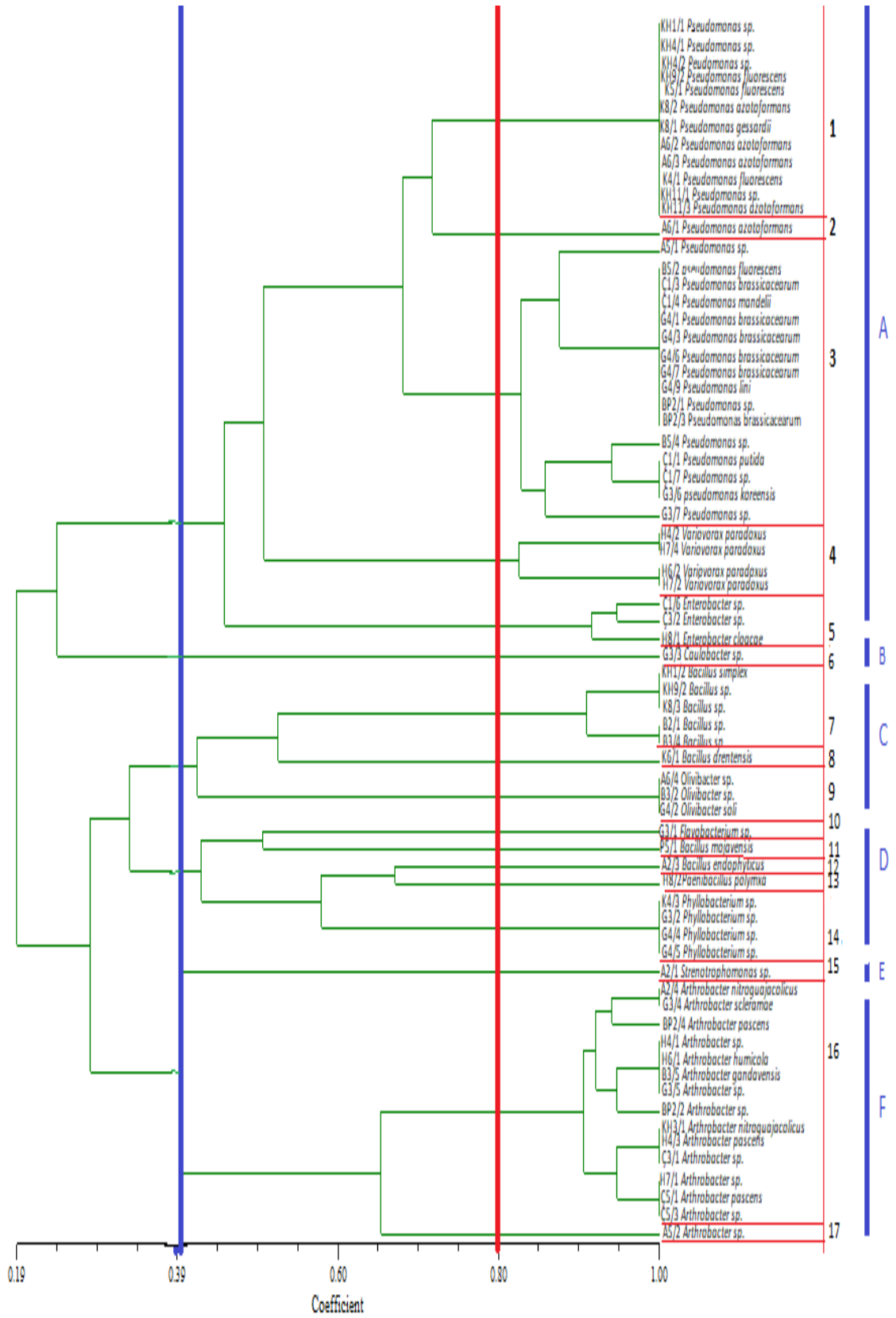
Şekil 4.8 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin AluI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



Şekil 4.9 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin HeaIII enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



Şekil 4.10 Bakterilerin 16 S rDNA bölgelerinin MspI enzimi ile kesiminin jel görüntüsü



Şekil 4.11 Bakterilerin AluI, HaeIII, MspI enzimleri kullanılarak oluşturulan ARDRA paternlerinin, UPGMA ile elde edilen dendrogramı

16S rDNA sekanslarına göre izolatlar 11 ayrı cins altında toplanırken, ARDRA analizinde % 80'lik benzerlik oranı uygulandığında, 17 grup oluşmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgulara benzer şekilde, Jin vd. (2011) de, BBTER bakteriler ile yürüttükleri çalışmada, izolatlarının 16S rDNA sekanslarına göre 17 cinse, ARDRA analizine göre % 88,5 benzerlik oranında 25 gruba ayrıldığını tespit etmişlerdir. Bu farklılık, ARDRA analizlerinde tür seviyesinde ayırımdan ziyade, suş seviyesinde ayırımın daha güçlü olmasından kaynaklanmaktadır. Zira tek nukleotit polimorfizmi 16S rDNA dizi analizlerinde önemli bir farklanmaya işaret etmezken, söz konusu polimorfizmin seçilen restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinde meydana gelmesi ARDRA sonuçlarını ciddi bir şekilde etkilemektedir. Diğer yandan özellikle enzim kesim reaksiyonlarının optimizasyonunda ki küçük değişiklikler, yine ARDRA sonuçlarında önemli varyasyonların belirlenmesine yol açabilmektedir.

Ahmad vd. (2008); bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin çeşitliliğini ve etkinliğini belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmada; rizosfer topraklarından ve kök nodüllerinden *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium* ve *Bacillus* cinslerine dahil toplam 72 bakteri izole etmişlerdir. Souza vd. (2013); çeltik rizosferinden izole ettikleri 336 bakteri suşunun, 31 farklı cinse dahil olduklarını bulmuşlardır. Bu suşlar arasından *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas* cinslerinin baskın olduklarını tespit etmişlerdir. Dinesh vd. (2015); farklı alanlardaki zencefil rizosferlerinden izole ettikleri 100 adet bitki büyümesini teşvik edici bakteri izolatının *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* ve *Curtobacterium* olmak üzere 10 farklı cinse dahil olduğunu ortaya koymuşlardır. Tchakounte vd. (2018) yürüttükleri çalışmada; 143 izolatı, 20 farklı cins altında sınıflandırmış ve bunların arasında baskın cinslerin *Bacillus* (% 31,5) ile *Arthrobacter* (% 17,5) olduğunu belirtmişlerdir.

Sezen vd. (2016); Erzurum ve Kırşehirden izole ettikleri 180 bakteriden hem azot fikse eden, hem de fosfat çözme aktivitesine sahip olan 16 izolatı, FAME profil analizi kullanılarak tanımlamışlardır. FAME tanımlamasının sonuçlarına göre, izole edilmiş bakteriler arasında 9 tanesi (AS2, AS9, AS13, AS15, AS4, AS8, AS12, AS16 ve AS15) *Firmicutes*, 4'ü (AS3, AS6, AS11 ve AS10) *Gammaproteobacteria*, 1'i (AS1),

Actinobacteria ve 1'i (AS5) *Proteobacteria* grubuna dahil bulunmuştur. AS7 izolatu ise FAME analizi ile tanımlanamamıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre bitki büyümesini destekleyici özelliklerine göre en etkili bakterilerin *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Cellulomonas* cinsine ait olduklarını ve % 56,25 oranla en baskın cinsin *Bacillus* olduğunu göstermişlerdir.

Islam vd. (2016); bitki büyümesini teşvik edici bakteriler arasında *Bacillus* ve *Pseudomonas*'ların en baskın cinsler olduklarını belirtmişlerdir. Yerel ve evrensel literatür verileri ile paralel bir şekilde, bizim çalışmamızda da; *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Arthrobacter* cinsine dahil türler baskın türler olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan Ankara topraklarında tanımladığımız *Strenotrophomonas*, *Enterobacter* cinsleri de bitki büyümesini teşvik edici özellikleri üzerine yoğun çalışmalar yürütülen bakteri grupları arasında yer almaktadır. Bunların yanısıra; *Olivibacter*, *Phyllobacterium*, *Flavobacter*, *Caulobacter* ve *Variovorax* cinsleri çeşitli literatürlerde bitki büyümesini teşvik edici bakteriler grubuna dahil edilmekle birlikte, BBTER özellikleri ile ilgili çok fazla bilgiye erişilememektedir. Çalışmamızda tanımlanan bu bakteriler bu açıdan önem taşımaktadır.

Mikrobiyal çeşitlilik; çevresel şartlardan, toprak tipi ve alanlar arasındaki fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir (Grayston vd. 1998). Ayrıca izolasyon yapılan rizosferdeki bitki genotipleri de, mikroorganizmaların sayısı, çeşitliliği ve aktivitesi üzerinde farklı etkiye sahiplerdir (Bais vd. 2006, Micallef vd. 2009). Bu nedenle farklı lokasyonlar ve bitki rizosferlerinden yapılan izolasyonlar sonucu belirlenen mikrobiyal çeşitlilik farklılıkları, beklenen bir sonuçtur. Söz konusu farklılıkların tanımlanması yeni BBTE bakterilerin belirlenmesine kaynak teşkil edecektir.

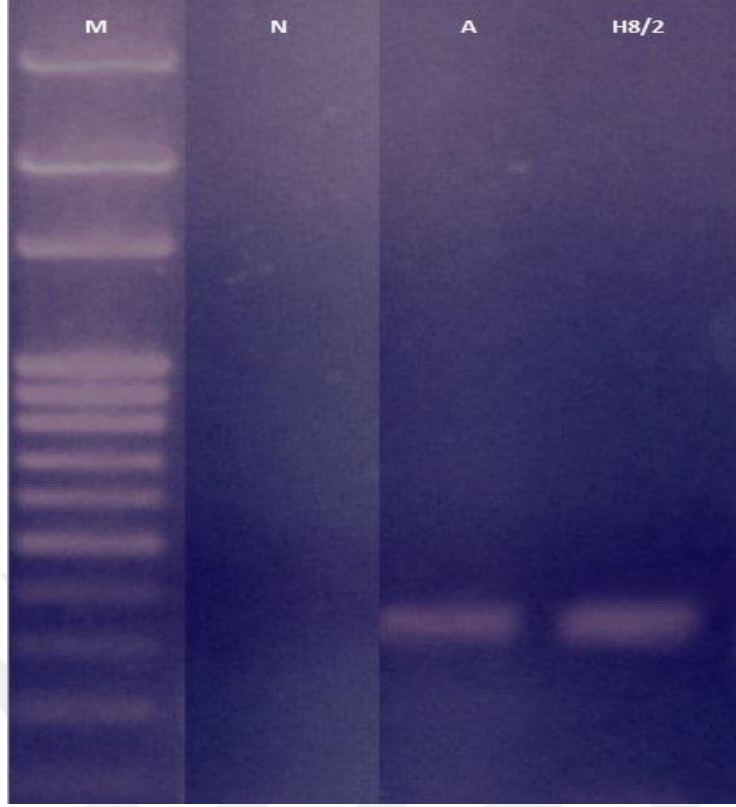
4.5 Bakterilerin Azot Fiksasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Azotsuz sıvı besi ortamında 7 gün inkübasyona bırakılan bakterilerin azot fiksasyon kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan Kjeldahl yöntemi; izolatların havadaki serbest azotu fikse ederek besi ortamında biriktirmeleri ve bu biriken azotun amonyum

azotuna dönüştürülerek, alkali ortamda destilasyonu sonucu açığa çıkan amonyak miktarının hesaplanması esasına dayanmaktadır. Yapılan deneyde, bakteri inoküle edilmeyen azotsuz Burk's besi ortamı kontrol olarak kullanılmıştır.

Bu deneme sonucunda (mikro kjeldahl metoduna göre); bakterilerin 56'sının azot fikse ettiği ve azot miktarlarının 0,79 – 46,11 ppm arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Bakterilerin % 44'ü, 10 ppm'in üzerinde azot fikse etme yeteneğinde bulunmuştur. En yüksek fiksasyon miktarları 46,11 ve 44,91 ppm olarak, sırasıyla B3/5 (*Arthrobacter gandavensis*) ve Ç1/6 (*Enterobacter sp.*) suşlarında saptanmıştır. Bunların ardından en yüksek azot fiksasyonu; *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Olivibacter* cinslerine dahil bakterilerde belirlenmiştir. Azotsuz besi ortamında üreme durumları incelendiğinde, sadece K4/3 (*Phyllobacterium sp.*) suşu bu ortamda üreme yeteneği göstermemiştir. 37 bakteri ise, azotsuz besi ortamında çok iyi üremiştir.

Azot fikse etme yeteneğine sahip simbiyotik ve asimbiyotik tüm bakterilerde bulunan molibden nitrojenaz enzimi α alt ünitesinin sentezinden sorumlu *nifH* geni, azot fiksasyonunda görevli genler arasında yüksek oranda korunmasından dolayı diazotrofların tanımlanmasında standart gendir ve genellikle azot fikseri bakterilerin varlığının tespit aracı olarak kullanılmaktadır (Dixon ve Kahn 2004). Bu nedenle çalışmamızda yer alan tüm izolatlarda, *polF* ve *polR* universal dejenere primerler kullanılarak *nifH* geni taranmıştır. *nifH* gen varlığı bilinen *Azotobacter vinelandii* suşu, bu denemelerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrolde olduğu gibi, yaklaşık 360 bp'lik bant tespit edilen jellerden, söz konusu bölgeler kesilerek alınmış ve dizi analizine gönderilmiştir (Çizelge 4.5). Elde edilen baz sıralarının NCBI BLAST veri tabanında gerçekleştirilen karşılaştırma sonuçlarına göre, sadece H8/2 (*Paenibacillus polymyxa*) suşunda *nifH* geni varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Çoğaltılan *nifH* gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü
M: 100 kb DNA marker N: negatif kontrol A: *Azotobacter vinelandii* H8/2: *Paenibacillus polymyxa*

Çizelge 4.5 H8/2 izolatu *nifH* gen bölgesi dizi analizi

TTTGCGATCC	CAAGGCTGAC	TCCACCCGTC	TTATTCTGAA	TACGAAGGCC	CAACAGACAG
TGCTACATCT	GGCTGCTGAA	AGGGGCACGG	TAGAGGATTT	GGAGCTGGAG	GATGTTGTCC
AGAAGGGCTT	CGGTGACATT	CTGAACGTGG	AATGCGGCGG	GCCAGAGCCT	GGTGTCGGCT
GTGCAGGACG	CGGCATCATC	ACAGCCATTA	ATTTTCTGGA	GGAAGAGGGG	GCCTACGAAG
GGCTGGATTT	TGTTTCCTAC	GATGTACTGG	GGGACGTCGT	GTGCGGGGGC	TTCGCCATGC
CGATCCGGAG	AAGAAGCGCA	GAAATCA			

Shen vd. (2016); Çin'de yürüttükleri çalışmada mor topraklardan izole ettikleri 17 bakteride, öncelikle in vitro şartlarda azot fikse etme, fosfor ve potasyum çözme yeteneklerini araştırmışlardır. 16 s rRNA sekans sonuçlarına göre tanımlanan suşlarda, mikro kjeldahl metodu kullanılarak 91.5 ± 2.69 ppm düzeyinde azot fiksasyonu ile en yüksek azot fikse etme yeteneğine sahip suşun *Bacillus amyloliquefaciens* olduğunu tespit etmişlerdir. Kızılkaya (2008); çeşitli alanlardaki topraklardan izole ettiği *Azotobacter* türlerinin azot fiksasyon kapasitelerini, azotsuz Ashby besi ortamına inkübasyonun ardından kjeldahl yöntemi ile ölçmüş ve 3,5-29,35 ppm arasında değiştiğini (ortalama 10,24 ppm) saptamıştır.

Ding vd. (2005); buğday, mısır, çavdar ve söğüt rizosferlerinden azotsuz Burk's besi ortamında üreme özelliklerine göre 29 izolat seçmişlerdir. Ancak *nifH* geni spesifik primerlerle yapılan PZR sonucunda seçilen izolatlardan yalnızca 7 tanesinin *nifH* genine sahip olduğunu bulmuşlardır. 16S rDNA sekans sonuçlarına göre *nifH* geni bulunan izolatlar; *Paenibacillus massiliensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus marisflavi* ve diğer üçü *Bacillus megaterium* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma, *Paenibacillus massiliensis* ve *Bacillus marisflavi*'nin azot fikse etme yetneğine sahip olduğunu kanıtlayan ilk çalışmadır.

Gosal vd. (2011); sekiz farklı azotsuz besiyeri kullanarak buğday rizosferinden izole ettikleri 72 bakteri izolatının 28'inde asetilen redüktaz yöntemi kullanarak, 22,3-72 nmol C₂H₄/h arasında değişen miktarlarda nitrojenaz aktivitesi tespit etmiştir. Bu izolatların *nifH* gen taramaları spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilmiş, ancak sadece 7 tanesinde *nifH* geni tespit edilmiştir. 16S rDNA sekans sonuçlarına göre bu izolatların; *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Rhizobium larrymoorei*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Xanthomonas oryzae* oldukları belirtilmiştir. Li vd. (2017); şeker kamışı rizosferinden izole ettikleri farklı türlere dahil 100 izolattan seçtikleri *Pseudomonas* cinsine dahil 30 örnek ile yürüttükleri çalışmada; *polR* ve *polF* primerlerini kullanarak *nifH* geni için yaptıkları taramada, 10 izolatta *nifH* genini saptamışlardır.

Yürüttüğümüz çalışmada KH4/1, A2/3, A6/1, A6/3, B5/2, Ç5/3, G4/2, G4/4, G4/5, H4/3, H6/2, H7/1, BP2/3, H8/1 suşlarının azotsuz besi ortamında üremelerine rağmen, mikro kjeldahl yöntemine göre azot fikse etmedikleri tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde mikro kjeldahl yöntemine ve azotsuz besi ortamında üreme durumlarına göre birçok izolatın azot fikse etme yeteneğinde olduğu görülmesine rağmen, sadece bir izolatta *nifH* geni tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar arasında bir korelasyon tespit edilememiştir. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada; çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak, diazotrofik olmamasına rağmen, bazı bakterilerin azotu toplayabildiği ve azotsuz besi ortamında gelişirken bu azotu kullanabildiği saptanmıştır (Beneduzi vd. 2013). Bu durum azot tespitinin tanımlanmasında ciddi sorunlar

yaratmaktadır. Diğer yandan, Dean ve Jacobson (1992) *nifH* geninin tespiti ile nitrojenaz aktivitesini belirlemede kullanılan asetilen redüktaz yöntemi arasında direkt bir korelasyon belirleyememiştir. Tripathi vd. (2002) ise, azotsuz besi ortamındaki gelişmeyi, asetilen redüktaz yönteminin tanımlayamayacağını ileri sürmüştür. Literatür verilerinde yer alan tüm bu çelişkili durumlar azot tespit eden bakterilerin tanısında halen altın standart olarak kullanılabilir bir yöntemin bulunmadığına işaret etmektedir.

Biyolojik azot fiksasyonunun girdilerinin doğru olarak belirlenmesi her zaman önemli bir sorun olmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların azot fiksasyon yeteneklerinin kesin bir şekilde kanıtlanmasının yolları aranmaktadır (Herridge vd. 2008). Geleneksel olarak kantitatif bir yöntem olmasına rağmen, azotsuz besi ortamında mikroorganizmaların üremesinin gözlenmesi, azot fikse ettiği bilinen veya iddia edilen birçok mikroorganizmanın başka yöntemler de kullanılarak tekrar araştırılmasına yol açmıştır (Burris ve Wilson 1972). Azot fiksasyonunun kantitatif tespitinde tercih edilen yöntemlerden yaygın kullanım alanı bulanlarından bir diğeri, azotun tüm formlarını amonyum azotu şekline dönüştürmek ve alkali ortamda yapılan destilasyon sonucu açığa çıkan amonyak miktarından toplam azotu belirlemek esasına dayanan Kjeldahl metodudur (Burris ve Wilson 1972). Ancak bu yöntemde de yanıltıcı sonuçların bulunma olasılığı yüksektir. Dolaylı tespit yöntemleri arasında en geniş kullanım alanına sahip yöntem ise; nitrojenaz enzim sistemi tarafından asetilenin etilene indirgenmesi esasına dayanan ve sonuçta gaz kromatografisi yöntemiyle etilenin tespit edilmesini hedefleyen asetilen redüktaz yöntemidir (Sylvia vd. 1999). Biyolojik azot fiksasyonunun belirlenmesinin diğer bir yöntemi olan, ¹⁵N izotopu kullanılarak kütle spektrometresinde azot tayini yapmanın, fiksasyonun tespitinin en kesin yolu olduğu ileri sürülmektedir (Sylvia vd. 1999). Diğer yandan Young (1992); mikroorganizmalarda *nifH*'nin varlığının, bakterinin azotu fikse edebildiğinin göstergesi olduğunu belirtmiştir. Ancak *nifH* geninin cinsler ve hatta türler arasında yüksek oranda polimorfik bir yapı içermesi ve ortologlarının bulunma olasılıkları, evrensel primerler ile kesin tanısının yapılmasını zorlaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz verilerin kesin bir şekilde yorumlanmasında, yukarıda özetlediğimiz literatür verilerinin işaret ettiği zorluklar yer almaktadır.

Bir çok bitki ilişkili bakteri N₂'yi fikse edebilir ve böylece bitkiye azot sağlayabilir. PGPR mikroorganizmaların bitkide azot bilançosuna bulunduğu katkının, bitkinin lehine olduğuna dair kanıtlar, şeker kamışı gibi bazı bitkiler için, rapor edilmiştir (Boddey vd. 2003). Bununla birlikte, PGPR mikroorganizmalar vasıtası ile N₂ fiksasyonunun bitki büyümesinin uyarılması yönündeki etkisi halen tartışmalı bir konudur. Buna ilave olarak, azot tespiti yapma yeteneğinde olmayan rizobakterilerin bitki büyümesini desteklediğinin belirlenmesi, azot tespitinin bitki büyümesini destekleyen mikroorganizmalar için zorunlu bir kriter olmadığına açık bir kanıttır. Bu konudaki bir başka tipik örnek, azot tespiti yapamayan *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 suşunun, kanola ve *Arabidopsis*'in büyümesini teşvik etme yeteneğinde bulunmasıdır (Mantelin vd. 2006).

Tüm bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde; evrensel literatür verileri ile paralel bir şekilde, çalışmamızda da toprak izolatlarında azot fiksasyon yeteneğinin değişik testlerle tespitinde çelişkili sonuçlar alınması, verilerin yorumlanmasını büyük ölçüde güçleştirmektedir. Ancak bu durum, PGPR tanısı için bir engel teşkil etmemektedir.

Çizelge 4.6 Bakterilerin Kjeldahl yöntemine göre azot fiksasyon miktarları ve azotsuz besi ortamında üreme durumları

İzolat Kodu	N-Burks Besiyerinde üreme	N fiksasyon miktarı µg/mL	İzolat Kodu	N-Burks Besiyerinde üreme	N fiksasyon miktarı µg/mL
KH1/1	(++)	7,55	B3/4	(++)	22,46
KH1/2	(+++)	22,12	B3/5	(+++)	46,11
KH4/1	(+++)	T.E.D.B.	B5/2	(+)	T.E.D.B.
KH4/2	(+++)	9,08	B5/4	(+)	T.E.D.B.
KH9/1	(+++)	14,38	Ç1/1	(+)	T.E.D.B.
KH9/2	(+++)	7,68	Ç1/3	(++)	4,91
K5/1	(+++)	9,52	Ç1/4	(+++)	33,33
K6/1	(+++)	18,01	Ç1/6	(++)	44,91

Çizelge 4.6 Bakterilerin Kjeldahl yöntemine göre azot fiksasyon miktarları ve azotsuz besi ortamında üreme durumları (devam)

K8/1	(+++)	5,41	Ç1/7	(+++)	18,82
K8/2	(+++)	2,29	Ç3/1	(+)	12,41
K8/3	(++)	3,21	Ç3/2	(+++)	24,56
A2/1	(++)	28,16	Ç5/1	(+)	12,27
A2/3	(++)	T.E.D.B.	Ç5/3	(+++)	T.E.D.B.
A2/4	(++)	18,98	G3/1	(+)	11,7
A5/1	(+)	4,91	G3/2	(++)	10,3
A5/2	(+++)	30,14	G3/3	(++)	23,51
A6/1	(+++)	T.E.D.B.	G3/4	(+++)	5,14
A6/2	(+++)	8,98	G3/5	(+++)	6,44
A6/3	(+++)	T.E.D.B.	G3/6	(+)	5,05
A6/4	(+++)	15,23	G3/7	(++)	11,22
K4/1	(+++)	7,54	G4/1	(++)	21,14
K4/3	(-)	2,39	G4/2	(++)	T.E.D.B.
KH11/1	(+++)	10,43	G4/3	(+)	15,78
KH11/3	(+++)	3,57	G4/4	(+++)	T.E.D.B.
KH3/1	(++)	8,82	G4/5	(+++)	T.E.D.B.
H4/1	(+++)	16,29	G4/6	(+++)	14,54
H4/2	(+)	8,67	G4/7	(+++)	17,76
H4/3	(++)	T.E.D.B.	G4/9	(++)	7,24
H6/1	(++)	28,28	BP2/1	(++)	5,08
H6/2	(+)	T.E.D.B.	BP2/2	(+++)	9,06
H7/1	(+++)	T.E.D.B.	BP2/3	(+)	T.E.D.B.
H7/2	(++)	22,14	BP2/4	(+++)	5,39
H7/4	(+)	0,79	H8/1	(++)	T.E.D.B.
B2/1	(+++)	32,15	H8/2	(+++)	20,1
B3/2	(+)	35,45	P5/1	(+++)	16,68

(-) üreme yok
 (+) çok zayıf üreme var
 (++) üreme var
 (+++) çok iyi üreme var
 T.E.D.B. Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır.

4.6 Bakterilerin Fosfor Çözme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin in vitro şartarda tespiti, araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli konular arasında yer almaktadır. Bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin görsel hatta yarı nicel tespiti, zon oluşumu tanısına dayanan ve tek bir fosfor kaynağının kullanıldığı agarlı besiyerleri aracılığıyla yapılabilmektedir. Tek bir çözünemez fosfor kaynağı ile zenginleştirilmiş sıvı besi ortamında üretilen bakterilerin, besi ortamında çözdüğü fosfor miktarının ölçümüne dayanan yöntemler ise, agarlı besiyerlerinin alternatifi olarak kullanılmaktadır (Rodriguez ve Fraga 1999).

Bu çalışmada, bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin belirlenmesi için kalitatif ve kantitatif sonuçların elde edildiği iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her iki yöntemde de fosfor çözme yeteneklerinin belirlenmesi için, bitkilerin kullanmadığı çözünemez formdaki $Ca_3(PO_4)_2$ NBRIP besi ortamına eklenmiş ve izolatların $Ca_3(PO_4)_2$ 'ı bitkiler tarafından alınabilir formdaki elementer fosfora ayrıştırması incelenmiştir. Kalitatif yöntemde katı besi ortamına pH indikatörü olarak brom fenol mavisi eklenmiş, zon oluşumunun gözlenmesi (Şekil 4.14) pozitif sonuç olarak kabul edilerek fosfor çözme katsayısı hesaplanmıştır. Kantitatif sonuçlar için; 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik fosfor içeren standart çözeltiler ile standart eğri çıkarılmış ve ICP OES cihazında 3 gün süreyle üretilen bakteri kültürlerinin üst sıvılarının okutulması gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda, kantitatif deney sonuçları dikkate alındığında bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin 3,15 $\mu\text{g/mL}$ ile 186,52 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7). En yüksek fosfor çözme kapasitesine A6/2 (*Pseudomonas azotoformans*) kodlu bakterinin sahip olduğu ve *Enterobacter*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine dahil suşların da benzer şekilde yüksek fosfor çözme kapasitesi içerdiği belirlenmiştir. Kalitatif sonuçlar incelendiğinde ise 46 bakterinin fosfor çözebildiği görülmektedir.

Rodriguez ve Fraga (1999); yürüttükleri bir çalışmada; *Rhizobium*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* türlerinin, esasen trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit substratlarını kullanan en güçlü fosfor çözücüler olduklarını tespit etmişlerdir.

Chung vd. (2005); çeşitli bitkilerin rizosferlerinden izole ettikleri 13 izolat ile yaptıkları çalışmada; bu izolatların fosfor çözme miktarlarının $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ eklenmiş sıvı besi ortamında 96,2–142 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiğini ve bu izolatların 6 tanesinin *Enterobacter* cinsine dahil olduklarını saptamışlardır. Shen vd. (2016); Çin’de yürüttükleri çalışmada, $129 \pm 11,89$ $\mu\text{g/mL}$ fosfat çözme kapasitesi ile, en yüksek fosfor çözme yeteneğine sahip izolatın *Bacillus pumilus* olduğunu belirlemişlerdir. Mukhtar vd. (2017), çeşitli bitkilerin rizosferinden izole ettikleri altı fosfor çözücü bakterinin buğday verimine etkisini, sera ve tarla şartlarında araştırmışlardır. İzolatlar *Bacillus endophyticus*, *Bacillus sphaericus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus safensis*, *Bacillus megaterium* ve *Virgibacillus sp.* olarak tanımlanmış ve in vitro fosfor çözme yetenekleri, kaya fosfat içeren Pikovskaya besi ortamında test edilmiştir. En yüksek fosfor çözme yeteneği, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı besi ortamında 305,6 ppm ile *Bacillus megaterium*’da gözlenmiştir. Li vd. (2017); şeker kamışı rizosferinden izole ettikleri 30 *Pseudomonas* cinsine dahil izolat ile yürüttükleri çalışmada, 26 izolatın $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ eklenmiş Pikovskaya agar besi ortamında zon oluşturması sonucu fosfor çözme yeteneğinde olduklarını belirlemişlerdir.

Tüm bu literatür verileri, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile birlikte yorumlandığında; yüksek fosfor çözme kapasitesinde belirlenen bakterilerin literatür bulguları ile genel bir uyum gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Toprak ve bölge farklılıklarından kaynaklanan nedenlerle, literatürde yüksek fosfor çözücü olarak tanımlanan bazı bakteri cins ve türlerine ise, bu çalışmada kullanılan topraklarda rastlanılamamıştır.

Çizelge 4.7 Bakterilerin fosfor çözme miktarları

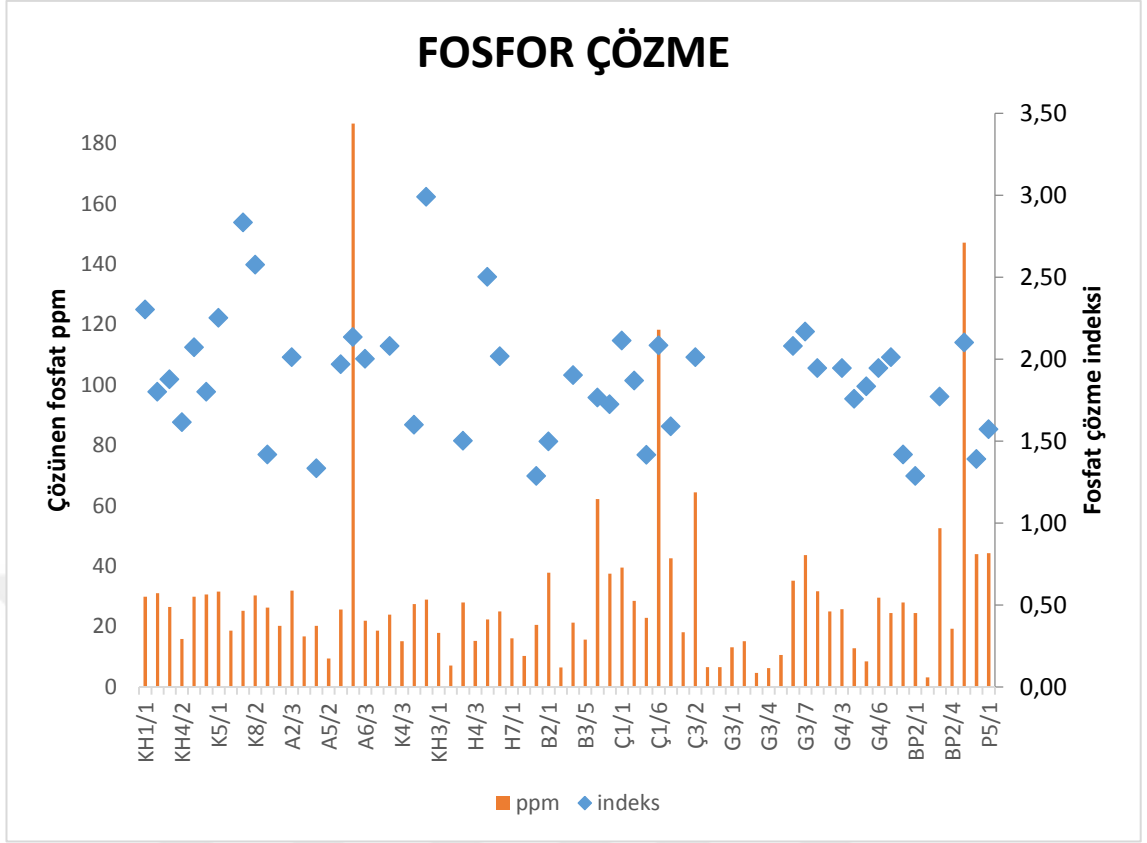
İzolat Kodu	Fosfat Çözme Katsayısı	Fosfat Çözme $\mu\text{g/mL}$	İzolat Kodu	Fosfat Çözme Katsayısı	Fosfat Çözme $\mu\text{g/mL}$
KH1/1	2,3	29,87	B3/4	1,9	21,24
KH1/2	1,8	31,08	B3/5	-	15,62
KH4/1	1,88	26,51	B5/2	1,76	62,17
KH4/2	1,61	15,92	B5/4	1,72	37,51
KH9/1	2,07	29,83	Ç1/1	2,11	39,48
KH9/2	1,8	30,6	Ç1/3	1,87	28,47

Çizelge 4.7 Bakterilerin fosfor çözme miktarları (devam)

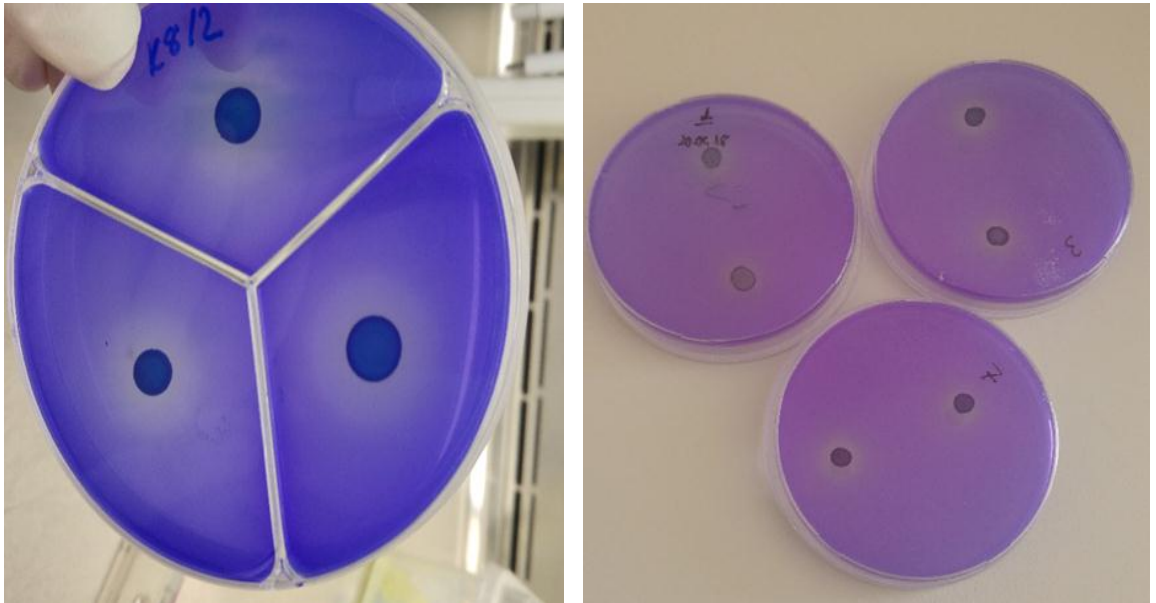
K5/1	2,25	31,61	Ç1/4	1,41	22,86
K6/1	-	18,6	Ç1/6	2,08	118,31
K8/1	2,83	25,26	Ç1/7	1,59	42,63
K8/2	2,57	30,29	Ç3/1	-	18,07
K8/3	1,42	26,31	Ç3/2	2,01	64,49
A2/1	-	20,27	Ç5/1	-	6,55
A2/3	2,01	31,86	Ç5/3	-	6,5
A2/4	-	16,72	G3/1	-	13,1
A5/1	1,33	20,27	G3/2	-	15,1
A5/2	-	9,41	G3/3	-	4,65
A6/1	1,97	25,67	G3/4	-	6,25
A6/2	2,13	186,52	G3/5	-	10,63
A6/3	2	21,94	G3/6	2,08	35,16
A6/4	-	18,67	G3/7	2,17	43,64
K4/1	2,08	23,94	G4/1	1,94	31,68
K4/3	-	15,14	G4/2	-	25,01
KH11/1	1,6	27,39	G4/3	1,94	25,79
KH11/3	2,99	28,97	G4/4	1,76	12,85
KH3/1	-	17,86	G4/5	1,83	8,48
H4/1	-	7,13	G4/6	1,94	29,58
H4/2	1,5	27,93	G4/7	2,01	24,46
H4/3	-	15,25	G4/9	1,42	27,97
H6/1	2,5	22,34	BP2/1	1,29	24,46
H6/2	2,02	25,01	BP2/2	-	3,15
H7/1	-	16,14	BP2/3	1,77	52,54
H7/2	-	10,22	BP2/4	-	19,28
H7/4	1,29	20,58	H8/1	2,1	147,1
B2/1	1,5	37,81	H8/2	1,39	43,98
B3/2	-	6,49	P5/1	1,57	44,26

- : zon oluşumu gözlenmemiştir.

T.E.D.B: Tespit edilebilir düzeyde bulunmamıştır.



Şekil 4.13 Fosfor çözme kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması



Şekil 4.14 NBRIP katı besi ortamında fosfor çözme yeteneğinin belirlenmesi

Yaptığımız çalışmada, katı besi ortamında zon oluşumunun gözlenmesi ile elde edilen sonuçlar ile sıvı besi ortamında elde edilen sonuçlar arasında; Joe vd. (2018)'nin yürüttükleri çalışmada tespit ettikleri gibi, herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak sıvı besi ortamında yapılan deneye göre, 20 µg/mL'in altında fosfor çözebilen bakteriler, kalitatif yöntem kullanıldığında zon oluşturmamış, dolayısıyla bu yöntemle göre pozitif sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.13). Nautiyal (1999); bakterilerin fosfor çözme yeteneklerinin belirlenmesi için kullanılan teknikler üzerinde yaptığı çalışmada; katı besi ortamında zon oluşmamasına rağmen, sıvı besiyerinde fosfor çözünürlüğünü tespit etmiş ve bu nedenle fosfor çözücülerini tanımlamak için görünür zon oluşumunun tespitinin yeterli bir yöntem olmadığını belirtmiştir. Sonuç olarak araştırmacı, toprak mikroorganizmalarının fosfor çözme yeteneklerinin salgıladıkları farklı organik asitlerin difüzyon oranlarının değişiklik göstermesinden dolayı sıvı NBRIP besiyerinde tespit edilmesinin daha etkili olacağını belirtmiştir. Yapılan bu çalışma bizim sonuçlarımızla paralellik göstermekte ve elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

4.7 Bakterilerin Potasyum Çözme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bakterilerin potasyum çözme kapasitelerinin belirlenmesi için, kalitatif ve kantitatif sonuçların elde edildiği iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her iki yöntemde de bakterilerin potasyum çözme yeteneklerinin belirlenmesi için, bitkilerin kullanmadığı çözünemez formdaki potasyum alüminyum silikat Aleksandrov besi ortamına eklenmiş ve izolatların çeşitli organik asitler salgılayarak, potasyum alüminyum silikatu bitkiler tarafından alınabilir formdaki elementer potasyuma ayrıştırması gözlenmiştir. Kalitatif olarak, zon oluşumuna göre (Şekil 4.16) elde edilen sonuçlar, Khanderparkar's oranı esas alınarak hesaplanmıştır. Kantitatif sonuçlar ise, bakteri süpernatantlarının flame fotometrede okutulması ile elde edilmiştir.

Katı besi ortamının kullanıldığı yöntemde 26 bakterinin potasyumu çözdüğü belirlenirken, sıvı besi ortamının kullanıldığı yöntemde 62 bakterinin 0,39-3,9 µg/mL arasında değişen miktarlarda (Çizelge 4.8) potasyum çözdüğü tespit edilmiştir. İki yöntem arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

En yüksek potasyum çözme miktarları; *Pseudomonas* cinsine dahil KH11/1, B3/4, B5/4, Ç1/1,Ç1/3,Ç1/7, G4/1, G4/3, G4/6, G4/7, G4/9, BP2/1 suşlarında ve *Arthrobacter* cinsine dahil KH3/1 suşunda tespit edilmiştir. Mohammad vd. (2016) yürüttükleri çalışmada; beş farklı bakteri suşunun potasyum ve fosfor çözme kapasitelerini, % 0,2 muskovit veya biyotit ve % 0,2 TCP içeren sıvı Aleksandrov besi ortamında araştırmıştır. 28 gün inkübasyonun ardından, kontrolde 5,67 ppm potasyum tespit edilirken, *Pseudomonas* cinsine ait S14-3 suşunun 9,83 ppm, S19-1 suşunun ise 9,26 ppm potasyum çözdüğünü kaydetmişlerdir. Xiaoa vd. (2017) ise; öncelikle kolza rizosferinden potasyum çözme potansiyeli olan 16 bakteri izole etmişlerdir. Yapılan in vitro analizler sonucunda S-15 *Mesorhizobium sp*, S-17 *Paenibacillus sp*. ve S-18 *Arthrobacter sp*. suşlarında en yüksek potasyum çözme değerlerini tanımlamışlardır. Parmar vd. (2016); mika ile zenginleştirilmiş Aleksandrov besi ortamı kullanarak mısır rizosferinden izole ettikleri 25 bakterinin en yüksek potasyum çözme kapasitesine sahip örneklerini, Biolog sistemi kullanarak saptamıştır. Bu çalışma bulgularına göre, en yüksek miktarda potasyum çözen bakteriler KSB-1 *Bacillus licheniformis* (46,52 ppm) ve KSB-3 *Bacillus subtilis* (42,37 ppm) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular dikkate alındığında, bu çalışma kapsamında incelenen bakterilerin potasyum çözme miktarları, yukarıda özetlenen literatür verilerine göre oldukça düşük çıkmıştır. Bu durumun; çalışmamız kapsamında kullanılan bakterilerin izole edildiği toprak numunelerinde, ülkemiz topraklarının genelinde olduğu gibi, potasyum miktarlarının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.8 Bakterilerin potasyum çözme miktarları

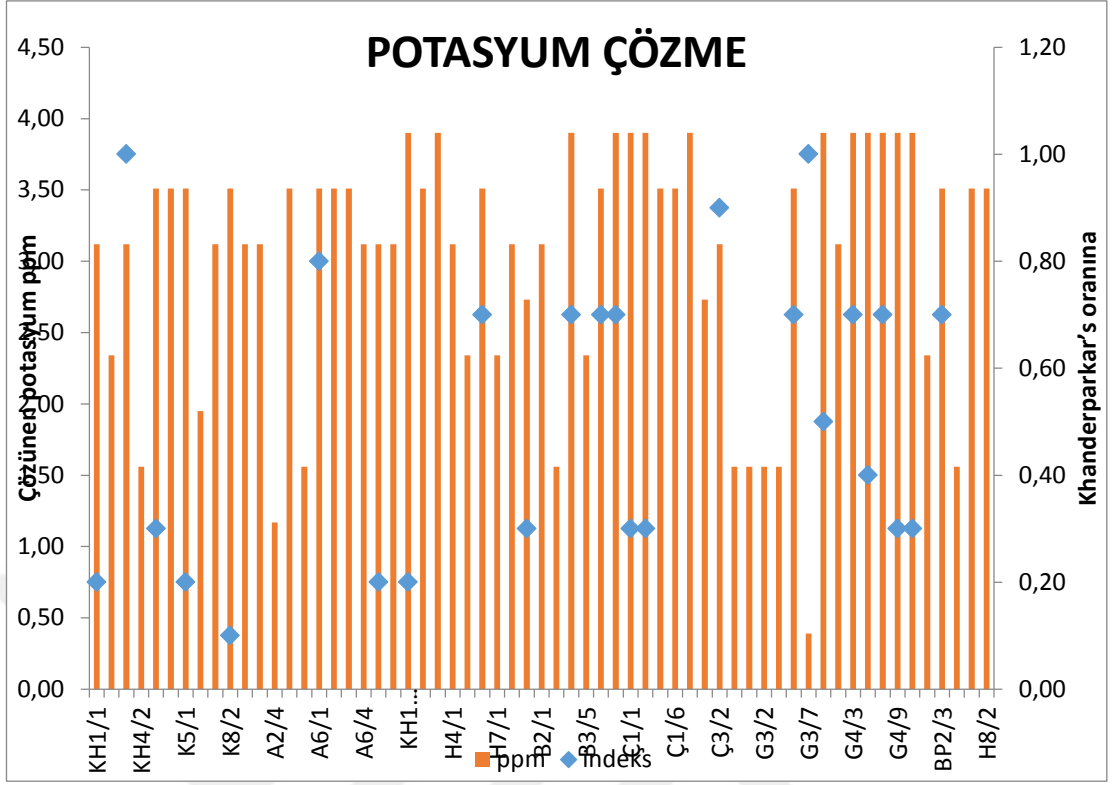
İzolat Kodu	Khanderparkar's oranı	Potasyum Çözme µg/mL	İzolat Kodu	Khanderparkar's oranı	Potasyum Çözme µg/mL
KH1/1	0,2	3,12	B3/4	0,7	3,9
KH1/2	-	2,34	B3/5	-	2,34
KH4/1	1	3,12	B5/2	0,7	3,51
KH4/2	-	1,56	B5/4	0,7	3,9
KH9/1	0,33	3,51	Ç1/1	0,3	3,9
KH9/2	-	3,51	Ç1/3	0,3	3,9

Çizelge 4.8 Bakterilerin potasyum çözme miktarları (devam)

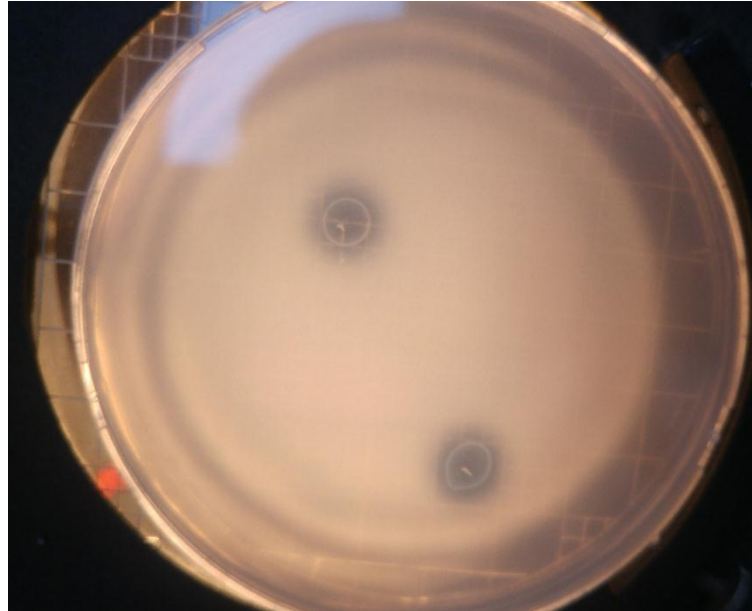
K5/1	0,2	3,51	Ç1/4	-	3,51
K6/1	-	1,95	Ç1/6	-	3,51
K8/1	-	3,12	Ç1/7	-	3,9
K8/2	0,1	3,51	Ç3/1	-	2,73
K8/3	-	3,12	Ç3/2	0,9	3,12
A2/1	-	3,12	Ç5/1	-	1,56
A2/3	-	<T.E.D.B	Ç5/3	-	1,56
A2/4	-	1,17	G3/1	-	<T.E.D.B
A5/1	-	3,51	G3/2	-	1,56
A5/2	-	1,56	G3/3	-	<T.E.D.B
A6/1	0,8	<T.E.D.B	G3/4	-	<T.E.D.B
A6/2	-	3,51	G3/5	-	1,56
A6/3	-	3,51	G3/6	0,7	3,51
A6/4	-	3,12	G3/7	1	0,39
K4/1	0,2	3,12	G4/1	0,5	3,9
K4/3	-	3,12	G4/2	-	3,12
KH11/1	0,2	3,9	G4/3	0,7	3,9
KH11/3	-	3,51	G4/4	-	<T.E.D.B
KH3/1	-	3,9	G4/5	-	<T.E.D.B
H4/1	-	3,12	G4/6	0,4	3,9
H4/2	-	<T.E.D.B	G4/7	0,7	3,9
H4/3	-	2,34	G4/9	0,3	3,9
H6/1	0,7	3,51	BP2/1	0,3	3,9
H6/2	0,8	<T.E.D.B	BP2/2	-	2,34
H7/1	-	2,34	BP2/3	0,7	3,51
H7/2	-	3,12	BP2/4	-	1,56
H7/4	0,3	2,73	H8/1	-	3,51
B2/1	-	3,12	H8/2	-	3,51
B3/2	-	1,56	P5/1	-	<T.E.D.B

- : zon oluşumu gözlenmemiştir.

T.E.D.B: Tespit edilebilir düzeyde bulunmamıştır.



Şekil 4.15 Bakterilerin potasyum çözme kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması



Şekil 4.16 Aleksandrov besi ortamında zon oluşumu

4.8 Bakterilerin Siderofor Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bakterilerin siderofor üretme kapasitelerinin belirlenmesi için; demir içeren CAS agarda üretilen bakterilerin, salgıladıkları siderofor sayesinde demiri şelatlayarak, besi ortamı rengini maviden sarı-turuncuya dönüştürmesi esas alınmış ve sarı turuncu rengin gözlemlendiği zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9).

Bu esas doğrultusunda yürütülen denemeler sonucunda, araştırılan bakterilerin 33 tanesinin 2-43 mm arasında değişen büyüklükte zon çapında siderofor üretebildiği belirlenmiştir. En yüksek siderofor üretimi K8/1 (*Pseudomonas gessardi*) suşunda 43 mm olarak belirlenirken, bunu H6/1 (*Arthrobacter humicola*) 40 mm, P5/1 (*Bacillus mojavenensis*) 39 mm, H8/2 (*Paenibacillus polymyxa*) 31 mm zon oluşumu ile takip etmiştir. Siderofor üreten suşların % 75'i *Pseudomonas* cinsi üyeleri olarak tanımlanmıştır.

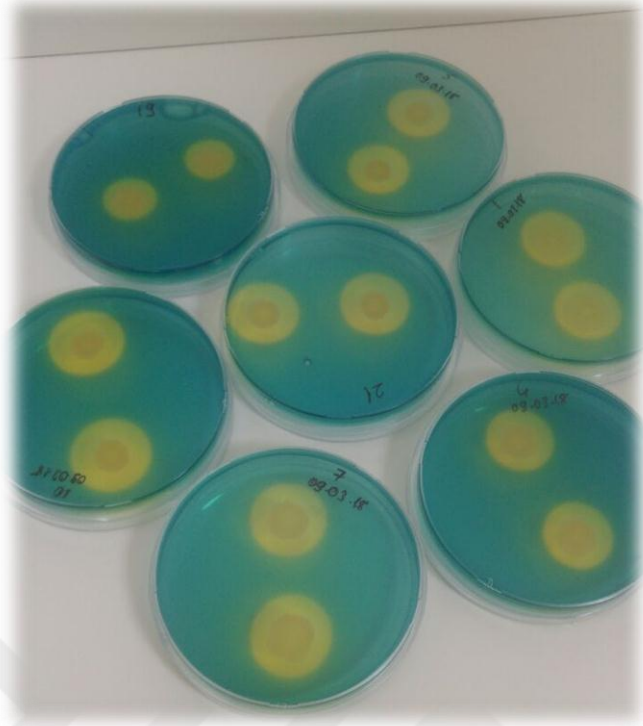
Beneduzi vd. (2008); yedi farklı çeltik tarlasından izole ettikleri 296 *Bacillus* ve *Paenibacillus* türü ile yürüttükleri çalışmada, 32 izolatanın siderofor üretme yeteneğinde olduğunu saptamışlardır. Upadhyay vd. (2009) buğday rizosferinden izole ettikleri 130 izolatta, bitki büyümesini teşvik edici özelliklerin tanımlanması amacıyla yürüttükleri çalışmada; izolatların 8'inin 3,5–5,2 mm arasında değişen miktarlarda siderofor ürettiğini ve 16S rDNA sonuçlarına göre izolatların *Bacillus* ve *Arthrobacter* cinslerine dahil olduğunu belirlemişlerdir. Li vd. (2017); şeker kamışı rizosferinden izole ettikleri farklı türlere dahil 100 izolattan seçtikleri *Pseudomonas* cinsine dahil 30 örnek ile sürdürdükleri araştırmada; izolatlardan 20 tanesinin, 0,3 cm üzerinde zon oluşumuna yol açacak düzeyde siderofor ürettiğini bulmuşlardır.

Çalışmamızda tanımlanan yüksek düzeyde siderofor üreticiler ve siderofor üretim miktarları, literatür verileri ile birlikte yorumlandığında, bulguların uyumlu olduğu görülmektedir. Zira çalışmamızda yüksek siderofor üreticileri olarak tanımlanan *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* ve *Bacillus* türleri, literatür verilerinde de yüksek siderofor üreticileri olarak tanımlanmaktadır.

Çizelge 4.9 Bakterilerin siderofor üretim düzeyleri

İzolat Kodu	Zon çapı mm	İzolat Kodu	Zon çapı mm
KH1/1	8	B3/4	-
KH1/2	-	B3/5	-
KH4/1	7	B5/2	-
KH4/2	11	B5/4	3
KH9/1	13	Ç1/1	22
KH9/2	-	Ç1/3	7
K5/1	13	Ç1/4	6
K6/1	-	Ç1/6	-
K8/1	43	Ç1/7	4
K8/2	13	Ç3/1	-
K8/3	-	Ç3/2	-
A2/1	-	Ç5/1	-
A2/3	-	Ç5/3	-
A2/4	-	G3/1	-
A5/1	-	G3/2	-
A5/2	-	G3/3	-
A6/1	8	G3/4	-
A6/2	-	G3/5	-
A6/3	4	G3/6	6
A6/4	-	G3/7	3
K4/1	15	G4/1	6
K4/3	4	G4/2	-
KH11/1	3	G4/3	10
KH11/3	8	G4/4	-
KH3/1	15	G4/5	-
H4/1	-	G4/6	9
H4/2	-	G4/7	11
H4/3	-	G4/9	11
H6/1	40	BP2/1	8
H6/2	2	BP2/2	-
H7/1	-	BP2/3	-
H7/2	-	BP2/4	-
H7/4	-	H8/1	20
B2/1	-	H8/2	31
B3/2	-	P5/1	39

- : zon oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.17 CAS agarda siderofor üretiminin tespiti

4.9 Bakterilerin İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bakterilerin indol asetik asit üretim miktarlarını belirlemek için; 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standartlar hazırlanmış ve numune gibi muamele edilerek, standart eğri çıkarılmıştır. Kontrol olarak, bakteri inoküle edilmemiş besiyeri kullanılmıştır. Renklendirilen numuneler UV spektrofotometrede 530 nm'de okutularak IAA miktarları belirlenmiştir.

1 g/L triptofan içeren besi ortamında 7 gün inkübe edilen bakterilerin tamamının; 0,02 - 50,05 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen miktarlarda İAA ürettikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). En yüksek İAA üretimi 50,05 $\mu\text{g/mL}$ G3/4 (*Arthrobacter sp.*) suşu tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekiz adeti *Pseudomonas* ve iki adeti *Arthrobacter* olmak üzere, toplam on suşun, 20 $\mu\text{g/mL}$ 'nin üzerinde IAA ürettiği saptanmıştır.

Malik ve Sindhu (2011); nohut ve “green gram” rizosferlerinden izole edilen 40 adet *Pseudomonas* suşundan 11'inin indol asetik asit ürettiğini saptamıştır. Bu araştırmacılar;

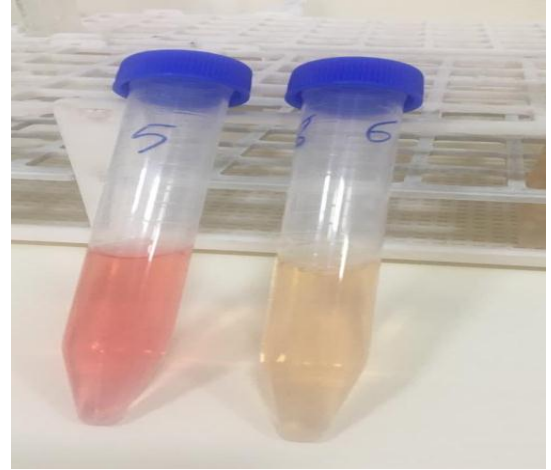
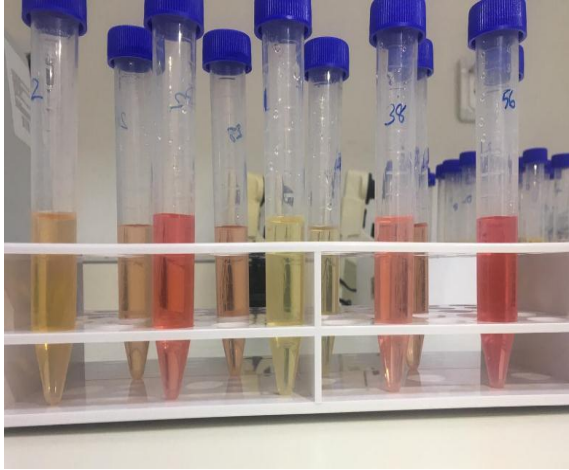
CPS59, CPS63, CPS67, CPS72, MPS77, MPS78 ve MPS94 izolatlarının 2 günlük inkübasyonun sonunda 18,1-31,2 ppm arasında değişen miktarlarda, 4 günlük inkübasyon sonunda ise 22,2-40,6 ppm arasında değişen miktarlarda IAA ürettiğini belirlemiştir. Özdal vd. (2017); sığır kuyruğu bitkisinin rizosferinden izole ettikleri IAA üreticisi sekiz bakteri suşu arasından *Arthrobacter agilis* A17 ‘nin 75 ppm ile en yüksek IAA ürettiğini ve bu izolatın biyogübre amaçlı immobilizasyon çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamız sonuçları, bu literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 4.10 Bakterilerin IAA üretim miktarları

İzolat Kodu	IAA miktarı µg/mL	İzolat Kodu	IAA miktarı µg/mL
KH1/1	3,33	B3/4	12,01
KH1/2	4,07	B3/5	10,32
KH4/1	3,88	B5/2	11,15
KH4/2	2,20	B5/4	4,86
KH9/1	25,23	Ç1/1	14,08
KH9/2	7,16	Ç1/3	30,31
K5/1	22,13	Ç1/4	13,84
K6/1	1,59	Ç1/6	5,85
K8/1	3,33	Ç1/7	41,02
K8/2	24,6	Ç3/1	0,02
K8/3	0,38	Ç3/2	18,17
A2/1	1,78	Ç5/1	0,19
A2/3	1,23	Ç5/3	1,21
A2/4	1,20	G3/1	1,78
A5/1	15,66	G3/2	0,82
A5/2	6,85	G3/3	0,30
A6/1	3,27	G3/4	50,05
A6/2	11,03	G3/5	1,12
A6/3	8,55	G3/6	14,13
A6/4	0,6	G3/7	13,96
K4/1	3,52	G4/1	11,38

Çizelge 4.10 Bakterilerin IAA üretim miktarları (devam)

K4/3	5,53	G4/2	1,21
KH11/1	8,55	G4/3	16,47
KH11/3	31,75	G4/4	1,43
KH3/1	6,84	G4/5	0,82
H4/1	4,57	G4/6	19,19
H4/2	3,11	G4/7	8,86
H4/3	6,16	G4/9	27,92
H6/1	18,4	BP2/1	37,15
H6/2	4,56	BP2/2	1,84
H7/1	27,11	BP2/3	9,25
H7/2	2,53	BP2/4	3,74
H7/4	0,41	H8/1	5,36
B2/1	4,4	H8/2	0,95
B3/2	0,931	P5/1	7,21



Şekil 4.18 IAA üretimi deney tüpleri

4.10 Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin antimikrobiyal aktivite özellikleri; funguslarda çift kültür yöntemi ile, bakterilerde ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çift kültür yöntemi, biyolojik kontrol ajanlarının ön taramasında kullanılan önemli testlerden

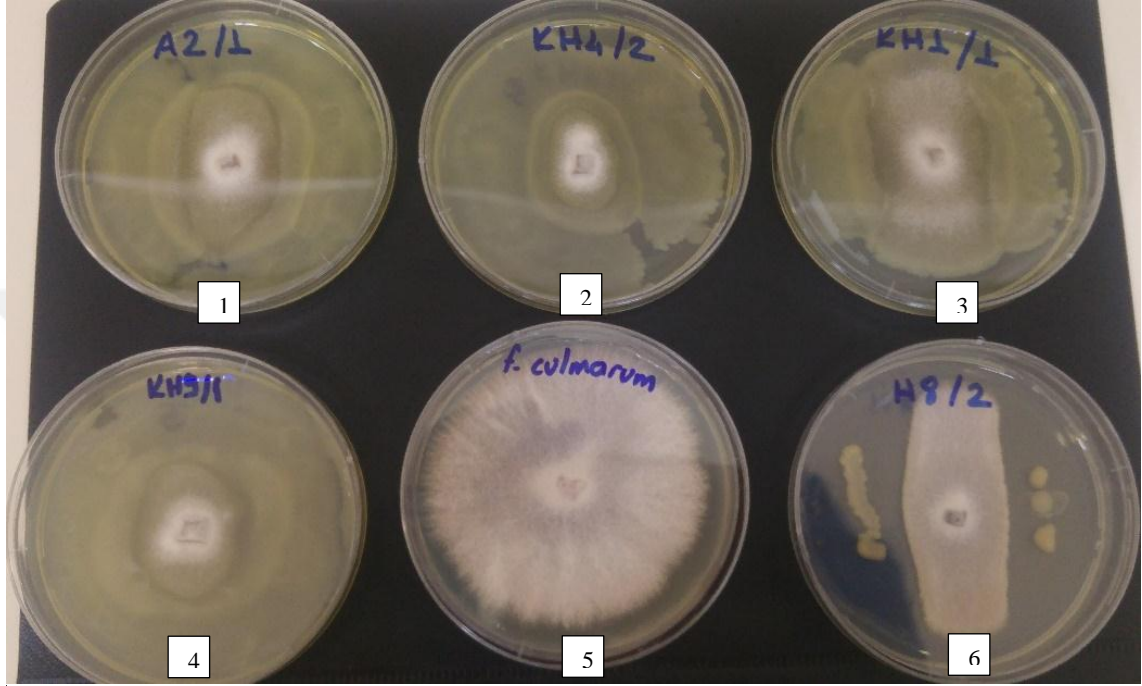
biridir. Antagonistik etkiler, genellikle bakteri izolatları ve mantar izolatları arasında inhibisyon bölgelerinin oluşması veya bakteriyel izolatlar karşı radyal misel büyümesinin yüzde inhibisyonunun hesaplanması ile belirlenmektedir (Ji vd. 2014, Lee vd. 2017).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; kullanılan bakterilerin 30 tanesi *Fusarium culmorum*, 12 tanesi *Sclerotium rolfsii* ve yalnızca 1 tanesi *Pseudomonas tomato* üzerinde etkili bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Fusarium culmorum'un konakçıları arasında başta buğday, arpa, yulaf, çavdar, mısır, sorgum ve çeşitli çim bitkileri olmak üzere şeker pancarı, keten, karanfil, fasulye, bezelye, kuşkonmaz, kırmızı yonca, pırasa, ladin, çilek ve patates sayılabilir (Scherin vd. 2013). Bu fungus buğdayda kök, kök boğazı, sap çürüklüğüne ve başak yanıklığına neden olan önemli bir patojendir (Treikale vd. 2010). Denenen bakterilerin *Fusarium culmorum*'a karşı % inhibisyon miktarları, kontrol ile kıyaslandığında % 40-64 (30-48 mm) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.11). Denemelerde patojene karşı etkili olan suşların büyük çoğunluğunun (% 66; 20 suş) *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas* cinsinin yanısıra *Bacillus*, *Peanibacillus*, *Strenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Arthrobacter* ve *Olivibacter* cinine dahil bazı suşlar da *Fusarium culmorum*'a karşı etkili bulunmuştur (Şekil 4.22).

Kotan vd. (2011); *Bacillus*, *Burkholderia* *Pseudomonas*, *Flavobacter* cinslerine dahil 17 suşun *Fusarium sambucinum*, *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium culmorum*' a karşı antifungal aktivitelerini belirlemişlerdir. Tüm izolatların fungal patojenler üzerinde etkili olduğunu, en yüksek antogonistik etkinin, 35,33-47,37 mm arasında değişen inhibisyon zonu ile *B. cepacia* tarafından gerçekleştirildiğini kaydetmişlerdir. Rizosferden izole edilen *Strenotrophomonas* cinsine dahil suşların; *Rhizoctonia solani* (Kai vd. 2007) ve çeşitli fungal bitki patojenlerine (Jakobi vd. 1996) karşı ürettikleri litik enzimler, sideroforlar, antibiyotikler ve maltofin gibi metabolitler vasıtasıyla etkili oldukları bulunmuştur. Birçok enterobakter türü bitkisel fungal patojenlere karşı antagonistik etkili biyokontrol ajanları olarak tarif edilmiştir. Yapılan çalışmalarda; *Enterobacter cloacae*'nın bazı suşlarının, *Fusarium* mantarlarının yol

açtığı bitkisel solgunluk hastalığına karşı etkili olduğu tanımlanmıştır (Chernin vd. 1995). Ancak *Arthrobacter* ve *Variovorax* 'ın *Fusarium*'a karşı etkisi ile ilgili herhangi bir veri mevcut değildir. Bu açıdan çalışmamız bulguları literatüre katkı sağlayacak niteliktedir.

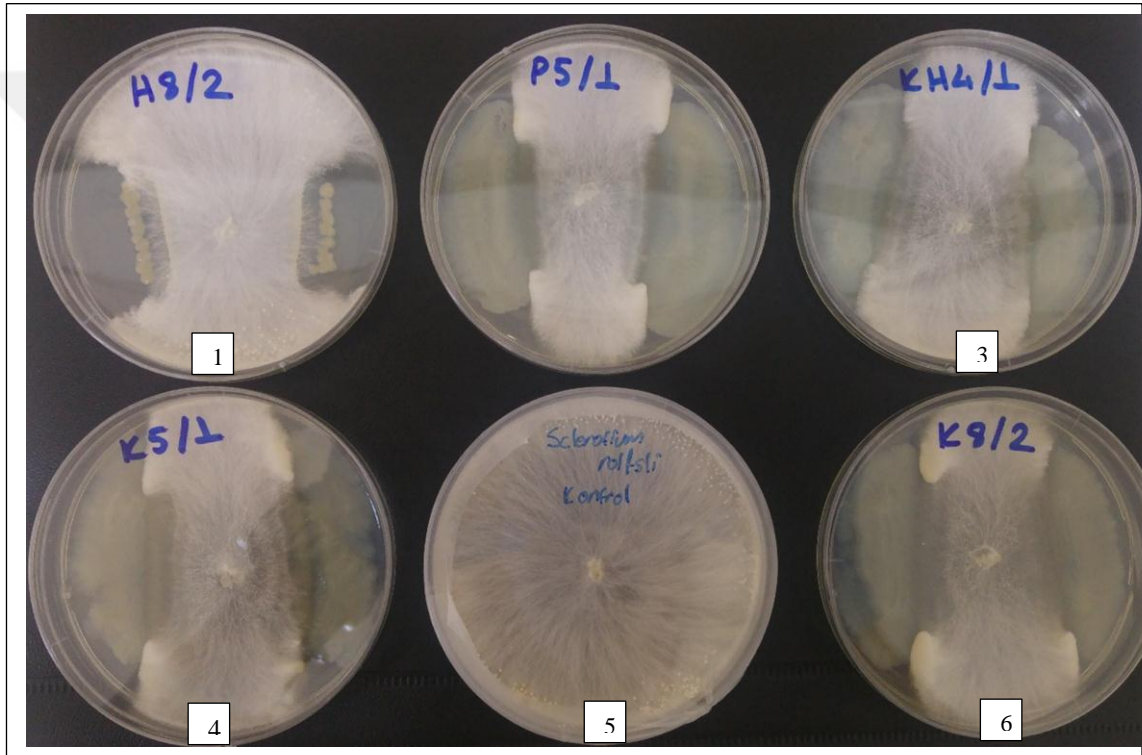


Şekil 4.19 *Fusarium culmorum*'a karşı antagonistik etki

1. Petri A2/1 suşunun etkisi 2. Petri KH4/2 suşunun etkisi 3. Petri KH1/1 suşunun etkisi 4. Petri KH3/1 suşunun etkisi 5. Petri Kontrol 6. Petri H8/2 suşunun etkisi

Sclerotium rolfsii 600'den fazla konakçıya sahip, toprak kökenli bir fungustur ve birçok bitkide güney yanıklığı hastalığına neden olmaktadır (Zhang vd. 2018). *Sclerotium rolfsii*; tarla, sebze, meyve ve süs bitkileri dahil olmak üzere çok çeşitli bitkilerde hastalığa neden olur. Yer fıstığı için önemli bir patojendir. Çalışmamızda tanımlanan bakterilerin *Sclerotium rolfsii*'ye karşı % inhibisyon miktarları kontrol ile kıyaslandığında % 46,67-68,89 (42-62 mm) arasında değiştiği saptanmıştır. Etkili olan bakterilerin % 83,33'ü (10 suş), literatür verilerinde olduğu gibi, *Pseudomonas* cinsine dahil bulunmuştur. *Pseudomonas* cinsine dahil suşların yanısıra *Paenibacillus polymxa* H8/2 ve *Bacillus mojavensis* P5/1 suşları da *Sclerotium rolfsii*'ye karşı ekili bulunmuştur.

Pastor vd. (2010); sağlıklı domates bitkilerinin köklerinden izole ettikleri *Pseudomonas*'ların bitki patojeni *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* ve *Fusarium solani*'ye karşı antagonistik etkisini belirledikleri çalışmada, PCI2 izolatının 27 mm ile *Sclerotium rolfsii*'ye karşı en yüksek inhibisyon zonunu oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışma kapsamında yürütülen sera denemesinde, sadece patojen ile enfekte edilen toprakta yetiştirilen bitki ile PCI2 izolatı uygulanan enfekte toprakta yetiştirilen bitki karşılaştırıldığında, bitki ve kök kuru ağırlığının bakteri varlığında sırasıyla % 63 ve % 70 daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



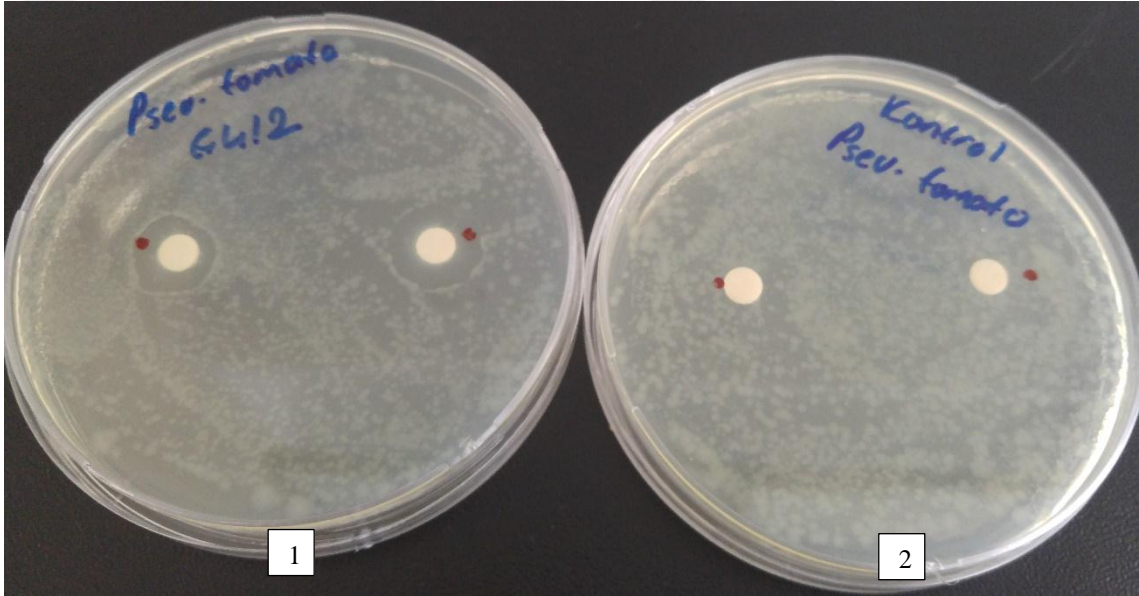
Şekil 4.20 *Sclerotium rolfsii* 'ye karşı antagonistik etki

1. Petri H8/2 suşunun etkisi 2. Petri P5/1 suşunun etkisi 3. Petri KH4/1 suşunun etkisi 4. Petri K5/1 suşunun etkisi 5. Petri Kontrol 6. Petri K8/2 suşunun etkisi

Pseudomonas tomato; domateste bakteriyel benek hastalığı etmenidir. Bitkinin tüm toprak üstü organlarında leke şeklinde belirti oluşturmaktadır. Belirtiler fide döneminde başlamakta ve fidelerin yaprak ve gövdelerinde çok sayıda kahverengi-siyah lekelerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu lekeler zamanla tüm fidenin kurumasına yol açmaktadır (Anonim, 2008). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre sadece

Olivibacter soli G4/2 suşunda, bu patojene karşı 10 mm inhibisyon zonu oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.21). Bu, söz konusu bakterinin PGPR olabileceğine dair ilk veridir.

Aysan ve Çınar (2002) tarafından yapılan bir çalışmada; bitki patojeni olan *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı 538 antagonistik bakterinin etkinliği test edilmiştir. Denenen izolatlardan 137 tanesinin inhibisyonu zonlarının 0,2-1 cm arasında değiştiği saptanmıştır. İn vitro deneme sonuçlarına göre seçilen 18 izolattın, saksı denemeleri sonucunda hastalık gelişimini % 31-90, hastalık şiddetini ise % 5-84 oranında azalttığı belirlenmiştir.

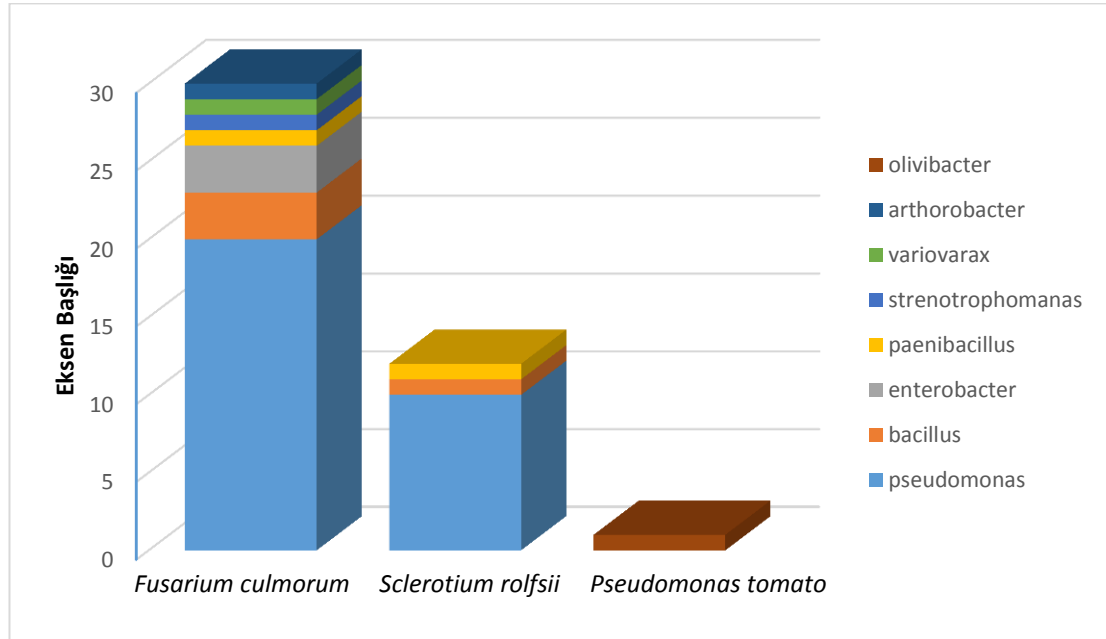


Şekil 4.21 *Pseudomonas tomato*'a karşı antagonistik etki
1. Petri *Olivibacter soli* G4/2 suşunun etkisi 2. Petri Kontrol

Araştırmamızda kullandığımız bakterilerden 11 tanesi, denenen her iki fungusa karşı etkili olurken, 17 tanesi sadece *Fusarium culmorum*'a, 1 tanesi sadece *Sclerotium rolfsii*'a karşı etkili bulunmuştur. *Pseudomonas tomato*'ya karşı etkili bulunan izolattın funguslar üzerine etkisi tespit edilememiştir. Her iki patojen fungusa karşı etkili bulunan bakteri izolatlarının çoğunlukla *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu, ikinci sırada ise *Bacillus* cinsinin geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Bitki büyümesini artırıcı özellikleri ve biyolojik kontrol potansiyelleri dikkate alınarak; başta *Bacillus*

(Lee vd. 2017), *Pseudomonas* (Priyanka vd. 2017) ve *Streptomyces* (Lu vd. 2016) olmak üzere, çok sayıda toprak bakterisinden tarımda yararlanılmaktadır. *Pseudomonas* cinsi üyeleri, adaptif metabolizmaları ve birçok antifungal bileşik üretme kabiliyetleri nedeniyle üstün biyolojik kontrol özelliklerine sahiptir (Trivedi vd. 2008). Toprak kökenli patojenlerin *Pseudomonas*'lar tarafından inhibisyonu; özellikle floroglükoller, fenazinler, pyoluteorin, pirrolnitritin ve hidrojen siyanür gibi sekonder metabolitlerin salgılanması ile bağlantılıdır (Haas ve Défago 2005).

Çalışmamızda *Paenibacillus polymyxa* H8/2 suşu, her iki fungusa karşı önemli derecede etkili bulunmuştur. *P. polymyxa* suşları; salgıladıkları antimikrobiyal bileşikleri sayesinde mantar, bakteri ve nematodların neden olduğu çeşitli bitki hastalıklarını önleyen geniş spektrumlu antagonistik aktiviteye sahiptir (Weselowski vd. 2016). Yapılan çalışmalar *P. polymyxa* suşlarının bakterilere karşı polimiksin, polipeptin, gavaserin, saltavalin ve jolipeptin gibi peptid antibiyotikleri; Gram pozitif bakterilere, funguslar ve aktimisetlere karşı ise LI-F antibiyotikler, gatavalin ve fusarisidleri, üretmek suretiyle etkili olduklarını göstermiştir (Lal ve Tabacchioni 2009, Deng vd. 2011).



Şekil 4.22 Antimikrobiyal aktive gösteren bakterilerin cinslere göre dağılımı

Çizelge 4.11 Bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri

İzolat Kodu	<i>Fusarium culmarum</i>		<i>Sclerotium rolfsli</i>		<i>Pseudomonas tomato</i>
	İnhibisyon zonu mm	İnhibisyon %	İnhibisyon zonu mm	İnhibisyon %	İnhibisyon zonu mm
KH1/1	45	60	62	68,89	-
KH1/2	-	0	-	0	-
KH4/1	44	58,67	55	61,11	-
KH4/2	49	61,33	61	67,78	-
KH9/1	44	58,66	65	72,22	-
KH9/2	-	0	-	0	-
K5/1	40	53,33	60	66,67	-
K6/1	35	46	-	0	-
K8/1	45	60	-	0	-
K8/2	40	53	61	67,78	-
K8/3	-	0	-	0	-
A2/1	46	61,33	-	0	-
A2/3	-	0	-	0	-
A2/4	-	0	-	0	-
A5/1	35	46,66	-	0	-
A5/2	-	0	-	0	-
A6/1	-	0	-	0	-
A6/2	-	0	-	0	-
A6/3	-	0	50	55,56	-
A6/4	-	0	-	0	-
K4/1	47	62,66	-	0	-
K4/3	-	0	-	0	-
KH11/1	48	64	-	0	-
KH11/3	47	62,66	55	61,11	-
KH3/1	-	0	-	0	-
H4/1	-	0	-	0	-
H4/2	40	53,33	-	0	-
H4/3	-	0	-	0	-
H6/1	34	45,33	-	0	-
H6/2	-	0	-	0	-
H7/1	-	0	-	0	-
H7/2	-	0	-	0	-
H7/4	-	0	-	0	-
B2/1	-	0	-	0	-
B3/2	-	0	-	0	-
B3/4	36	48	-	0	-
B3/5	-	0	-	0	-

Çizelge 4.11 Bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri (devam)

B5/2	37	49,33	-	0	-
B5/4	35	46,66	-	0	-
Ç1/1	-	0	-	0	-
Ç1/3	30	40	-	0	-
Ç1/4	-	0	-	0	-
Ç1/6	40	53,33	-	0	-
Ç1/7	-	0	-	0	-
Ç3/1	-	0	-	0	-
Ç3/2	43	57,33	-	0	-
Ç5/1	-	0	-	0	-
Ç5/3	-	0	-	0	-
G3/1	-	0	-	0	-
G3/2	-	0	-	0	-
G3/3	-	0	-	0	-
G3/4	-	0	-	0	-
G3/5	-	0	-	0	-
G3/6	34	45,33	-	0	-
G3/7	33	44	-	0	-
G4/1	35	46,66	47	52,22	-
G4/2	-	0	-	0	10
G4/3	-	0	-	0	-
G4/4	-	0	-	0	-
G4/5	-	0	-	0	-
G4/6	-	0	-	0	-
G4/7	35	46,66	42	46,67	-
G4/9	37	46,66	-	0	-
BP2/1	-	0	-	0	-
BP2/2	-	0	-	0	-
BP2/3	34	45,33	-	0	-
BP2/4	-	0	-	0	-
H8/1	40	53,33	-	0	-
H8/2	47	62,66	52	57,78	-
P5/1	34	45,33	60	66,67	-

- : zon oluşumu gözlenmemiştir.

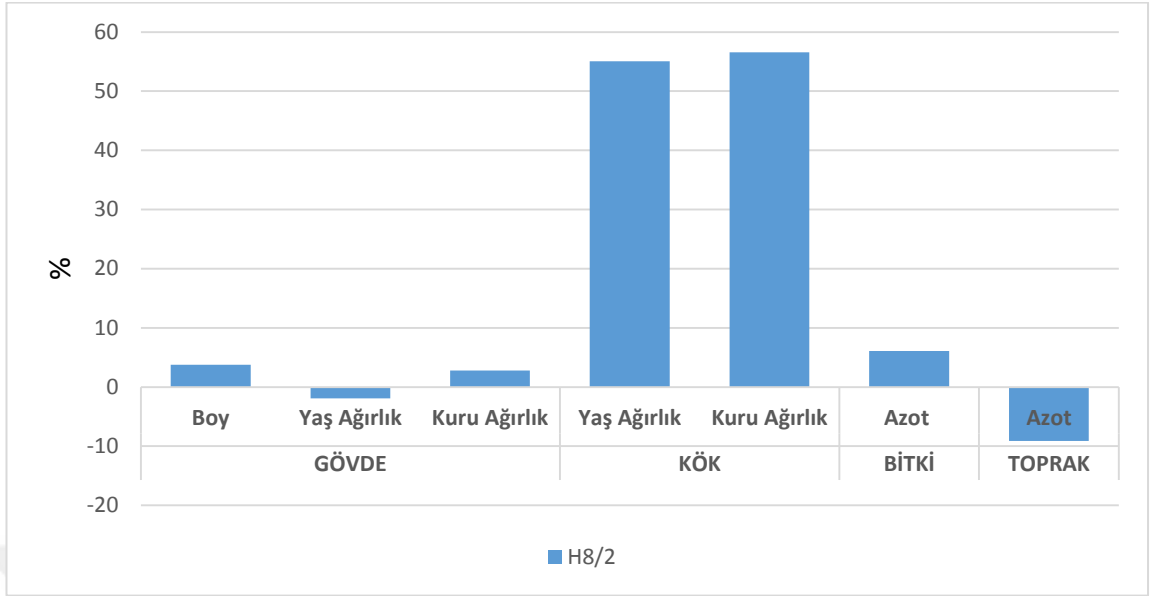
4.11 Sera Denemeleri

nifH geni tespit edilmesi dikkate alınarak azot fikseri olarak seçilen *Paenibacillus polymyxa* H8/2 suşunun azotlu kimyasal gübre kullanmaksızın bitki gelişimi üzerine olan etkisinin test edildiği sera denemesi; 1 bakteri uygulaması (*Paenibacillus polymyxa* H8/2) ve K1 (optimum kimyasal gübrelili), K0 (gübresiz) kontrol konuları ile, Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü serasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulmuştur.

Ekimden 10 hafta sonra yapılan hasat sonrasında bitki boyu, bitki ve kök kuru/yaş ağırlığı, bitki ve toprakta toplam azot miktarları analiz edilmiştir (Çizelge 4.12). Varyans analiz sonuçlarına göre; kök kuru ve yaş ağırlığı ile toprakta ve bitkide toplam azot miktarı parametrelerinde konular arasında % 5 önem seviyesinde istatistiki olarak fark bulunmuştur. H8/2 bakterisi uygulanmış konu ile K1 konusunun kök kuru ve yaş ağırlıkları aynı grupta yer alırken; H8/2 konusu K0 konusu ile kıyaslandığında kök kuru ve yaş ağırlığında yaklaşık % 55'lik artış sağlamıştır (Şekil 4.23). Bitkide azot miktarı en fazla K1 konusunda, en düşük ise K0 konusunda tespit edilirken, H8/2 konusu K0 konusu ile kıyaslandığında yaklaşık bitki azot içeriğinde % 6'lık artışın gerçekleştiği saptanmıştır. Toprakta toplam azot miktarı incelendiğinde, H8/2 konusu K1 ve K0 konularının gerisinde kalmıştır. Deneme sonuçları diğer parametreler açısından değerlendirildiğinde, konular arasında % 5 önem seviyesinde istatistiki olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun yanısıra H8/2 bakterisinin uygulanması bitkinin kuru ağırlığında ve boyunda K0 ile kıyaslandığında % 2,8 ve % 3,77'lik artış meydana getirmiştir (Şekil 4.23).

Çizelge 4.12 Azot sera denemesi sonucu elde edilen veriler

Konular	Gövde			Kök		Bitki	Toprak
	Boy (cm)	Yaş Ağırlık (g/saksı)	Kuru Ağırlık (g/saksı)	Yaş Ağırlık (g/saksı)	Kuru Ağırlık (g/saksı)	Toplam Azot (%)	Toplam Azot (%)
H8/2	55±1,1	13,93±0,6	3,67±0,2	1,83±0,28 a	1,55±0,25 a	5,23±0,37 ab	0,13±0,003 b
K1	54±1,5	15±0,8	3,93±0,6	1,73±0,19 a	1,48±0,07 a	5,70±0,20 a	0,15±0,003 a
K0	53±1,4	14,2±0,8	3,57±0,1	1,18±0,19 b	0,99±0,18 b	4,93±0,47 b	0,14±0,002 ab



Şekil 4.23 *Paenibacillus polymyxa* H8/2 suşunun K0'a kıyasla verim parametrelerinde ve azot miktarlarında meydana getirdiği % değişim

Bakterilerin fosfor çözme yeteneklerinin sera koşullarında değerlendirilmesi amacıyla kurulan ikinci sera denemesinde, in vitro çalışmalarda 40 µg/mL'nin üzerinde fosfor çözdüğü belirlenen bakteriler konuları oluşturmuştur. H8/1, Ç1/6, Ç3/2 suşları *Enterobacter* cinsine dahil oldukları ve gübre olarak kullanımlarına yönetmelikler gereği izin verilmediği için sera denemesine dahil edilmemişlerdir. Seçilen 7 bakteri (G3/7, P5/1, H8/2, A6/2, B5/2, BP2/3, Ç1/7) uygulaması, KO (gübresiz) ve K1(optimum kimyasal gübreli) kontrol konularından oluşan deneme Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü serasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulmuştur.

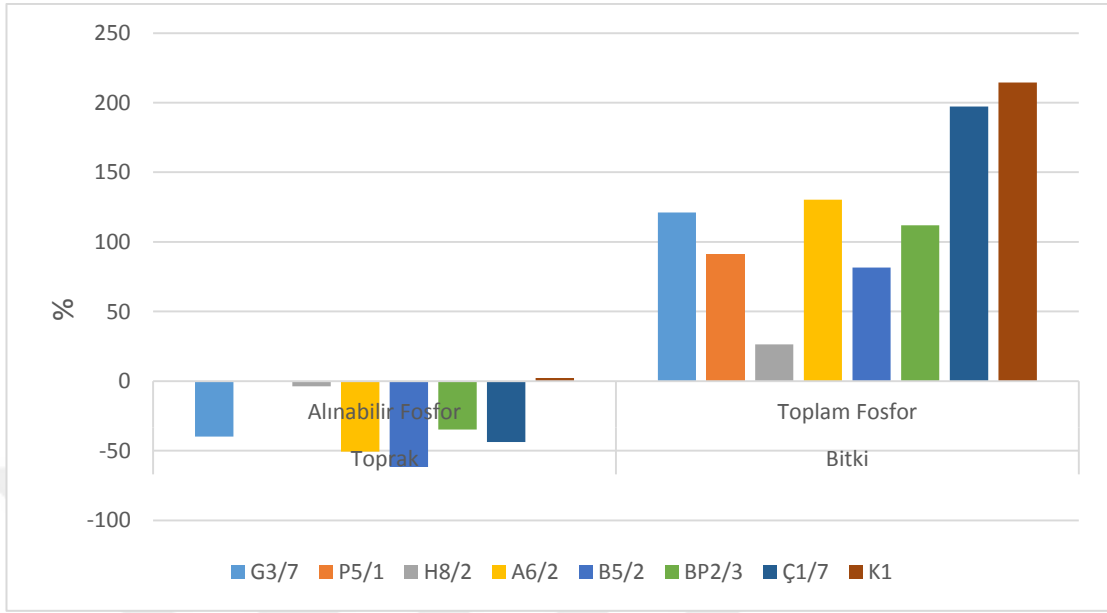
Ekimden 10 hafta sonra hasat gerçekleştirilmiş ve bitki boyu, bitki ve kök kuru/yaş ağırlığı, toplam fosfor miktarı ve toprakta alınabilir fosfor miktarı analiz edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre incelenen tüm parametrelerde, konular arasında % 5 önem seviyesinde istatistiki olarak fark bulunmuş ve tüm parametreler Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.13). Bitki boyları karşılaştırıldığında Ç1/7 ve BP2/3 konuları, K1 konusu ile aynı grupta yer alırken, konuların tümü K0 ile kıyaslandığında bitki boyunda % 4,8 - 19,5 arasında değişen oranlarda artışa sebep olmuşlardır (Şekil 4.25). Ç1/7, BP2/3 ve G3/7 konularının bitki

yaş ağırlıkları, K1 konusundan sonra ikinci sırada yer almışlardır. Ç1/7, BP2/3, B5/2, H8/2, P5/1, G3/7 konularının gövde kuru ağırlıkları, K1 konusunun ardından ikinci sırada yer alırken, tüm konular K0 ile kıyaslandığında % 5,76 – 13,76 arasında değişen oranlarda kuru ağırlıkta artışa sebep olmuşlardır. K1 ve B5/2 hariç tüm konuların kök yaş ağırlıkları K0 konusunun gerisinde kalmıştır. Ç1/7 konusunun kök kuru ağırlığı K1 konusunun önüne geçerken, K0 konusu ile kıyaslandığında kök kuru ağırlığında % 7'lik bir artış meydana getirmiştir. Bitki fosfor içerikleri % 0,076 – 0,239 değişmekle birlikte Ç1/7 konusu K1 konusunun ardından ikinci sırada yer almış ve K0 konusuna kıyasla % 197,37'lik bir artışa sebep olmuştur. Toprakta alınabilir fosfor miktarında KO, P5/1 ve H8/2 konuları, K1'in ardından ikinci sırada yer almıştır. G3/7, A6/2, B5/2, BP2/3 ve Ç1/7 konularının topraktaki alınabilir fosfor miktarları K0'a göre % 34,81 – 61,62 (Şekil 4.24) arasında değişen oranlarda azalmıştır. Bu sonuç bize bakteri uygulamalarının, topraktaki mevcut fosforun bitki tarafından alınabilirliğini artırdığını göstermektedir.

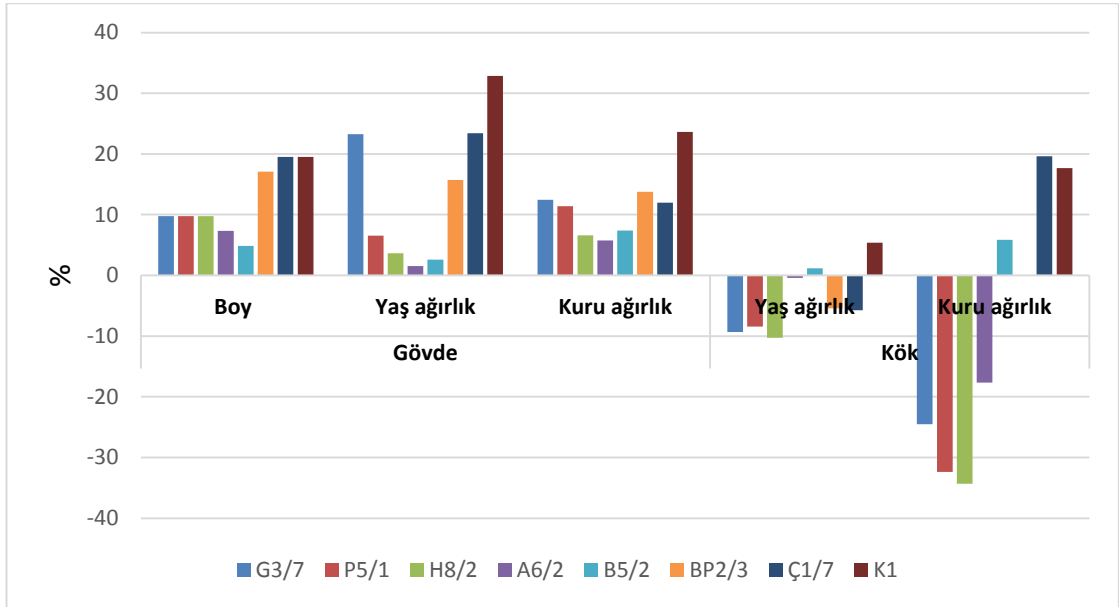
Çakmakçı vd. (2007); azot fikseri (*Bacillus licheniformis* RC02, *Rhodobacter capsulatus* RC04, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06, ve *Bacillus* OSU-142) ve fosfat çözücü (*Bacillus megaterium* RC01, *Bacillus* M-13) bakterilerle tohum aşılmasının sera koşullarında arpa gelişimine etkisini araştırmışlardır. Denemeye alınan bakterilerden altısının indol asetik asit (IAA) ürettiği, üçünün fosfatı çözebildiği, bütün izolatlarının azot bağladığı ve arpa gelişimini arttırdığını belirlemişlerdir. toprakta alınabilir P miktarını *Bacillus* M-13 ve *B. megaterium* RC01 aşılması önemli ölçüde artırırken, toprakta en yüksek NO₃ -N miktarı *Bacillus* OSU-142 aşılmasıyla elde edilmiş ve bunu *P. polymyxa* RC05 ve *R. capsulatus* RC04 takip etmiştir. Bakteri uygulamaları, arpa kök ağırlığını %18-32, gövde ağırlığını ise % 29- 54 oranında artırmıştır. Azot bağlayıcı bakteri aşılmaları arpada N, Fe, Mn ve Zn alımını önemli düzeyde artırmıştır. *Bacillus* OSU-142, RC07 ve M-13 gibi etkin *Bacillus* türlerinin ve *P. polymyxa* RC05, *P. putida* RC06 ve *R. capsulatus* RC04 izolatlarının tarımda biyogübre olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.13 Fosfor sera denemesi sonucu elde edilen veriler

Konular	Gövde			Kök		Bitki	Toprak
	Boy (cm)	Yaş Ağırlık (g/saksı)	Kuru Ağırlık (g/saksı)	Yaş Ağırlık (g/saksı)	Kuru Ağırlık (g/saksı)	Fosfor (%)	Alınabilir Fosfor (kg/da)
G3/7	45±1 b	18,49 ±0,8 b	9,56±0,2 bc	8,38±0,1bc	0,77±0,1 c	0,168±0,007 b	1,286±0,17 cd
P5/1	45±1 b	15,98±0,4 c	9,47±0,5 bc	8,46±0,3 bc	0,69±0,13 c	0,145±0,008 cd	2,137±0,28 b
H8/2	45±1 b	15,55±0,1 c	9,06±0,1 bcd	8,29±0,1c	0,67±0,2 c	0,095±0,001 e	2,057±0,14 b
A6/2	44±0,6 bc	15,23±0,7 c	8,99±0,1 cd	9,20±0,3 abc	0,84±0,1 bc	0,176±0,008 b	1,053±0,08 cd
B5/2	43±1 bc	15,39±1 c	9,13±0,1 bc	9,35±0,6 ab	1,08±0,2 ab	0,138±0,005 cd	0,820±0,08 d
BP2/3	48±1,5 a	17,36±1 b	9,67±0,2 b	8,74±0,1 abc	1,02±0,1 ab	0,160±0,016 bc	1,393±0,28 c
Ç1/7	49±1 a	18,51±0,6 b	9,52±0,5 bc	8,71±0,4 abc	1,22±0,2 a	0,226±0,021 a	1,303±0,12 c
K1	49±1 a	19,93±1 a	10,51±0,3 a	9,71±0,5 a	1,20±0,1 a	0,239±0,002 a	3,506±0,55 a
K0	41±0,6 c	15,00±0,6 c	8,50±0,4 d	9,24±0,4 abc	1,02±0,1 ab	0,076 ± 0,003 f	2,137±0,41 b



Şekil 4.24 Bakteri uygulamalarının K0'a kıyasla fosfor miktarlarında meydana getirdikleri % değişim



Şekil 4.25 Bakteri uygulamalarının K0'a kıyasla verim parametrelerinde meydana getirdikleri % değişim

Şahin vd. (2010); iki ayrı bitkinin rizosfer topraklarından izole ettikleri ve azotsuz besi ortamında gelişme durumlarına göre azot fiksasyon kapasiteleri, NBRIP besi ortamında gelişme durumlarına göre fosfat çözme kapasiteleri belirlenen on bir farklı bakteri suşunun sera şartlarında arpa gelişimi üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Deneme grupları olarak kontrol (bakteri ve mineral gübre uygulanmamış), *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Arthrobacter agilis*, *Brevibacillus choshinensis*, *Arthrobacter viscosus*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter aurescens*, *Micrococcus luteus* ve mineral NP seçilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, arpa bitki uzunluğunun *Arthrobacter viscosus* ve *Arthrobacter agilis*, gövde yaş ağırlığının ise *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter agilis*, *Arthrobacter viscosus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus* aşılama ve mineral gübre uygulamalarıyla önemli miktarda artış gösterdiği saptanmıştır. Mineral gübre uygulamasına kıyasla bitki uzunluğu *Ar. viscosus*, *Ar. agilis* ve *B. megaterium*, gövde ağırlığı ise *B. megaterium*, *Ar. agilis* ve *Ar. viscosus* aşılama ve mineral gübre uygulamalarında yüksek olmakla birlikte, ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel bakımdan önemli bulunmamıştır. Gövde kuru ağırlığı bakımından ise en iyi sonuçlar, *B. megaterium* (0,62 g/bitki) ve *Ar. agilis* (0,61 g/bitki) bakterilerinden elde edilmiştir. Bu özellik bakımından çalışmada kullanılan kontrol grubuna kıyasla, gübre uygulaması ve bakteri ırkları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Çalışma sonucunda; *B. megaterium*, *Ar. agilis*, *Ar. viscosus*, *Pb. polymyxa*, *B. pumilus* ve *Ar. aurescens* gibi etkin izolatların, organik ve sürdürülebilir tarımda biyolojik gübre olarak kullanılabilmesi önerilmiştir.

Majeed vd. (2015); in vitro koşullarda 7'sinin İAA ürettiğini, 7'sinin azot fikse ettiğini, 4'ünün fosfatı çözebildiğini tespit ettikleri toplam 9 bakterinin buğday gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bakterilerin 2 tanesi *Bacillus* sp., 2 tanesi *Stenotrophomonas* spp., 1 tanesi *Acetobacter pasteurianus* olarak tanımlanmıştır. Aynı ayrı uygulanan bakterilerin gövde ve kök uzunluğunda meydana getirdiği artış kontrol ile kıyaslandığında sırasıyla % 25-45 ve % 29-52 olmuştur. Bu artış gövde ve kök biyokütlesinde ise, sırasıyla % 2-62 ve % 100-172 arasında artışa yol açmıştır. Bakteri aşılması aynı zamanda kök ve gövdede azot içeriğinin de önemli derecede artışa sebep olmuştur.

Kumar (2016); *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter chlorophenolicus* ve *Enterobacter sp.* Suşlarının tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının buğdayın gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürüttükleri sera denemesinde, bakterilerin ikili (*Arthrobacter chlorophenolicus* ve *Enterobacter sp.*) ve üçlü formülasyonlarının bitki boyunda bakteri uygulanmamış kontrole göre sırasıyla % 14 ve % 17,5'lük artış meydana getirdiğini belirlemiştir. *Bacillus megaterium* ve *Enterobacter sp.*'nin tek başına uygulanmaları ise, bitki boyunda yaklaşık % 12 artışa sebep olmuştur. Bitki ağırlığı kontrol ile kıyaslandığında en yüksek artışı % 78'lik oran ile üçlü karışım sağlarken, bunu % 51,4 ile *Bacillus megaterium*'un tekli uygulaması izlemiştir. Bitkilerin azot ve fosfor içerikleri kontrol ile kıyaslandığında tüm uygulamalar artışa sebep olmuştur. En etkili uygulamalar sırasıyla % 178 ve % 154,8 'lik artışla bakterilerin üçlü karışımı olmuştur. Bu uygulamayı ikili karışım izlemiş ve ardından *Bacillus megaterium*'un tekli uygulaması gelmiştir.

Valetti vd. (2018) yürüttükleri araştırmada; kolza bitkisi rizosferinden izole ettikleri fosfor çözücü bakterileri tanımlamayı ve bitki büyümesi üzerine etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. İzole ettikleri 40 farklı bakterinin 14'ünün fosforu çözebildiğini ve sera denemesi verilerine göre izolatların 7'sinde bitki kuru ağırlığı sonuçlarının, gübrelili kontrol ile çok yakın olduğunu tanımlamışlardır. Sera denemesinde olumlu sonuç alınan *Arthrobacter*, *Panteo*, 3 adet *Serratia* ve 4 adet *Bacillus* cinsine dahil suş tarla şartlarında denemiş ve *Bacillus sp.* LTAD-52 haricindeki diğer suşların kolza verimini % 21-44 oranında arttırdıklarını belirlemişlerdir.

Bakterilerin fosfor çözme kapasitelerinin sera koşullarında test ettiğimiz denemelerde elde ettiğimiz sonuçlar da; tüm bakteri uygulamalarının, literatürlerde elde edilen sonuçlara paralel olarak, gübresiz konunun önüne geçtiğini göstermiştir. Ç1/7 (*Pseudomonas sp.*) konusu optimum gübrelili K1 konusuna en yakın sonuçları vermiş ve bu konuyu BP2/3 (*Pseudomonas brassicacearum*) konusu takip etmiştir. Ç1/7 konusu in vitro şartlarda diğer izolatlarla kıyasla daha düşük fosfor çözme yeteneğine (42 µg/mL) sahip olmasına rağmen, sera şartlarında diğer bakterilerin önüne geçmiştir. Bu sonucun Ç1/7 suşunun sera denemesine alınan bakteriler arasında indol asetik asit üretim miktarı (41,02 µg/mL) en yüksek olan izolat olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deepa vd. (2010); bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özellikleri arasında oksin üretiminin en temel araç olduğunu belirtmiştir. Çakmakçı vd. (2007); BBTE'lerin bitki büyümesini arttırıcı etkisinin sadece N₂ fiksasyonu ve / veya P çözünme yetenekleri ile değil, aynı zamanda hormon benzeri sekonder metabolitlerin üretilmesi ile açıklanabileceğini belirtmiştir.

H8/2 (*Paenibacillus polymyxa*) suşunun azot fikse etme yeteneğinin buğday gelişimi üzerine etkisini araştırdığımız denemede, bakteri uygulaması gövde yaş ağırlığı hariç diğer tüm parametrelerde K0 konusunun önüne geçmesine rağmen, elde edilen sonuçlar fosfor denemesinde elde edilen farkın gerisinde kalmıştır. *Rhizobium*, *Azotobacter* ve *Azospirillum* gibi diazotrafik bakterilerin bitkilerde meydana getirdikleri büyüme artışının, azot fiksasyon yeteneklerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Ancak, kapsamlı araştırma çabalarına rağmen, sadece rizobiaların azot fiksasyonundan dolayı verimi arttırdığı gösterilmiştir. Diğer bakterilerin meydana getirdiği büyümedeki artış, hormon üretimi gibi başka mekanizmaların sonucu olabileceği düşünülmektedir (Arshad ve Frankenberger 1993; Glick 1995). Bu literatür verileri, çalışmamızda *Paenibacillus polymyxa* H8/2 suşunun azot fikse etme yeteneğinin buğday gelişimi üzerine etkisini açıklar niteliktedir.

5. SONUÇ

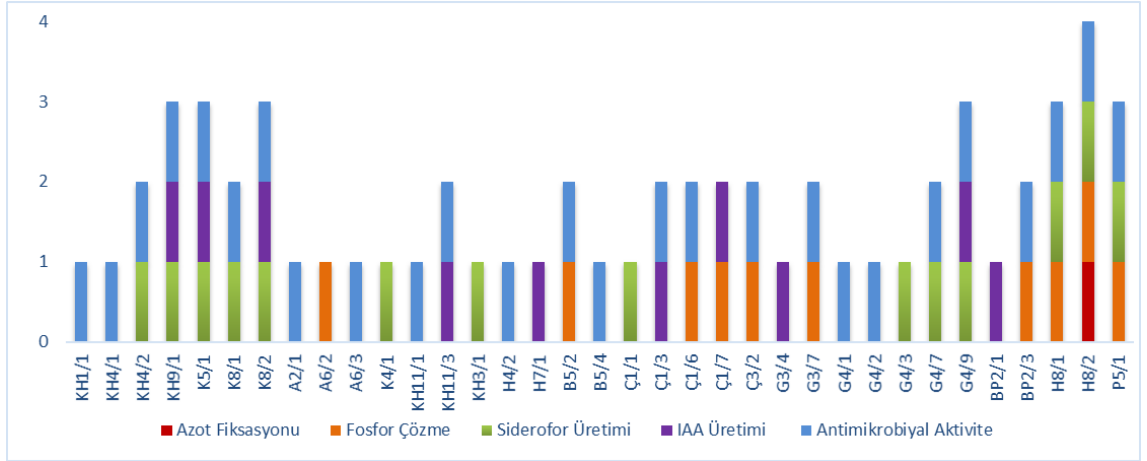
Günümüzde mikrobiyal içerikli gübreler, pestisitler ve çeşitli formülasyonlar ürün verimliliğini artıran ve sürdürülebilir tarımsal ekosistemlere katkıda bulunan önemli tarımsal bileşenler arasında sayılmaktadır. Genel olarak, faydalı toprak bakterileri, doğrudan ve dolaylı mekanizmalar olarak sınıflandırılan birçok biyokimyasal yolla bitki büyümesine katkı sağlayabilirler. Bu mekanizmalar arasında; bitki besin elementlerinin bitkiler tarafından alınımını arttırmak, patojenik mikroorganizmaların gelişimini engellemek ve bitkisel hormonların salımını arttırmak, en önemlileri olarak sıralanmaktadır.

İklim, hava koşulları, toprak özellikleri ve toprağın yerli mikrobiyal florasının bileşimi ya da etkinliği; mikrobiyal inokulantların performansını, çoğalmalarını, bitki üzerindeki etkilerini önemli derecede sınırlayan faktörlerdir (Gupta vd. 2015). Bu nedenle istenen ürün verimini ve olumlu etkiyi elde etmek için, bölgeye özgü mikrobiyal türlerin araştırılması ve kullanım olanaklarının belirlenmesi, büyük önem taşımaktadır. Bu araştırmada Ankara ili topraklarından izole edilen ve tanımlanan yerel suşlarla çalışılması, bitki büyümesini teşvik edici birçok mekanizmanın farklı yöntemlerle araştırılması açısından bir ilk niteliğindedir.

Çalışmamızda Ankara ilinin farklı noktalarından izole edilen ve bitki büyümesini teşvik edici özellikleri incelenen 70 bakterinin 16s rDNA sonuçlarına göre 11 farklı cinse dahil olduğu ve bu izolatların ARDRA analizine göre 17 gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu bakterilerin tümü incelenen en az bir özellik bakımından (azot fiksasyonu, fosfor ve potasyum çözme, indol asetik asit ve siderofor üretimi, antimikrobiyal aktivite) çeşitli seviyelerde pozitif sonuç vermiştir. Ancak *nifH* gen varlığı, 40 ppm üzerinde fosfor ve potasyum çözme, siderofor üretimi için CAS agarda 10 mm üzerinde zon oluşturabilme, 20 ppm'in üzerinde İAA üretebilme ve patojenlere karşı oluşturdukları % 50'nin üzerindeki inhibisyon miktarları/oranları göz önüne alındığında, 70 bakteriden 33 tanesinin en az bir özelliğe sahip olduğu kesin kanıtlarla belirlenmiştir (Şekil 5.1).

Tarımda Kullanılan Organik, Mineral ve Mikrobiyal Kaynaklı Gübrelere Dair Yönetmelikte mikrobiyal gübrenin tanımı ‘Bitki gelişimi için gerekli maddelerin sağlanmasında, bitki besin maddelerinin yararlılığının artırılmasında ve/veya toprağın düzeltilmesinde rol oynayan canlı mikroorganizmaları içeren ürünler’ olarak yapılmıştır. Bu kapsamda değerlendirdiğimizde elde ettiğimiz bakterilerin % 37’sinin mikrobiyal gübre üretiminde kullanım potansiyelinin olduğu görülmektedir. *Paenibacillus polymyxa* H8/2; azot fiksasyon yeteneğinin *nifH* gen varlığının tespiti de dahil farklı testler kullanılarak ispatlanmasının yanısıra, fosfor çözme, indol asetik asit ve siderofor üretme özellikleri ile de mikrobiyal gübre üretiminde kullanım olanağı olarak ön plana çıkan bir bakteridir. Diğer yandan; *Pseudomonas azotoformans* A6/2, *Pseudomonas fluorescens* B5/2, *Pseudomonas brassicacearum* BP2/3, *Pseudomonas sp.* G3/7 fosfor çözme yetenekleri ile; *Pseudomonas sp.* Ç1/7 fosfor çözmenin yanısıra indol asetik asit üretimi ile, *Bacillus mojavensis* P5/1 ise fosfor çözmenin yanısıra, siderofor üretme yetenekleri ve sera denemesinde verdikleri olumlu sonuçlar ile mikrobiyal gübre üretiminde kullanılabilinecek aday bakteriler olarak tanımlanmışlardır. Mikroorganizmaların; bitkilere besin elementi sağlamalarına ilave olarak, siderofor ve indol asetik asit üretmeleri de gübre olarak kullanılabilmelerine olanak sağlamaktadır. İndol asetik asit üretimi açısından *Arthrobacter scleramae* G3/4 ve *Pseudomonas sp.* Ç1/ suşları, siderofor üretimi ile de *Arthrobacter humicola* H6/1 ve *Pseudomonas gessardii* K8/1 suşları bu anlamda önem taşımaktadır.

Çalışmamızda mikrobiyal gübre olarak kullanım olanakları tespit edilen suşların yanında, antagonistik aktiviteleri de (antifungal ve antibakteriyal) tanımlanan *Pseudomonas sp.* KH1/1-KH4/1-KH4/2-KH11/1-B5/4-G4/1-G3/7-G4/7, *Pseudomonas fluorescens* KH9/1-K5/1-B5/2, *Pseudomonas gessardii* K8/1, *Stenotrophomonas sp.* A2/1, *Pseudomonas azotoformans* A6/3-K8/2-KH11/3, *Variovorax paradoxus* H4/2, *Pseudomonas brassicacearum* Ç1/3-G4/7, *Enterobacter sp.* Ç1/6-Ç3/2, *Olivabacter soli* G4/2, *Pseudomonas lini* G4/9 suşlarının biyopestisit olarak yüksek kullanım potansiyeline sahip oldukları in vitro çalışmalarla ortaya konmuştur. Öncelikle bitki denemeleri ile bu etkilerinin doğrulanmasının ardından, mevzuatın gerektirdiği çalışmalar yapılarak bu izolatların biyopestisit üretiminde kullanıma sunulmaları mümkündür.



Şekil 5.1 Çalışmada kullanılan bakterilerin BBTE özellikleri

Farklı bitki büyümesini teşvik edici özelliğe sahip birkaç suşu içeren mikroorganizma konsorsiyumlarının geliştirilmesinin; bitki büyümesini, verimi ve sağlıklı agroekosistemleri teşvik edeceği aşikardır (Malusa vd. 2012). Bu nedenle yapılacak ileriki çalışmaların; farklı BBTE özelliklere sahip bakteriler ile oluşturulacak kombinasyonlarla ve çeşitli bitkilerle devam ettirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalarda sıfır kimyasal gübre dozunun yanısıra, azaltılmış gübre dozları ile yürütülecek deneme desenlerinin kullanımı, daha detaylı ve önemli sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. Çalışmamız tüm bu araştırmalara esas teşkil eden verilerin elde edildiği öncü bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

- Abeles, F. B., Morgan, P. W., Saltveit ,Jr M. E. 1992. Ethylene in Plant Biology, Academic Press, New York, NY, USA.
- Adnan, M., Shah, Z., Fahad, S., Arif, M., Alam, M., Khan, I.A., Mian, I.A., Basir, A., Ullah, H., Arshad, M., vd., 2017. Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. Nature Sci. Rep., 7, 16131.
- Ahemad, M., Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting Rhizobacteria. Current perspective Journal of King Saud University – Science, 26, 1–20.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk J Biol., 29, 29–34.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research, 163, 173—181.
- Akhgar, R., Arzanlou, M., Bakker, P.A.H.M., Hamidpour, M. 2014. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-containing *Pseudomonas* sp. in the rhizosphere of salt-stressed canola. Pedosphere 24, 161–468.
- Alori, E. T., Glick, B. R., Babalola, O. O. 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Frontiers in Microbiology, 8, 971.
- Anonim. 2008. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Sebze Hastalıkları, Cilt 3, Ankara.
- Anonim. 2019. Web Sitesi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri>, Erişim Tarihi: 15.09.2019
- Antoun, H., Kloepper, J.W. 2001. Plant growth promoting rhizobacteria in Encyclopedia of Genetics, eds S Brenner, JH, Miller, 1477-1480. New York, USA.
- Arshad, M., Frankenberger, Jr. W.T., 1993. Microbial production of plant growth regulators. In: Blaine, F., Metting, Jr. (Eds.), Soil Microbial Ecology. Marcel and Dekker, Inc., New York, 307–347.

- Aysan, Y. ve Çınar, Ö. 2002. Tohum kökenli *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı antagonistlerin etkisi. Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri Kitabı. 4-7 Eylül 2002, Erzurum. 409-416.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., van Loon, L. C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 97, 2, 239–243.
- Barea, J.M., Navarro, E., Montoya, E. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate solubilizing bacteria. *J Appl Bacteriol.*, 40,129–134.
- Barre, P., Montagnier, C., Chenu, C., Abbadie, L., Velde, B. 2008. Clay minerals as a soil potassium reservoir: observation and quantification through X-ray diffraction. *Plant Soil.*, 302, 213–220.
- Beech, I. B., M. Paiva, M. Caus and C. Coutinho. 2001. Enzymatic activity and within biofilms of sulphate-reducing bacteria. In: P. G. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran and J. Walker (eds.), *Biofilm Community Interactions: chance or necessity?* BioLine, 231- 239. Cardiff, UK.
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethid, B. K., Dutta, S. K., 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15, 169–178.
- Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I. 2005. Cadmium tolerant plant growth promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard . *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (2), 241-250.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P.B., Vargas, L.K., Lisboa, B. B., Favretoa, R., Baldani, J. I., Passaglia, L.M.P. 2013. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology.*, 63, 94–104.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology.*, 39, 311-320.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., Hallmann, A. 2002. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol.*, 51, 215–29.

- Beringer, J.E., Hirsch, P.R. 1984. Genetic engineering and nitrogen fixation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.*, 1, 65-88.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., Tuteja, N. 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial. Cell Fact.*, 13 (66), 1–10.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 1327–1350.
- Bishop, P.E., Jorgerger, R.D. 1990. Genetics and molecular biology of an alternative nitrogen fixation system. *Plant Mol. Biol.*, 41, 109–125.
- Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R. and Moschetti, G. 2002. 16S 23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garrivus*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence. *Analysis System Appl. Microbiol.*, 25, 520-527.
- Blumer, C., ve Haas, D. 2000. Mechanisms, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173, 170-177.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Alves, B. J.R., Reis, V. 2003. Endo- phytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil.*, 252, 139–149.
- Boos, W., Eppler, T. 2001. Prokaryotic Binding Protein-Dependent ABC Transporters, in *Microbial Transport Systems*, ed. G. Winkelmann, Wiley-VCH, Weinheim, 77-114.
- Bottomley, P. J., Maggard, S.P. 1990. Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol.*, 56, 533–540.
- Braun, V., and Hantke, K. 2011. Recent insights into iron import by bacteria. *Curr Opin Chem Biol.*, 15, 328–334.
- Bremner, J.M. 1965. Chemical and microbiological properties, *Methods of soil analysis*. Ed. C.A. Black (eds), Amer. Soc. of Agron. Inc. Pub. Agron. Series. No: 9, Madison, Wisconsin, USA.
- Brimecombe, M.J., De Leij, F.A., Lynch, J.M. 2000. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- Budi, S.W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil borne pathogenic bacteria. *Appl Soil Ecol.*, 15, 191–199.

- Burris, R.H., Wilson, P.W. 1972. Methods for Measurement of Nitrogen Fixation.. In Colowick, S.P., Kaplan, N.O. Methods in Enzymology. Academic, 355-367, New York.
- Castric, P. 1994. Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. Curr. Microbiol., 29, 19-21.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. Applied And Environmental Microbiology, 1720–1726.
- Christensen, W.B. 1946. Urea decomposition as means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J. Bact., 52, 461-466.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biol Biochem., 37, 1970–1974.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak J., Clément, C., Ait Barka, E. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71, 9, 4951–4959.
- Cornelis, P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. Appl Microbiol Biotechnol., 86, 1637–1645.
- Crosa, J. H. ve Walsh, C.T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol Mol. Biol. Rev., 66, 223-249.
- Crowley, D. 2006. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Çağlar, K.Ö. 1949. Toprak Bilgisi. A.Ü. Zir. Fak. Yayını. No.10. Ankara.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Erdoğan Ü. 2007. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Barley Seedling Growth, Nutrient Uptake, Some Soil Properties, and Bacterial Counts. Turk J Agric For., 31, 189-199.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant Soil., 245, 35–47.
- Davidson, A. L. Nikaido, H. 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from Escherichia coli. J. Biol.Chem., 266, 8946-8951.

- Davies, P.J. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. Davies PJ (ed) Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology, 2nd edn. Kluwer, Dordrecht, 1–12.
- Dean, D.R., Jacobson, M.R., 1992. Biochemical genetics of nitrogenase. In: Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J. (Eds.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York, 763–834.
- Deepa, C.K., Dastager, S.G., Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. World J. Microbiol. Biotechnol., 26, 1233–1240.
- Deng, Y., Lu, Z., Lu, F., Zhang, C., Wang, Y., Zhao, H., Bi, X. 2011. Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. J. Microbiol. Meth., 85, 175–182.
- Diels, L., Van Der Lelie, N., Bastiaens, L. 2002. New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 1 (1), 75-82.
- Dinesh, R., Anandaraja, M., Kumar, A., Binia, Y. K., Subilaa, K. P., Aravin, R. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. Microbiological Research, 173, 34–43.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., Chen, S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. Journal of Applied Microbiology, 99, 1271–1281.
- Dixon, R. ve Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nature Reviews Microbiology, 2, 621-631.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit Rev Plant Sci., 22, 107-149.
- Dutta, S., Podile, A.R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Critical review in Microbiology, 36(3), 232-244.
- Edwards, U., Rogall, H., Blocker, M., Emde, and E. C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res., 17, 7843-7853.
- Elmerich, C. 1984. Azotobacter and Azospirillum genetics and molecular biology, In: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation, Subba Rao, N.S. (eds), Cambridge University Press, 315-347, New York.

- Esashi, Y. 1991. Ethylene and seed germination. Matoo AK, Suttle JC (eds) The plant hormone ethylene. CRC Boca Raton, 133–157.
- Farajzadeh, D., Yakhchali, B., Aliasgharzag, N., Sokhandan-Bashir, N., Farajzadeh, M. 2012. Plant growth promoting characterization of indigenous *Azotobacteria* isolated from soils in Iran. *Curr Microbio.*, 64,397-403.
- Fisher, K. ve Newton, W.E. 2002. Nitrogen fixation, In:Nitrogen Fixation at the Millennium, Leigh, G.J. (eds), Elsevier,1-27, The Netherlands.
- Frankenberger, W.T.J., Arshad, M. 1995. Photohormones in soil: microbial production and function. Dekker, 503, New York.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology.* 176, 6, 421–426.
- Fukushima, T., Allred, B.E., Sia, A.K., Nichiporuk, R., Andersen, U.N., Raymond, K.N. 2013. Grampositive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc Natl Acad Sci.*, 110, 13821–13826.
- George, F., Edwin, F., Hall, M. A., Klerk, D., Jan, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd Edition, Springer, 227-281.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can J Microbiol.*, 41, 109–114.
- Glick, B. R., Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15, 2, 353–378.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., Penrose D. M. 1999. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, Imperial College Press, London, UK.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of teoretical Biology*, 190, 1, 63–68.
- Glick, B.R. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica.
- Goldstein, A.H., 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 12, 185–193.

- Gordon, S. A., Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant physiology*, 26, 1, 192.
- Gosal, S. K., Saroa, G. S., Vikal, Y., Cameotra, S.S., Pathania, N., Bhanot, A. 2011. Isolation and molecular characterisation of diazotrophic growth-promoting bacteria from wheat rhizospheric soils of Punjab. *Soil Research*, 49, 725–732.
- Graham, P.H. 1988. *Principles and Application of Soil Microbiology*. 40, 322-345.
- Gray, E.J., Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem.*, 37, 395–412.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 369–378.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microbiol. Biochem.*, 7, 96–102.
- Haas, D. ve Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat.Rev. Microbiol.*, 3, 307-319.
- Haghighi, B.J., Alizadeh, O., Firoozabadi, A.H. 2011. The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. *Advances in Environmental Biology*, 5 (10), 3079-3083.
- Handelsman, J., Stab, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant C.*, 8, 1855–1869.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.*, 60, 4, 579–598.
- Hernlem, B.J., Vane, L.M., Sayles, G.D. 1999. The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities. *Water Res.*, 33, 951–960.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B. ve Boddey, R. M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311, 1–18.
- Hiden, R.C., Kang, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product reports*, 27(5), 637-657.
- Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

- Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, T., Hossain Md. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Front. Microbiol.*, 6 (1360), 1–12.
- Jackson, M.B. 1991. Ethylene in root growth and development. In: Matoo AK, Suttle JC (eds) *The plant hormone ethylene*. CRC Boca Raton, 159–181.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempler, C., Jung, G., Berg, G., Bahl, H. 1996. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot.*, 49 (11), 1101–4.
- James, E.K., Olivares, F.L. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77-119.
- Jetiyanon, K. ve Kloepper, J.W. 2002. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control.*, 24, 285–291.
- Ji, S.H., Gururani, M.A., Chun, S.C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol Res.*, 169, 83–98.
- Jin, F., Ding, Y., Ding, W., Reddy, M.S., Dilantha Fernando, W.G., Du B. 2011. Genetic Diversity and Phylogeny of Antagonistic Bacteria against *Phytophthora nicotianae* Isolated from Tobacco Rhizosphere. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 3055-3071.
- Joe, M. M., Deivaraj, S., Bensonb, A., Henry, A.J. Narendrakumar, G. 2018. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 305-308.
- Jorquera, M.A., Hernandez, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M.L. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44,1025-1034.
- Joshi, P., Bhatt, A.B. 2011. Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan region. *Int. J. Environ. Sci.*, 1, 1135-1143.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthelemy, J.P. 2009. Insights into the defenselated events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbol. Interact.*, 22, 456-468.
- Kacar, B. ve İnal, A. 2008. *Bitki Analizleri*. Nobel Yayın No: 1241, Fen Bilimleri: 63, ISBN 978-605-395-036-3. Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Ankara.

- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch Microbiol., 187, 351.
- Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Brantley, S.L., Barnes, A.S., Pantano, C.G. 2000. X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. Geochim Cosmochim Acta., 64, 1331–1343.
- Kandel, S.L., Firrincieli, A., Joubert, P.M., Okubara, P.A., Leston, N.D., McGeorge, K.M., Mugnozza, G.S., Harfouche, A., Kim, S.H., Doty, S.L. 2017. An in vitro study of biocontrol and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. Front Microbiol., 8,386.
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., Chang, S. C. 2010. Use of plant growthpromoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. Plant Biotechnol., 4, 179-183.
- Kang, S., Joo, G.J., Hamayun, M. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotech. Lett., 31, 277-281.
- Kapulnik, Y., Okon, Y., Kigel, J., Nur, I., Henis, Y. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). Plant Physiol., 68 (2), 340-343.
- Kennedy, C. ve Bishop, P. 2004. Genetics of nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species *Azotobacter* : History and current status, Klipp, In:Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria, W., Masepohl, B., Gallon, J. R., Newton, W. E. (eds), Kluwer Academic, 27-53, The Netherlands.
- Khalid, A., Akhtar, M.J., Mahmood, M.H., Arshad, M. 2006. Effect of substrate dependent microbial ethylene production on plant growth. Microbiology, 75, 231-236.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F., Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsia J BioSci., 4, 23–32.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J Trace Elem Med Biol., 18,355–364.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. 2007. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. Agronomy for sustainable development, 27, 29-43.
- Kızılkaya, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering, 33, 150–156.

- Kiss, T., Farkas, E. 1998. Metal-binding ability of desferrioxamine B. J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem., 32, 385–403.
- Klee, H.J., Hayford, M.B., Kretzmer, K.A., Barry, G.F., Kishore, G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell, 3, 1187–1193.
- Kloepper, J. W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Y. Okon, (Ed.), Azospirillum/Plant Associations. CRC Press, Boca Raton, FL, 111-118, USA.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286 (5776), 883-885.
- Kobayashi, D.Y., Reedy, R.M., Bick, J.A., Oudemans, P.V. 2002. Characterization of chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Appl Environ Microbiol., 68(3),1047–1054.
- Kosegarten, H., Grolig, F., Esch, A., Glüsenkamp, K.H., Mengel, K. 1999. Effects of NH_4^+ , NO_3^- and HCO_3^- on apoplast pH in the outer cortex of root zones of maize, as measured by the fluorescence ratio of fluorescein boronic acid. Planta, 209, 444–452.
- Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E., Eken, C. 2011. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. Biological Control, 59 (3), 390.
- Kraemer, S.M. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquat Sci., 66, 3–18.
- Kraulis P. J. 1991. MOLSCRIPT—a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 24, 946–950.
- Krewulak, K.D., Vogel, H.J. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. Biochim Biophys Acta, 1778, 1781–1804.
- Kumar, A. 2016. Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. Int. J. Adv. Res., 4 (4), 116–124.
- Lal, S., Tabacchioni, S. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. Indian J. Microbiol., 49, 2–10.
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., Kim, J.C. 2017 Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. Plant Pathol J., 33, 499–507.

- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur J Plant Pathol.*, 101,655-664.
- Lemanceau, P., Albouvette, V. 1993. Suppression of Fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: mechanism and applications. *Biocontrol Sci Technol.*, 3, 219–234.
- Li, H.B., Singh, R. K., Singh, P., Song, Q., Xing, Y., Yang, L., Li, Y. 2017. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1268.
- Loper, J.E., Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophore enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 5357- 5363.
- Lu, D., Ma, Z., Xu, X., Yu, X. 2016. Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*. *J Basic Microbiol.*, 56, 929–933.
- Lugtenberg, B. ve Kamilova, F. 2009. Plant-growthpromoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 63, 541-556.
- Lynch, J.M. 1990. The rhizosphere. Wiley-Interscience, Chichester. 458.
- Mac Millan, J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.*, 20, 387-442.
- Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, H.A., Dar, S.A. 2010. Biofertilizers in organic agriculture. *J. Phytol.*, 2, 42-54.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran A., Rahim. N. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front. Microbiol.*, 6, 198.
- Maksimov, I.V., Abizgil'dina, R.R., Pusenkova, L.I. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 47, 333-345.
- Malik, D. K. ve Sindhu, S. S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas sp.* effect of coinoculation with *Mesorhizobium sp.* Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol Mol Biol Plants*, 17(1), 25–32.
- Malusa, E., Sas-Paszt, L., Ciesielska, J. 2012. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 491206, 12.

- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T.J., Cleyet-Marel, J. C., and Touraine, B. (2006). Nitrate dependent control of root architecture and N nutrition altered by a plant growth promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*, 223, 591–603.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., Mengel, K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils*, 30, 433 - 439.
- Mathiyazhagan, S., Kavitha, K., Nakkeerans, S., Chandrasekar, M.K., Renukadevi, P., Krishnamoorthy, A.S., Fernando, W.G.D. 2004. PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. *Archives Phytopathol Plant Prot.*, 37, 183–199.
- Matzanke, B.F. 1991. Structures, coordination chemistry and functions of microbial iron chelates. In *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates*. Winkelmann, G. (ed.). Boca Raton, FL 15–64, USA.
- Mehta, S., Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Curr Microbiol.*, 43(1), 51-60.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332, 1097-1100.
- Mengel, K. 1995. Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soils. *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Abadia, J. (ed.). Dordrecht, 389–397. The Netherlands.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P., Colón-Carmona, A. 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.*, 60, 1729–1742.
- Mohammad, R., Sarikhani, B., Oustan, K. S. 2016. Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in vitro conditions, *Geomicrobiology Journal*, 33 (9), 832-838.
- Mori, S. 1999. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol.*, 2, 250-253.
- Mukhtar, S., Shahid, I., Mehnaz, S., Malik, K.A. 2017. Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological Research*, 205, 107–117.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann E, Oberson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling*. *Soil biology*, 26. Springer, 251–244, Heidelberg.

- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
- Neilands, J.B., 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual review of Nutrition*, 1, 27-46.
- Neubauter, U., Furrer, G., Kayser, A., Schulin, R. 2000. Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation*, 2, 353–368.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. *USDA Circular No.939*. Washington DC. onion plants caused by improved phosphate nutrition. *Planta* 154, 407-413.
- Özdal, M., Ozdal, O. G., Sezen, A., Algur, O. F., Kurbanoglu, E. B. 2017. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *3. Biotech.* 7, 23.
- Pal, D.K., Srivastava, P., Durge, S.L., Bhattacharyya, T. 2001. Role of weathering of fine-grained micas in potassium management of Indian soils. *Appl Clay Sci.*, 20, 39–52.
- Palmer, K.M., Young, J.P.W. 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2445–2450.
- Parks, E.J., Olson, G.J., Brinckman, F.E., Baldi, F. 1990. Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 5, 183–189.
- Parmar, K.B., Mehta, B.P., Kunt, M.D. 2016. Isolation, characterization and identification of potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil of maize (*Zea mays*). *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(5), 3030 – 3037.
- Parmar, P., Sindhu, S.S., 2013. Potassium solubilisation by Rhizosphere Bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *J. Microbial. Res.*, 3, 25–31.
- Pastor, N.A., Reynoso, M.M., Tonelli, M.L., Masciarelli, O., Rosas, S.B., Rovera, M. 2010. Potential biological control *Pseudomonas sp. pci2* against damping-off of tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Pathology*, 92 (3), 737-745.

- Pathania, N., Gosal, S. K., Saroa, G. S., Vikal, Y. 2014. Molecular characterization of diazotrophic bacteria isolated from rhizosphere of wheat cropping system from central plain region of Punjab. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 862-871.
- Patten, C., Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 42, 207–220.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M., Yarzabal, L. A., 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2905–2914.
- Poly, F., Monrozier, L. J., Bally, R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.*, 152, 95–103.
- Pospíšilová, J., 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol. Plantarum*, 46, 491-506.
- Prajapati, K.B., Modi, H.A. 2012. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria from ceramic industry soil. *CIBTech. J Microbiol.*, 1, 8–14.
- Prathap, M., Ranjitha, K.B.D. 2015. A Critical review on plant growth promoting rhizobacteria. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 6 (4), 1-4.
- Premachandra, D., Hudek, L., Brau, L. 2016. Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. *Journal of Biotechnology & Biomaterials Biotechnol Biomater.*, 6, 3.
- Priyanka, A.T., Kotasthane, A.S., Kosharia, A., Kushwah, R., Zaidi, N.W., Singh, U.S. 2017. Crop specific plant growth promoting effects of ACCd enzyme and siderophore producing and cynogenic fluorescent *Pseudomonas*. *3 Biotech.*, 7(1), 27.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.*, 28, 142–149.
- Rees, D.C., Tezcan, F.A., Haynes, C.A., Walton, M.Y., Andrade, S., Einsle, O., Howard, J.B. 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 363, 971-984.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R., Basse, C.W. 2008. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol.*, 9(3), 339–355.

- Renella, G., Egamberdiyeva, D., Landi, L., Mench, M., Nannipieri, P. 2006. Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biol Biochem.*, 38, 702–708.
- Richards, L.A. 1954. Diagnosis and improvements salina and alkali soils. *U.S. Dep. Agr. Handbook*, 60.
- Richardson, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Management of the soil biota in sustainable farming systems*. CSIRO Publishing, Melbourne. 50–62.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant. Physiol.*, 156 (3), 989-96.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins, Evolution, Ecology and Application. *Annual Review Microbiology*, 7, 129-133.
- Rodriguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.*, 17, 319–339.
- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287, 15–21.
- Rubio, L.M., Ludden, P.W. 2002. The gene products of nif regulon, Nitrogen Fixation at the Millennium. Leigh, G.J. (eds), Elsevier, 101-130, The Netherlands.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Sagoe, C.I., Ando, T., Kouno, K., Nagaoka, T. 1998. Effects of organic acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nut.*, 43, 1067-1072.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 635-648.
- Santoro, M.V., Bogino, P.C., Nocelli, N., Cappellari, Ld.R., Giordano, W.F., Banchio, E. 2016. Analysis of Plant Growth-Promoting Effects of Fluorescent *Pseudomonas* Strains Isolated from *Mentha piperita* Rhizosphere and Effects of Their Volatile Organic Compounds on Essential Oil Composition. *Front. Microbiol.*, 7,1085.
- Schenk, P.M., Carvalhais, L.C., Kazan, K. 2012. Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol.*, 30, 177–184.

- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 323-341.
- Schoenborn, L., Yates, P. S., Grinton, B. E., Hugenholtz, P., Janssen, P. H. 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7, 4363–4366.
- Schwyn, B, Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.*, 160, 47-56.
- Sezen, A., Ozdal, M., Koc, K., Algur, O. F. 2016. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Effects on Improving Growth of Wheat. *Journal of Applied Biological Sciences*, 10 (1), 41-46.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*, 2, 1-14.
- Shen, H., He, X., Liu, Y., Chen, Y., Tang, J., Guo, T. 2016. A complex inoculant of N₂-fixing, P- and K-solubilizing bacteria from a purple soil improves the growth of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) plantlets. *Frontiers in Microbiology*, 7, 841.
- Sigel, A. Sigel, G. 1998. Iron transport and storage in microorganisms, plants, and animals, metal ions in biological systems. 35, Marcel Dekker, Basel.
- Silva, H.S.A., de Silva, R.R., Macagnan, D., de Almeda Halfeld-Viera, B., Pereira, M.C.B., Mounter, A. 2004. Rhizobacterial Induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase in enzyme activities. *Biol Control.*, 29, 288–295.
- Singh, B., Goulding, K.W.T. 1997. Changes with time in the potassium content and phyllosilicates in the soil of the Broad balk continuous wheat experiment at Rothamsted. *Eur J Soil Sci.*, 48, 651–659.
- Singh, R.P., Jha, P.N. 2015. Molecular identification and characterization of rhizospheric bacteria for plant growth promoting ability. *Int. J. Curr. Biotechnol.*, 3, 12–18.
- Solanki, M. K., Wang, Z., Wang, F.-Y., Li, C.-N., Lan, T.-J., Singh, R. K. 2017. Intercropping in sugarcane cultivation influenced the soil properties and enhanced the diversity of vital diazotrophic bacteria. *Sugar Tech.*, 19,136–147.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. 1994. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume Rhizobium Technology*. Springer, New York.

- Somer, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30, 205-240.
- Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R., Passaglia, L.M.P. 2013. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil.*, 366, 585-603.
- Souza, R., Meyer, J., Schoenfeld, R., Costa, P. B., Passaglia, L. M. P. 2015. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Annals of Microbiology*, 65, 951–964.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3, 4.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 425–448.
- Sparks, D.L. 1987. Potassium dynamics in soils. *Advances in Soil Science*, 6, 1-63.
- Spencer, D., James, E.K., Ellis, G.J., Shaw, J.E., Sprent, J.I. 1994. Interactions between Rhizobia and potato tissue. *J Exp Bot.*, 45, 1475–1482.
- Subba Rao, N. S. 1977. *Soil Microorganisms and Plant Growth*, Oxford & IBH Publishing Co., , 254-255, New Delhi.
- Sylvia, D.M., Fuhrman, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology, 259-321.
- Şahin, E., Karagöz, K., Çakmakçı, R., Tosun, M. 2010. Azot fiksasyonu ve fosfat çözücü bitki gelişimini teşvik edici bakteri aşılamalarının arpa gelişimine etkisi. *Türkiye IV. Organik Tarım Sempozyumu*
- Tchakounté, G. V. T., Berger, B., Patz, S., Fankem, H., Ruppel, S. 2018. Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*, 214, 47–59.
- Treikale, O., Priekule, I., Javoisha, B., Lazareva, L. 2010. Fusarium Head Blight: Distribution in Wheat in Latvia. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 75, 627–634.
- Tripathi, A.K., Nagarajan, T., Verma, S.C., Rudulier, D.L. 2002. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. *Curr. Microbiol.*, 44, 363–367.
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S. 2008. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiol Res.*, 163,329–336.

- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.V., Cherdyntseva, T.A. ve Netruson, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulants and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.*, 177 (5), 1414-1417.
- Ulloa-Ogaz, A.L., Munoz-Castellanos, L.N., Nevarez-Moorillon, G.V. 2015. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control, the battle against microbial pathogens. *Basic Science, Technological advance and educational programs*, 1, 305–309.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, R., Giller, K. 2008. *Measuring Plant-Associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. 258.
- Upadhyay, S., Kumar, N., Singh, V.K., Singh, A. 2015. Isolation, characterization and morphological study of *Azotobacter* isolates. *Journal of Applied and natural Science*, 7(2), 984-990.
- Upadhyay, S.K., Singh, D.P., Saikia, R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr Microbiol.*
- Uzunoglu, S. 1992. Toprak bünyesi ve analiz metodları. TGAE Yayın no:184.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moeñne-Loccoz, Y., Muller, D. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4 (356), 1-19.
- Valetta, L., Iriarte, L., Fabra, A. 2018. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 132, 1-10.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36, 453–83.
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K.S., Saxena, A. K., Suman, A. 2017. *Potassium-Solubilizing Microbes: 7 Diversity, Distribution, and Role in Plant Growth Promotion*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. D.G. Panpatte et al. (eds.), *Microorganisms for Green Revolution*.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.*, 132, 44–51.

- Weselowsk, B., Nathoo, N., Eastman, A.W., Macdonald, J., Yuan, Z.C. 2016. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *Bmc Microbiol.*, 16, 244.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69,99-151.
- Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocol of Molecular Biology*, 2, 2.
- Xiaoa, Y., Wanga, X., Chena, W., Huang, Q., 2017. Isolation and Identification of Three Potassium-Solubilizing Bacteria from Rape Rhizospheric Soil and Their Effects on Ryegrass. *Geomicrobiology Journal.*, 34 (10), 873–880.
- Xing, Y. X., Wei, C.-Y., Mo, Y., Yang, L.-T., Huang, S.-L., and Li, Y.-R., 2016. Nitrogen-fixing and plant growth-promoting ability of two endophytic bacterial strains isolated from sugarcane stalks. *Sugar Tech.*, 18, 373–379.
- Yadav, K. S., Dadarwal, K.R. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*. Sci Publ, Jodhpur., 293-308.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol.*, 35, 155–189.
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms in *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G., Burris R. H., Evans H. J. (eds), 43-86, New York.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv Agron.*, 81, 96–168.
- Zahir, Z. A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., Asghar, H. N. 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch. Microbiol.*, 191, 415-424.
- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., Oves, M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 56, 263–284.
- Zarjani, J.K., Aliasgharad, N., Oustan, S., Emadi, M., Ahmadi, A., 2013. Isolation and characterization of potassium-solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Arch Agron Soil Sci.* 59, 1713–1723.

- Zehr, J., Mellon, M., Braun, S., Litaker, W., Steppe, T., Paerl, H. 1995. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2527-2532.
- Zhang, F., Li, X., Zhu, S., Ojaghian, M. R., Zhang J. 2018. Biocontrol potential of *Paenibacillus polymyxa* against *Verticillium dahliae* infecting cotton plants. *Biological Control*, 127, 70–77.
- Zhang, Y., Li, D., Wang, H., Xiao, Q., Liu, X., 2006. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan plateau, China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260, 134–142.
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 9, 92486.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Doğum Yeri : Giresun

Doğum Tarihi : 01.02.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi (1991-1998)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1998-2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Alan Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı(2002-2003)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2009-2011)

Çalıştığı Kurumlar

Tarım ve Orman Bakanlığı Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 2005-2008

Tarım ve Orman Bakanlığı Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü 2008-

Yayınlar

Ozdogan D.K., Akcelik N., Aslim B., Suludere Z. and Akcelik M., PROBIOTIC AND Antioxiidative Properties Of L. Lactis LI27 Isolated From Milk, Biotechnology & Biotechnological Equipment; 2012, 26-1;2750-2758

Dilek KAYA ÖZDOĞAN, NEFİSE AKKOÇ, PINAR ŞANLIBABA, MUSTAFA AKÇELİK. Characterisation of probiotic and antioxidative properties of nisin A producer L. lactis LL27 strain.,2011,ECCMID-ICC,1.

Devam Eden Projeler

Bazı Organik Materyallerin Humik ve Fulvik asit İçeriklerinin Spektroskopik Olarak Tanımlanması ve Uygun Analiz Yöntemlerinin Belirlenmesi – TAGEM Yardımcı Araştırmacı devam

Topraklarda Doğal Olarak Bulunan Mikorizaların İzolasyonu ve Monokültür Üretimi – TAGEM Yardımcı Araştırmacı devam

ACC Deaminaz Enzimini Üreten Rizosfer bakterilerini Kullanarak buğdayda Kuraklık Toleransının Artırılması – TAGEM Yardımcı Araştırmacı devam

Ege Bölgesi Rhizobium Bakteri Suşlarının Toplanması Değerlendirilmesi ve Seleksiyonu – TAGEM Yardımcı Araştırmacı devam

Tamamlanan Projeler

Ankara İlinden İzole Edilen Rizobakterlerin Bitki Büyümesini Teşvik Edici Özelliklerinin Araştırılması – TAGEM Proje Lideri

Doku Organ Kültürü Kullanılarak İn Vitro şartlarda Arbusküler Mikorizalardan monokültür üretimi TAGEM Yardımcı Araştırmacı 2011-2016

Kavak Türleri ile Topraktaki Bor Kirliliğinin Biyoarıtımı ve Bitkideki Bor Toleransının Genetik Temelinin Araştırılması TUBİTAK 3501 Yardımcı Araştırmacı 2014-2016