



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BİTKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN
RİZOBAKTERİLER (PGPR) İÇİN FORMÜLASYON
GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Sevgi İŞLEK

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİTKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN
RİZOBAKTERİLER (PGPR) İÇİN FORMÜLASYON
GELİŞTİRİLMESİ**

Sevgi İŞLEK

Danışman: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler(PGPR) İçin Formülasyon Geliştirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18/02/2022

İmzası

Sevgi İŞLEK

ÖZET**BİTKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN RİZOBAKTERİLER (PGPR) İÇİN
FORMÜLASYON GELİŞTİRİLMESİ**

İŞLEK, Sevgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Şubat 2022, 96 sayfa

Dünyada nüfus artışına bağlı olarak artan gıda ihtiyacı ile tarımsal sistemlerin sürdürülebilirliği önemli bir küresel konu haline gelmiştir. Kimyasal gübre ve türevlerinin aşırı kullanımının toprak, çevre ve insan üzerindeki zararlı etkilerine karşı yeni nesil gübre kategorisinde yer alan mikrobiyal gübreler ön plana çıkmıştır. Bu sebeple kullanılacak suşlara özgün sıvı formülasyonlar geliştirilme ihtiyacı duyulmaktadır. Sıvı formülasyonlar oluşturmak için kullanılan hücre koruyucuları, adjuvanları ve yüzey aktif maddelerini içeren katkı maddeleri sayesinde mikrobiyal hücrelere koruyucu bir ortam sağlanarak PGPR inokulantların raf ömürleri uzatılmaktadır.

Çalışmada PGPR özelliklerine sahip *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarının sıvı formülasyonunda kullanılacak hücre koruyucuların optimum miktarları yanıt yüzeyi yöntemi (RSM) ile belirlenmiştir. Daha sonra *B. subtilis* EGE-B-36.5 ve *P. chlororaphis* 39-d suşları için belirlenen optimum hücre koruyucuları ile adjuvan olarak ksantan zamkı ve yüzey aktif maddesi olarak Tween 20 kullanılarak sıvı formülasyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan sıvı formülasyonlar 25 °C ve 4 °C’de steril amber şişeler içerisinde saklanmış ve aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile toplam canlı hücre sayılarındaki değişim altı ay boyunca takip edilmiştir.

Sonuç olarak *P. chlororaphis* suşu için 4 °C’de PVP, ksantan zamkı ve Tween 20’nin kullanıldığı; 25 °C ise PVP, PEG, gliserol, ksantan zamkı ve Tween 20’nin

optimum miktarlarda kullanıldığı sıvı formülasyonlarda altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayılarında değişim istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur. *B. subtilis* suşu için ise her iki sıcaklık değerinde PEG, gliserol, ksantan zankı ve Tween 20'nin kullanıldığı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayılarında değişim istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur.

B. subtilis suşu için oluşturulan asidik formülasyonlarda kültür ortamının pH'ları çeşitli organik asitler ile farklı pH'lara ayarlanmış ve toplam canlı hücre sayıları on iki ay boyunca takip edilmiştir. Asetik asit ile pH ayarlaması yapılan sıvı formülasyonda on ikinci ay verilerine göre toplam canlı hücre sayısındaki değişim istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, PGPR inokülant formülasyon, RSM

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF FORMULATION FOR PLANT GROWTH
PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR)**

ISLEK, Sevgi

MSc in Bioengineering.

Supervisor: Prof. Dr. Rengin ELTEM

February 2022, 96 pages

Sustainability of agricultural systems has become an important global issue with the increasing need for food due to population growth in the world. Against the harmful effects of excessive use of chemical fertilizers and their kinds on soil, environment and people, the demand for microbial fertilizers, which are in the category of new generation fertilizers, has increased. For this reason, there is a need to develop liquid formulations specific to the strains to be used. Thanks to the additives containing cell protectants, adjuvants and surfactants used to create liquid formulations, the shelf life of PGPR inoculants is extended by providing a protective environment for microbial cells.

In this study, the response surface method (RSM) was used to find the optimum amounts of cell protectants to be used to prepare liquid formulations for *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 and *Pseudomonas chlororaphis* 39-d strains. As a result of the data obtained from the RSM results, the cell protectants that can be used to create liquid formulations for both strains and the optimum amounts of these cell protectants were determined. Then, liquid formulations were created for *B. subtilis* and *P. chlororaphis* strains by using the most ideal cell protectants, xantham gum as adjuvant and Tween 20 as surfactant.

As a result, the change in total viable cell counts in liquid formulations of *P. chlororaphis* strain containing PVP, xantham gum and Tween 20 at +4 °C and PVP,

PEG, glycerol, xanthan gum and Tween 20 at 25°C was statistically significant ($p < 0.05$). The change in total viable cell counts in liquid formulations of *B. subtilis* strain containing PEG, glycerol, xanthan gum and Tween 20 at both temperatures was statistically significant ($p < 0.05$).

In acidic formulations created for *B. subtilis* strain, the pH of the culture medium was adjusted to different pH with various organic acids and the total viable cell counts were followed for twelve months. The change in total viable cell count was statistically significant ($p < 0.05$) according to the data of the twelfth month in the liquid formulation pH adjusted with acetic acid.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, formulation of PGPR inoculation, RSM

ÖNSÖZ

Son yıllarda dünya nüfusundaki artışa bağlı olarak tarımda yüksek verim elde etmek amacıyla kimyasal gübre ve türevlerindeki tüketim miktarı ciddi boyutlara ulaşmıştır. Bu durum toprak mikrobiyotasının bozulması gibi toprak sağlığı üzerinde ciddi boyutlarda zararlı etkiye neden olmaktadır. Dünya genelinde bu problemin önüne geçmek için mikrobiyal gübrelere yönelim artmıştır.

Biyoinokulantların ticarileştirilmesindeki en büyük engellerden birtanesi kullanılacak suşa uygun formülasyon geliştirilememesidir. Biyoinokülatların performansının istenilen seviyede olması için toprağa inoküle edilmiş bakteriler yerli mikrobiyotaya karşı rekabet edebilmeli ve toprak mikrobiyotasında hayatta kalmalıdır. Bu nedenle biyoinokülanlar için formülasyon aşamasında katkı maddeleri kullanılarak daha uygun bir mikroortam sağlanmalıdır.

Bu tez çalışması kapsamında, PGPR özelliklerine sahip yerli *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşları için ayrı ayrı optimize edilen özgün sıvı formülasyon içerikleri ile etkinliği ve raf ömrü yüksek özgün mikrobiyal gübre preparatları geliştirilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Sevgi İŞLEK

İZMİR

18/02/2022

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Toprak Sağlığı.....	4
2.2 Kimyasal Gübreler ve Kimyasal Gübrelerin Zararları.....	5
2.3 Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler.....	6
2.3.1 PGPR olarak <i>Bacillus</i> türleri.....	8
2.3.2 PGPR olarak <i>Pseudomonas</i> Türleri.....	10

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.4 Biyoinokülan Formülasyonları.....	12
2.5 Biyoinokülan Formülasyonu Çeşitleri.....	15
2.5.1 Katı inokülan formülasyonları.....	15
2.5.2 Sıvı inokülan formülasyonları.....	17
2.6 Taşıyıcı Bazlı İnokülanlarla İlgili Karşılaşılan Sorunlar.....	18
2.7 Mikrobiyal Gübre Pazarı.....	19
2.7.1 Dünyada mikrobiyal gübre pazarı.....	19
2.7.2 Türkiye’de mikrobiyal gübre pazarı.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1 Gereç	22
3.1.1 Çalışmada kullanılan bakteri izolatları.....	22
3.1.2 Çalışmada kullanılan besin ortamları, çözeltiler ve kimyasallar.....	22
3.1.3 Kullanılan cihazlar	30
3.2 Yöntem.....	32
3.2.1 Bakteri kültürlerinin aktivasyonu ve saflık kontrolü	32

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.2 PGPR özellik gösteren <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 ve <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşlarından biyokütle üretimi.....	32
3.2.3 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyonların hazırlanması.....	34
3.2.4 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşu ile sıvı formülasyonların hazırlanması.....	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1 PGPR Özellik Gösteren <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 ve <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d Suşlarından Biyokütle Üretimi.....	39
4.1.1 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşunun biyokütle üretimi.....	39
4.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun biyokütle üretimi.....	39
4.2 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 Suşu ile Sıvı Formülasyonların Hazırlanması.....	41
4.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi.....	43
4.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşu ile hücre koruyucuların varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi.....	47

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.2.3 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun asidik pH'larda sıvı formülasyonu.....	58
4.3 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d Suşu ile Sıvı Formülasyonların Hazırlanması.....	66
4.3.1 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi.....	66
4.3.2 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d Suşu ile hücre koruyucuların varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi.....	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
EK AÇIKLAMALAR.....	86
KAYNAKLAR DİZİNİ	87
TEŞEKKÜR	94
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşu ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtların logaritmik değerleri	44
4.2 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun biyokütle üretimindeki canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.....	45
4.3 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun onuncu ayda elde edilen canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.....	46
4.4 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 formülasyonlarının +25°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml).....	50
4.5 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 formülasyonlarının +4°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)	52
4.6 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun çeşitli organik asitler ile formülasyon ön deneme sonuçlarının sütun grafiği.....	63
4.7 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşu ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtların logaritmik değerleri.....	68
4.8 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşunun biyokütle üretimindeki canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşunun dokuzuncu ayda elde edilen canlı hücre sayıları üzerine ait ANOVA değerleri.....	70
4.10 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d formülasyonlarının +25°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml).....	74
4.11 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d formülasyonlarının +4°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml).....	76
5.1 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyon hazırlamak için üretim ortamına katılması gerekli olan optimum hücre koruyucu miktarları.....	84
5.2 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d suşu ile sıvı formülasyon hazırlamak için üretim ortamına katılması gerekli olan optimum hücre koruyucu miktarları.....	85

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Saksı, sera ve tarla denemelerinde uygulama yöntemleri ve hastalık azaltma seviyesi ile birlikte zararlı bakterilere, funguslara, böceklere ve nematodlara karşı etkili PGPR suşları.....	7
2.2 Fitohormon üreticisi olarak etkili PGPR türleri.....	8
2.3 Tarımda <i>Bacillus</i> içeren bazı biyoinokülan t formülasyonlarının ticari kullanımına ilişkin örnekler.....	9
2.4 <i>Pseudomonas</i> suşları tarafından sentezlenen tarafından antimikrobiyal metabolitler, enzimler ve hormonlar.....	11
2.5 Piyasada ticari olarak mevcut olan seçilmiş PGPR bazlı biyoformülasyonun ayrıntılı taslağı.....	13
2.6 Katı formülasyon ile hazırlanan bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR).....	16
2.7 Sıvı Formülasyon ile bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR).....	17
2.8 Katı ve sıvı biyoinokülan tların karşılaştırılması.....	19
3.1 Çalışmada kullanılan izolatlar ve kodları.....	22
4.1 <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 suşunun farklı kültür ortamlarında toplam canlı hücre sayıları.....	40

TABLolar DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 formülasyonlarının +25 °C’de aylık canlı hücre sayıları (kob/ml)	49
4.3 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5 formülasyonlarının +4 °C’de aylık canlı hücre sayıları (kob/ml)	51
4.4 Çeşitli çalışmalarda <i>Bacillus</i> suşları ile hazırlanan sıvı formülasyonların saklama koşulları ve raf ömrü	55
4.5 Farklı asitler ile hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri.....	60
4.6 Farklı asitler ile hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık pH değişimleri.....	61
4.7 Farklı asitler ile hazırlanan formülasyonların üçüncü aylarındaki toplam canlı sayılarının (kob/ml) karşılaştırılması	62
4.8 Asetik asit kullanılarak hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri.....	64
4.9 Asetik asit kullanılarak hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık pH değişimleri.....	65

TABLolar DİZİNİ (devam)TabloSayfa

4.10 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d formülasyonlarının +25 °C’de aylık canlı hücre sayıları (kob/ml)	73
4.11 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d formülasyonlarının +4 °C’de aylık canlı hücre sayıları (kob/ml)	75
4.12 Çeşitli çalışmalarda <i>Pseudomonas</i> suşları ile hazırlanan sıvı formülasyonların saklama koşulları ve raf ömrü	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
pH	Hidrojenin gücü
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
rpm	Devir sayısı/dakika
kob	Koloni oluşturan birim
mL	Mililitre
mM	Milimolar
g	gram

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PGPR	Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler
PVP	Polivinil pirolidon
PEG	Polietilen glikol

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
CMC	karboksimetil selüloz
ACC	1- aminosiyasilopropan-1-karboksilat
CCD	Merkezi kompozit tasarım (Central composite design)
RSM	Yanıt yüzeyi yöntemi (Response Surface Methodology)
IAA	Indol-3-asetik asit
ANOVA	Varyans Analizi

1. GİRİŞ

Küresel nüfus artışının ciddi boyutlara ulaşması gıdaya olan talebi arttırmaktadır. Bu nedenle çiftçiler, sınırlı arazi kaynakları nedeniyle maksimum ürün verimi elde etmek için çok miktarda kimyasal gübre ve türevlerini kullanmaktadır. Bu gübreler kimyasal olarak sentezlenmiş, azot, fosfor ve potasyumdan oluşan endüstriyel maddeler oldukları için fazla kullanımları doğrudan veya dolaylı olarak toprak, hava ve su kirliliğine neden olmaktadır (Singh et al.,2019). Çok fazla kimyasal gübre kullanarak daha fazla verim alabileceğini düşünen çiftçiler, aslında büyük bir yanlışın ortasında kalmaktadır. Kısa vadede yarar sağlayabilen kimyasal gübrelerin toprakta meydana getirdiği hasarlar, ileri dönemlerde üretimde verimsizliğe ve kalitesiz ürünler oluşmasına neden olmaktadır (Türk Gübre, 2021). Kimyasal gübre ve türevlerinin sürekli ve aşırı kullanımı, rizosferde veya uygulanan alanda bulunan bakteri, fungus, siyanobakteri ve protozoan gibi doğal mikroflorayı olumsuz yönde etkilemekte ve doğal ekosistemde dengesizliğe neden olmaktadır (Singh et al.,2019).

Dünya genelinde; mevcut negatif tablonun ileride karşımıza çıkaracağı daha büyük problemlerden kaçınmak ve insanın en temel gereksinimi olan beslenme ihtiyacının devamlılığını sağlamak için tarımsal üretimde çevreye ve insan sağlığına zararı olmayan, bitkinin ihtiyacı olan elementleri sağlayan ve kimyasal gübrelerle yarışabilecek en yenilikçi çözüm mikrobiyal gübrelerdir. Bitki ile ilişkili bazı rizobakteriler bitkinin büyümesini ve verimini arttırmakta aynı zamanda çeşitli yollarla bitkilere fizyolojik avantajlar sağlamaktadır. Bu bakteriler doğrudan ya da dolaylı olarak bitki büyümesini teşvik ettiği için bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (Plant Growth Promotion Rhizobacteria, PGPR) olarak adlandırılmaktadır. Doğrudan mekanizmalar, fosfat çözünürlüğü, azot fiksasyonu, siderofor ve fitohormonların üretimi gibi çeşitli süreçleri içerirken, dolaylı mekanizmalar arasında 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit deaminaz enzimi (ACCD) üretimi, antibiyotik ve fungus hücre duvarını parçalayan litik enzimlerin üretimi, indüklenmiş sistemik direnç (ISR) vb. bulunmaktadır. Mikrobiyal gübreler, bitki ve toprağın verimliliğini ve üretkenliğini artırmak için PGPR inokulantlarının muhafaza edildiği gübreler şeklinde tanımlanmaktadır. Mikrobiyal gübre olarak PGPR'nin tarımsal ürün verimini artırmada güvenli ve etkili bir yöntem olduğu

kanıtlanmıştır. Son yıllarda *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, vb. gibi çok sayıda PGPR inokülanları mikrobiyal gübre olarak kullanılmaktadır (Singh et al.,2019).

PGPR inokülanlar, kullanımını kolay ve ekonomik bir taşıyıcı malzeme ile hazırlanan bir veya daha fazla faydalı bakteri suşu içeren formülasyonlar olarak tanımlanmaktadır. PGPR inokülanlarının genellikle yüksek sıcaklık gibi zor koşullara maruz kaldığında inokülanların yüksek sayılarda hayatta kalabilmesi için iyi formüle edilmiş bir ortamda bulunmaları gerekmektedir. Aynı zamanda doğru hazırlanmış bir formülasyon, bitkilere inokülasyondan sonra maksimum yararları sağlamak için suşların toprakta kalıcılığını artırmak ve etkinliklerini en üst düzeye çıkarmak için en uygun koşulları sağlamalıdır (Herrmann and Lesueur, 2013).

PGPR inokülanlarının üretimi sırasında göz önünde bulundurulması gereken bazı önemli noktalar, kullanılacak olan suşların seçimi, uygun taşıyıcıların belirlenmesi ve optimum bir formülasyon oluşturulması şeklinde sıralanmaktadır. Kullanılacak olan bakteri suşları topraktaki yerli suşlarla rekabet etme yeteneğine sahip olmalı, hedef ürünler üzerinde istenilen etkiyi yaratabilmeli, kullanılan diğer tarımsal kimyasaldan minimum derecede etkilenmeli ve üretim sırasında çeşitli teknolojik süreçlerin üstesinden gelerek fonksiyonel özelliklerini koruyabilmelidirler. PGPR inokülanları için formülasyonlar oluştururken kullanılacak suşlara daha uzun raf ömrü sağlayabilecek özgün formülasyonlar oluşturulmalıdır. Formülasyon oluşturulurken kullanılacak olan katkı maddeleri sayesinde suşların depolanması sırasında zor çevresel koşullara karşı hayatta kalabilmeleri sağlanmaktadır (Herrmann and Lesueur, 2013).

Bu tez çalışması kapsamında, yerel gen kaynaklarından izole edilmiş ve PGPR özellikleri belirlenmiş ticari potansiyele sahip yerli ve özgün *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarının her biri için en uygun sıvı formülasyon geliştirip uzun raf ömrüne sahip yerli ve milli bir ürün üretilmesi

amaçlanmıştır. Çalışmada, çeşitli hücre koruyucular, yüzey aktif maddeler ve adjuvanlar kullanılarak sıvı formülasyonların raf ömürleri için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu tez çalışması ile uzun raf ömrüne sahip mikrobiyal gübre ile sürdürülebilir tarıma katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda uzun raf ömrü sayesinde maliyet açısından ekonomik olacak mikrobiyal gübre formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik önemli bir adım atılmış olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Toprak Sağlığı

Yenilenemeyen bir kaynak olan toprak, kritik işlevleriyle sayısız karasal yaşam formuna ev sahipliği yapmaktadır. Toprak sağlığı, "toprağın, ekosistem ve arazi kullanım sınırları içinde, biyolojik üretkenliği sürdürmek, hava ve su kalitesini yükseltmek ve bitki, hayvan ve insan sağlığını korumak için hayati bir yaşam sistemi olarak işlev görme kapasitesi" olarak tanımlanmaktadır (Sathya et al., 2016). Sürdürülebilir tarım günümüzde en önemli küresel problemlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Geleneksel tarımın aksine sürdürülebilir tarım, değerli kaynakları tüketmeden insanların gıda ihtiyaçlarını karşılayabilen bir üretim sistemine vurgu yapmaktadır (Saffeullah et al., 2021). Sürdürülebilir tarım kapsamında toprak sağlığı, azot (N) fiksasyonu, fosfor (P) çözünürlüğü, toprak yapısının korunması, çevre kirliliğine yol açan maddelerin arındırılması ve bitki patojenlerinin önlenmesi gibi işlevler aracılığıyla ürün verimliliğinin korunması anlamına gelmektedir. Bu fonksiyonların yokluğunda ya da eksikliğinde toprak, mineraller ve kimyasallarla cansız bir varlık olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle toprak sağlığının korunması, sürdürülebilir verimlilik açısından önemli bir konu haline gelmiştir (Sathya et al., 2016).

Mikroorganizmalar karbon, azot, kükürt, fosfor ve diğer mineraller gibi ana besinler üzerinde çeşitli biyokimyasal döngüleri etkileyen canlı toprağın temel ve ayrılmaz bir parçasıdır ve toprağın diğer biyolojik bileşenlerine göre toprak sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda mikroorganizmalar, çeşitlilik indeksi yüksek olan toprakta bulunan en büyük popülasyondur. Mikrobiyal grupların çeşitliliğine göre biyokütelleri ve sayıları farklılık göstermektedir. Genel olarak toprakta; bakteriler $10^8 - 10^9$ (koloni oluşturan birim (kob)/g); aktinomisetler $10^7 - 10^8$ (kob/g); funguslar $10^5 - 10^6$ (kob/g); algler $10^4 - 10^6$ (kob/g); protozoa $10^3 - 10^4$ (kob/g) şeklinde bulunmaktadır. Mikroorganizmalar, toprak kaynaklı patojenleri bastırma ve dolaylı olarak tarımsal üretkenliğe yardımcı olma kapasitesine sahiptirler. Aynı zamanda çeşitli fitohormonlar ve enzimler üreterek, fitopatojenleri ve böcekleri baskılayarak

bitki büyümesini doğrudan ya da dolaylı olarak desteklemektedirler (Sathya et al., 2016).

Rizosfer mikrobiyomu, bitki büyümesi için faydalı mikroorganizmalar, bitki patojeni mikroorganizmalar ve insan patojeni mikroorganizmalar olmak üzere üç tip mikroorganizma grubundan oluşmaktadır. Bitkiler için faydalı olan mikroorganizma grubu azot fikse edici bakteriler, bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) ve mikorizal funguslar gibi çok çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır (Figueiredo et al., 2016).

2.2 Kimyasal Gübreler ve Kimyasal Gübrelerin Zararları

Ürünler hasat edildiğinde toprak besin seviyesi zamanla azalmakta ve azalan bu besinler ya doğal ayrışma süreci ile ya da gübre ilave edilerek yenilenmektedir. Bu nedenle gübre, modern tarımın vazgeçilmez bir bileşenidir (Chandini et al., 2019). Toprakta eksik bulunan veya alınamayacak durumda olan besin elementlerinin kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilmesi sonucu ortaya çıkan gübrelere kimyasal gübreler denir. Kimyasal gübreyi üretirken temel besin elementleri seçilir. Bu durumdan kaynaklı olarak, toprak yapısı düşünülmez (Türk Gübre, 2021). Kimyasal gübreler, dünya nüfusu için gerekli ürün üretimindeki en önemli etken olmasına rağmen aşırı kullanımları nedeniyle hava, su ve toprak kirliliği, toprak mikrobiyotasının bozulması, sera gazı emisyonlarının artması gibi mevcut ve gelecek nesillere ciddi sorunlar yaratmaktadır (Chandini et al., 2019).

Geleneksel tarım sektörü, artan insan nüfusunun beslenme gereksinimlerini karşılamada önemli bir rol oynamış ve bu durum kimyasal gübre ve pestisitlere olan bağımlılığın gün geçtikçe artmasına neden olmuştur. Kimyasal gübrelere ve pestisitlere olan bağımlılığımız, yaşamı tehdit eden ve yalnızca insan tüketimi için tehlikeli olmakla kalmayıp aynı zamanda çevre üzerinde de etkisi olan kimyasal maddeler üreten sektörlerin büyümesini de desteklemiştir (Ramzan et al., 2021). Kimyasal gübreleme yöntemi az gelişmiş toplumlarda yanlış bir algı yaratmaktadır. Çok fazla kimyasal gübre kullanarak daha fazla verim alabileceğini düşünen çiftçiler, aslında büyük bir yanılığın ortasında kalmaktadırlar. Kısa vadede yarar sağlayabilen bu tip kimyasal gübreler, çok kısa zamanda toprakta olumsuz etkilere

sebepler olmaktadır. Bu tip kirletici maddelerin toprakta meydana getirdiği hasarlar, ileriki dönemlerde üretimde düşüklük, kalitesiz ve bozuk ürünler meydana getirecektir. Kimyasal gübreleme sonucunda toprakta tuz miktarı yükselmekte, mikroorganizma faaliyetleri düşmekte, topraktan yeterince verim alınamaz hale gelmektedir. Aşırı ve gereksiz gübreleme sonucunda ilerleyen zamanlarda toprakta erozyon oluşumu meydana gelmektedir. Kimyasal gübreleme yönteminin çevre üzerinde de olumsuz etkileri mevcuttur. Suda bulunan nitrat miktarının yükselmesi, toprak yüzeyinin aşınması, kimyasal gübrelerin sulara karışarak akarsu ve nehirlerde fosfat miktarının yükselmesine neden olması, aşırı kimyasal gübreleme sonucu bitkilerde zararlı maddelerin yoğunlaşması, atmosfere salınan azot oksit gibi gazların yayılması bu olumsuz durumlara örnek olarak verilebilmektedir (Türk Gübre, 2021).

2.3 Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler

Bitki kökleri ile pozitif ilişki içerisinde olan, bitkinin gelişim ve büyümesini olumlu yönde etkileyen bakteriler bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak tanımlanmaktadır (İmriz vd., 2014). PGPR'ler, çeşitli ortamlara yüksek adaptasyon kabiliyetleri, hızlı büyüme oranları ve geniş aralıktaki doğal ve ksenobiyotik bileşikleri metabolize etmeleri nedeniyle toprak ekosistemine yararlı rizobakteriler olarak literatüre geçmiştir (Bhattacharyya and Jha, 2012). PGPR'ler zararlı böceklerin ve bitki patojeni mikroorganizmaların bitkide yol açtığı hasarların azaltılmasında, bitki büyümesinin doğrudan ya da dolaylı olarak kolaylaştırılmasında, topraktaki çözünmez formdaki besinleri harekete geçirerek bitki büyümesinin teşvik edilmesinde ve abiyotik stresin en aza indirgenmesinde aktif olarak rol oynamaktadırlar (Tablo 2.1). Tarımda PGPR'lerin kullanıldığı alanlar mikrobiyal gübre ve biyopestisit başlığı altında toplanmaktadır. Mikrobiyal gübreler, topraktan uygulandığında rizosferdeki etkileşimleri ile toprağın gerekli besinleri almasına yardımcı olan mikroorganizma suşlarını içeren gübreler olarak da tanımlanmaktadır. PGPR'ler, bitki büyümesi için uygun rizosferin yaratılmasında rol oynamakta, kitinaz, lipaz, proteaz vb. gibi belirli enzimleri üretmekte, hücre duvarı hidrolazlarını salgılayarak patojenler için hiper parazitik aktivite sergilemektedir. PGPR'ler bu özellikleri ile biyopestisit olarak kullanılabilir (Butt, 2020).

Tablo 2.1 Saksı, sera ve tarla denemelerinde uygulama yöntemleri ve hastalık azaltma seviyesi ile birlikte zararlı bakterilere, funguslara, böceklere ve nematodlara karşı etkili PGPR suşları (Tabassum et al., 2017).

Tarımsal Ürün	Bitki Patojenleri	PGPR Suşları
Pirinç	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Soya Fasulyesi	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SSR	<i>Bacillus subtilis</i> SB24
Domates	<i>Fusarium</i> sp.	<i>B. subtilis</i> S499
Patates	Patates bakteriyel solgunluğu	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ve <i>B. subtilis</i>
Fıstık	<i>Apergillus niger</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Ayçiçeği	Ayçiçeği nekroz virüsü	<i>B. licheniformis</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptomyces</i>
Pamuk	<i>Verticillium</i> solgunluğu	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> YUPP-1 <i>Paenibacillus polymyxa</i> YUPP8, <i>B. subtilis</i> YUPP-2

Toprağın biyolojik sistemine daha fazla ışık tutmak ve ürün verimliliğini arttırmak için PGPR'lere ilgi giderek artmaktadır. Belirli istenilen özelliklere sahip suşlar seçilmekte, test edilmekte ve daha sonra tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır. Daha fazla sayıda ve daha verimli bakteri suşlarının ortaya çıkması ile PGPR'lerin tarımsal uygulamaları artan bir ivme kazanmıştır. Son yıllarda yoğun olarak yapılan araştırmalar ışığında, PGPR bakterilerinin bitki büyümesini teşvik etmek için kullandıkları mekanizmalar hakkında daha iyi bilgi kaynağı sağlanarak bu suşlara olan ticari ilgi artırmıştır (Tablo 2.2). PGPR'ler birçok farklı türde bakteriyi bünyesinde barındırır da çoğunlukla ticari uygulamalar için geliştirilmiş birçok PGPR *Bacillus* türleri literatüre geçmiştir. Bu ürünler, formülasyon ve raf ömrü boyunca popülasyon stabilitesi sağlayan endospor formunda kullanılmaktadırlar. *Bacillus* türleri arasında, *B. subtilis* suşları,

antibiyotik üretme kapasiteleri ve diğer birçok yararlı özellikleri sayesinde bitkilerde hastalık oluşumunu azaltmaları nedeniyle en yaygın kullanılan PGPR'lardır (Beneduzi and Passaglia, 2011).

Tablo 2.2 Fitohormon üreticisi olarak etkili PGPR türleri (Bhattacharyya and Jha, 2012).

Üretilen Hormon	PGPR türleri	Konakçı
IAA	<i>Aeromonas veronii</i>	Pirinç
IAA	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Baklagiller
IAA	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pirinç
IAA	<i>Azospirillum brasilense</i>	Buğday
Sitokinin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soya Fasulyesi
Sitokinin	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Baklagiller
Giberellin	<i>Bacillus sp.</i>	Kızılağaç

PGPR'ler hücre dışı PGPR (ePGPR) ve hücre içi PGPR (iPGPR) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Hücre dışı PGPR'ler, rizosferde veya kök korteks hücrelerinin boşluklarında bulunmaktadır. *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Serratia* gibi bakteri türleri bu PGPR sınıfına örnek olarak verilebilmektedir. Hücre içi PGPR'ler ise bitki kök hücrelerinin özelleşmiş nodüler yapısının içine yerleşmektedirler. *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Frankia* gibi türler hücre içi PGPR'lere örnek verilebilmektedir (Butt, 2020).

2.3.1 PGPR olarak *Bacillus* türleri

Aerobik, endospor oluşturan *Bacillus* türleri tarım alanlarında kullanıldığında doğrudan veya dolaylı olarak ürün verimliliğine katkıda bulunmaktadır. *Bacillus* türleri gram pozitif hücre duvarına sahip olma, strese dirençli endospor oluşturma, peptid antibiyotikleri salgılama, peptid sinyal molekülleri ve hücre dışı enzimler üretmek gibi birçok fizyolojik özelliklere sahiptirler. Özellikle *Bacillus* türleri sahip

olduğu endospor oluşturma mekanizması sayesinde olumsuz çevresel koşullar altında uzun süre hayatta kalabilirler.

Çoğu *Bacillus* ve *Paenibacillus* türünün bitki büyümesini teşvik ettiği bilinmektedir. Büyüme teşvikinin başlıca mekanizmaları, büyümeyi uyarıcı fitohormonların üretimi, fosfatın çözünürlüğünün sağlanması, siderofor üretimi, antibiyotik üretimi, bitkideki etilen sentezinin inhibisyonu ve patojenlere karşı bitki sistemik direncinin indüklenmesini içermektedir. *Bacillus* ve *Paenibacillus* türlerinin, *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında patojenleri baskılayacak antagonistik aktiviteleri teşvik ettiğine ait birçok çalışma yapılmıştır (Kumar et al., 2011).

Agrobacterium, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Serratia* dahil olmak üzere birçok bakteri genusuna ait türler PGPR olarak kullanılmaktadır. Bu türler arasında *Bacillus* grubunun üyeleri en yaygın olarak çalışılan PGPR türlerinin başında yer almaktadır. Önceki yıllarda genel olarak *Bacillus* genusunda sınıflandırılan ancak daha sonra *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Lysinibacillus* gibi farklı genoslara ayrılan bakterileri içermektedir. Bu bakteriler endospor üretme yetenekleri sayesinde en çok ticarileştirilen PGPR inokülantlardır. Endospor yapıları, yüksek hücre canlılığının korunmasında, depoda tutulan formülasyonlarda raf ömrünün uzaltılmasında ve farklı çevresel koşullar altında suşların iyi performans göstermesinde kritik öneme sahiptir (Akinrinlola et al., 2018).

Tarım alanlarında, bitki sağlığını farklı şekillerde geliştirebilecek çok sayıda *Bacillus* ve *Paenibacillus* türü bulunmaktadır. Bu türlerin büyük bir kısmı besin alımını artırarak ya da enfeksiyondan önce konukçu bitkinin savunma mekanizmalarını uyararak doğrudan bitki büyümesini teşvik etmekte ve çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak iş görmektedir. Büyüme teşvikinin başlıca mekanizmaları, büyümeyi uyarıcı fitohormonların üretimi, fosfatın çözünürlüğünün sağlanması, siderofor üretimi, antibiyotik üretimi, bitkideki etilen sentezinin inhibisyonu ve patojenlere karşı bitki sistemik direncinin indüklenmesini içermektedir. *Bacillus* ve *Paenibacillus* türlerinin, *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında patojenleri baskılayacak antagonistik

aktiviteleri teşvik ettiğine ait birçok çalışma yapılmıştır (Kumar et al., 2011). Spor oluşturma yetenekleri onları teknolojik açıdan verimli biyopestisit ürünleri geliştirmek için ideal bir aday yapmaktadır. *Bacillus* spp.'nin birçok izolatu bitki zararlıları ve patojenlerine karşı biyokontrol ajanları olarak ticarileştirilmiştir (Tablo 2.3) (Kumar et al., 2011).

Tablo 2.3 Tarımda *Bacillus* içeren bazı biyoinokülant formülasyonlarının ticari kullanımına ilişkin örnekler (Borriss, 2011).

Ürün Adı	<i>Bacillus</i> suşları	Bilinen özellikleri
Yield Shield®	<i>Bacillus pumilus</i> GB34 (=INR7)	ABD Çevre Koruma Ajansına (EPA) kayıtlı biyofungisit.
VAULT®	<i>Bacillus subtilis</i> MBI600 + <i>rhizobia</i> suşları	Soya fasulyesi ve yer fıstığında büyümeyi ve gelişmeyi arttırmaktadır.
SERENADE®	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Toprak kaynaklı bitki patojenlerinin önlenmesi, bastırılması ve kontrolü için biyofungisit olarak kullanılmaktadır. Sebze, meyve, kuruyemiş ve asma ürünlerinde kullanılabilir.
POMEX	<i>Bacillus subtilis</i> CMB26	Mikrobiyal fungusit olarak kullanılmaktadır. <i>Cladosporium fulvum</i> ve <i>Botrytis cinerea</i> patojenleri inhibe etmektedir.
SONATA®	<i>Bacillus pumilus</i> QST2808	ABD Çevre Koruma Ajansına kayıtlı biyofungisit.

2.3.2 PGPR olarak *Pseudomonas* türleri

Pseudomonas 'lar, gram negatif, aerobik, mikroskop altında düz veya hafif kavisli bir çubuk şekline sahip, bitki rizosferinde yaygın olarak bulunan bakterilerdir. *Pseudomonas*lar, bitki hastalıklarının biyokontrolünde yer alan bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin en etkin gruplarının başında yer almaktadır (Pathma et al., 2011).

Pseudomonas genusu üyeleri çok basit beslenme gereksinimlerine sahiptirler ve diğer mikroorganizma türleri ile karışık popülasyonlarda rekabet etme özellikleri çok iyidir (Foster 1988). *Pseudomonas* 'ların bitki büyümesi ve verimi üzerindeki faydalı etkileri, kök kolonizasyon potansiyeli, fosfat çözücülüğü, siderofor üretimi, fitohormon üretimi, rizosferde patojen fungusların hücre duvarını bozan enzimlerin üretimi, bitki büyüme düzenleyicilerinin üretimi, bitki besin alımının artırılması, antibiyotik üretimi, patojenik veya zararlı mikroorganizmaların baskılanması ve fitopatojenlere karşı sistemik direncin indüklenmesi gibi yararlı etkileri vardır (Tablo 2.4.).

Tablo 2.4 *Pseudomonas* suşları tarafından sentezlenen antimikrobiyal metabolitler, enzimler ve hormonlar (Pathma et al., 2011).

Antimikrobiyal Metabolit/ Enzim/Hormon	<i>Pseudomonas</i> suşları
1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit deaminaz enzimi (ACCD)	<i>P. putida</i> GR12-2 <i>P. aeruginosa</i> Pw60, Pw61
İndol – 3-asetik asit (IAA)	<i>P. monteilii</i> FPB21
Siderofor Üretimi (piyoverdin)	<i>P. fluorescens</i> 3551 <i>P. fluorescens</i> CHAO <i>P. putida</i> WCS358
Siderofor Üretimi (pyochelin)	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1 <i>P. aeruginosa</i> 7NSK2 <i>P. fluorescens</i> CHAO
Fungus hücre duvarını parçalayan enzim (kitinaz)	<i>P. stutzeri</i> YPL-1
Fungus hücre duvarını parçalayan enzim (beta -1,3 glukanaaz)	<i>P. cepacian</i>
Fungus hücre duvarını parçalayan enzim (piyosiyanaaz)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
Fungus hücre duvarını parçalayan enzim (kitinaz)	<i>P. aeruginosa</i> P10

Biyokontrol mekanizmaları ve bitki büyümesini teşvik edici özellikler sergileyen suşlar, fitopatojenlerin biyolojik kontrolünü sağlamak için de kullanılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde spesifik *Pseudomonas* türleri, sürdürülebilir tarımda biyokontrol ajanları ve biyogübreler olarak kullanılabilirler. *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* ve *P. pyrrocinia* gibi çok sayıda *Pseudomonas* türünün antagonistik özelliklere sahip olduğu literatürde yer almaktadır (Tablo 2.4) (Pathma et al., 2011).

2.4 Biyoinokülan Formülasyonları

PGPR inokülanlar, kullanımını kolay ve ekonomik bir taşıyıcı malzeme ile hazırlanan bir veya daha fazla faydalı bakteri suşu içeren formülasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Yüksek etki potansiyeline sahip büyük ölçekte saf inokülan üretimi için gerekli tekniklerin geliştirilmesi, biyoinokülanların yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamak için ele alınması gereken ana konudur. PGPR inokülan teknolojisindeki kilit noktalar ise, inokülanlar için uygun bir taşıyıcının seçilmesi ve uygun bir formülasyon hazırlanmasıdır (Malusá et al., 2012). Biyokütle üretimi, formülasyonu ve raf ömrünün belirlenmesi bakteri inokülanlarının geliştirilmesi sırasında dikkat edilmesi gereken önemli adımlardır (Lobo et al., 2019).

Mikrobiyal gübre üretimi için gerekli olan hammadde ve ekipman donanımlarının maliyeti, kimyasal gübrelerin üretim maliyetleriyle rekabet edebilecek hale getirilmelidir. Bu maliyet analizi yapılırken, yüksek miktarlarda mikrobiyal biyokütlenin geliştirilmesi için uygun bir kültür ortamının seçimi ve bu ortamın optimum bir şekilde formüle edilmesi değerlendirilmesi gereken konuların başında gelmektedir. Uygun şekilde üretilmiş, formüle edilmiş ve uygulanmış bir biyoinokülan ürünün sağlaması gereken tüm faydaları sağlayacağını garanti edilebilmelidir. Genel olarak birçok özel şirket artan bir talebin olduğu uluslararası pazarda çok çeşitli topraklar için verimli ve etkili biyoinokülanları ticari olarak sunmaktadır. Ancak, bu inokülanlar genellikle düşük kaliteli olmaktadır. Gelişmekte olan veya gelişmiş ülkelerde kullanılan bazı ürünlerde rizosferik mikroorganizmalar bulunmamakta veya bu mikroorganizmalar diğer suşlarla kontamine edilmiş halde bulunmaktadır. Bu durum, biyoinokülanların sahadaki faydalı etkisinde bir tutarsızlığa neden olarak piyasada kötü bir izlenim yaratmaktadır. Bazı inokülanların üretim ve formülasyonlarından kaynaklanan tutarsızlıklar nedeniyle bu inokülanlar sahada uygulama esnasında belirli işlevlerini yerine getiremeyebilmektedir (Lobo et al., 2019).

Biyoinokülanlar, uzun bir raf ömrüne sahip olacak şekilde geliştirilmelidir. İnokülanlarda başlangıçtaki canlı hücre sayısını en üst düzeye çıkarmak, canlı hücre sayısındaki hızlı düşüşü önlemek amacıyla uygulanan bir stratejidir. Fakat, uzun süreli raf ömrünü sağlamak amacıyla saklama koşullarının optimize edilmesi

kaçınılmazdır. Toprakların heterojenliği biyoinokülanlar için büyük bir engel teşkil etmektedir. Toprağa inoküle edilmiş bakteriler, daha iyi uyum sağlamış yerli mikrobiyotaya karşı rekabet edebilmeli ve toprak mikrobiyotasında hayatta kalmalıdır. Bu nedenle biyoinokülanlar için fizikokimyasal koruma ile daha uygun bir mikroortam sağlanmalıdır. Bu şekilde canlı bakteri hücrelerinin sayısında hızlı bir şekilde düşüşün önüne geçilmiş olacaktır. Sonuç olarak inokülan formülasyonlarının amacı, uygun ve mevcut formlarda, depolama sırasında ve uygulama sahasında PGPR'nin daha yüksek hayatta kalmasına izin vermelidir (Lobo et al., 2019). İdeal bir biyoinokülan formülasyonu ürünün uygulama yapılacağı bitkiler üzerinde fitotoksik etkisi olmamalı, olumsuz çevre koşullarına yüksek tolerans gösterebilmeli, maliyeti piyasadaki diğer ürünlerin maliyetine göre daha düşük olmalı ve bitki hastalıklarının kontrolünde güvenilir olmalıdır (Tablo 2.5.) (Nakkeeran et al., 2005).

Tablo 2.5 Piyasada ticari olarak mevcut olan seçilmiş PGPR bazlı biyoformülasyonun ayrıntılı taslağı (Tabassum et al., 2017)

Ticari Ürün Adı	Kullanılan Suş	Ülke	Yararı/Hedef Patojen/Hastalık	Uygulanabilir Ürünler
Bio-Phospho	<i>Bacillus subtilis</i>	Hindistan	Fosfat çözünürlüğü	Buğday, pirinç, pamuk, mısır
Bio Promotor <i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	Hindistan	Azot bağlama	Baklagiller
Bio Fertilizer	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Hindistan	Azot bağlama	Tahıllar, meyve ve sebzeler, diğer bitkiler
Associative Diazotrophs	<i>Rhizobium</i>	Pakistan	Azot	Mısır yoncası, yonca, mercimek
Biozote-MAX	PGPR	Pakistan	Fitohormon üretimi	Bitkiler

Tablo 2.5 (devam).

Bio-save 10LP, 110	<i>Pseudomonas syringae</i>	ABD	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Çekirdekli meyve, Narenciye, Kiraz ve Patates
Subtilex –	<i>Bacillus subtilis</i> MB1600	ABD	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> ve <i>Pythium spp.</i>	Süs bitkileri, sebze bitkileri
Cedomon™	<i>Pseudomonas chloroaphis</i>	İsveç	<i>Fusarium sp.</i> leke hastalıkları ve diğerleri	Tahıl
BioJect Spot – less	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	ABD	<i>Sclerotinia homeocarpa</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Micrhrodochium nivale</i>	Çimler ve diğer bitkiler
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> QWT713	ABD	<i>Leveillula taurica</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporium</i>	Meyve ve sebzeler
AtEze	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28	ABD	<i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Sebzeler ve süs bitkileri
GB 34 Concentrate Biological Fungicide	<i>Bacillus pumilus</i>	ABD	<i>Rhizoctonia</i> ve <i>Fusarium</i>	Soya Fasulyesi
Sonata™ ASO	<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	ABD	Bitlikerde fungus hastalıkları	Meşe ağaçları ve ev bitkileri

İdeal bir biyoinokülant formülasyonu için olması gereken temel beş ana özellik aşağıda belirtilmiştir (Bashan et al., 2014).

- Kontaminasyon içermeyen bir inokülant taşıyıcısı, steril bir şekilde alınmış ya da ucuza sterilize edilmiş, kimyasal ve fiziksel olarak mümkün olduğu kadar standart,

yüksek su tutma kapasitesine sahip ve olabildiğince birçok bakteri suşuna uygun olmalıdır. Taşıyıcıda kullanılacak hammaddenin standart olması, ürünün standardize olabilmesi için mutlak bir mecburiyettir. Bunun nedeni, taşıyıcının biyoinokülant üretiminin ana bileşeni olmasıdır. Eğer taşıyıcının özellikleri değişirse, elde edilecek biyoinokülantlar endüstriyel üretim sırasında kalite kontrol süreçlerinden yetersiz puanı alacaklardır.

- Mikrobiyal üretim tesisleri inokülantların üretilmesi için uygun üretim koşullarını sağlayacak altyapıya sahip olmalıdır. Mikrobiyal üretimin yapılacak olduğu biyoreaktörlerin kullanılacak suşların büyümesi için istenilen sıcaklık ayarı, pH ölçümü, karıştırma hızı ve karıştırma biçimi gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir.
- İyi formüle edilmiş bir biyoinokülant bakterilerin toprağa hızlı ve kontrollü salımını sağlamalı ve çiftçiler için standart gübreleme makinaları ile kullanımı kolay olmalıdır. Çünkü bir biyoinokülantın sahada uygulanması için yüksek teknoloji ve pahalı makinalara ihtiyaç duyulması çiftçilerin çoğu için uygun olmayacaktır.
- Biyoinokülantlar toksik olmamalı, biyolojik olarak parçalanabilmeli ve karbon ayak izi bırakmamalıdır. Biyoinokülant uygulaması esnasında, bakteri hücrelerinin atmosfere veya yeraltı suyuna dağılması gibi çevresel riskler en aza indirgenmelidir (Bashan et al., 2014).

2.5 Biyoinokülant Formülasyonu Çeşitleri

PGPR inokülant formülasyonları sıvı inokülant formülasyonları ve katı inokülant formülasyonları olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar.

2.5.1 Katı inokülant formülasyonları

Katı formülasyon, inokülümün katı bir taşıyıcıya uygun oranda karıştırıldığı bir formülasyon türüdür (Tablo 2.6). Taşıyıcı, bakterileri üretim yerinden kullanılacağı yere taşımak için kullanılan malzemelerdir. Taşıyıcı seçimi, inokülüm transfer aracı olarak biyoinokülantın performansını etkileyen en önemli etkidir (Sahu et al., 2016).

Katı taşıyıcılar dört temel kategoriye ayrılmıştır (Sahu et al., 2016).

<u>Taşıyıcının Genel Adı</u>	<u>İçerik</u>
Topraklar	Turba, kömür, killer ve inorganik toprak
Bitki atık malzemeleri	Kompostlar, çiftlik gübresi, soya fasulyesi küspesi, soya fasulyesi ve yer fıstığı yağı, buğday kepeği
İnert malzemeler	Vermikülit, perlit, öğütülmüş kaya fosfatı, kalsiyum sülfat, poliakrilamid jeller ve aljinat boncuklar
Liyofilize mikrobiyal kültürler	Bu preparasyonlar daha sonra katı bir taşıyıcıya dahil edilebilmekte veya bu şekilde kullanılabilir.

Tablo 2.6 Katı formülasyon ile hazırlanan bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) (Lobo et al., 2019)

Katkı Maddeleri	PGPR Suşları	Başlangıçtaki Hücre Sayısı	Raf Ömrü	Uygulanan Ürün
Aljinat	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20, <i>Methylobacterium suomiense</i> CBMB120	10 ⁹ kob/g <i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20, <i>Methylobacterium suomiense</i> CBMB120,	12 ay (<i>M. oryzae</i> CBMB20 10 ⁸ kob/g; <i>M. suomiense</i> CBMB120 10 ⁸ kob/g)	Domates
Aljinat	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> R-67094 ve <i>Rhizophagus irregularis</i> MUCL 41833	<i>P. plecoglossicida</i> R-67094 10 ⁶ kob/g; 5x10 ² <i>R. irregularis</i> sporları	Belirtilmemiş	Domates
Amonyum molibdat ve turba	<i>Rhizobia meliloti</i>	10 ⁹ kob/g	Belirtilmemiş	Yonca

Tablo 2.6 (devam).

Aljinat, perlit, paraffin	<i>Pseudomonas putida</i> A (ATCC 12633)	10 ⁸ kob/g	4 °C veya oda sıcaklığında 5 ay (10 ⁸ kob/g)	Hardal, Arabidopsis
Kil	<i>Azospirillum brasilense</i> ve <i>Pantoea dispersa</i>	10 ⁹ kob/g	Belirtilmemiş	Gri yapraklı laden

2.5.2 Sıvı inokülant formülasyonları

Sıvı formülasyonlar sulu süspansiyonlar olarak da adlandırılır ve su, yağlar veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde oluşturulan biyokütle süspansiyonlarıdır. Tipik bir sıvı formülasyon %10-40 mikroorganizma, %1-3 süspansiyon bileşeni, %1-5 dağıtıcı, %3-8 yüzey aktif madde ve %35-65 taşıyıcı sıvı (yağ veya su) içermektedir (Tablo 2.7) (Mishra et al., 2016).

Tablo 2.7 Sıvı formülasyon ile bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) (Lobo et al., 2019)

Katkı Maddeleri	PGPR Suşları	Başlangıçtaki Hücre Sayısı	Raf Ömrü	Uygulanan Ürün
Arap zamkı	<i>Bradyrhizobium sp.</i> J-81	10 ¹⁰ kob/ml	Oda sıcaklığında 6 ay (10 ⁸ kob/mL)	Fıstık
PVA, ksantan zamkı, jelatin	<i>Paraburkholderia tropica</i> MTo-293	10 ¹⁰ kob/ml	12 ay (10 ⁶ kob/mL)	Buğday
Gliserol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf1	10 ⁸ kob/ml	Belirtilmemiş	Muz
Hindistan Cevizi Suyu, PVP, gliserol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AMB-8	10 ⁹ kob/ml	Oda sıcaklığında 6 ay (10 ⁷ kob/ml)	Kırmızı biber, pamuk ve domates
Karagenan	<i>Bacillus siamensis</i> SCFB3-1	10 ⁹ kob/ml	Belirtilmemiş	Tatlı biber

Sıvı formülasyonlar hazırlanırken farklı özelliklere ve etki mekanizmalarına sahip katkı maddeleri kullanılmaktadır. Çeşitli hücre koruyucuları, adjuvanlar, yüzey aktif maddeleri içeren bu katkı maddeleri ile mikrobiyal suşların raf ömürlerinin artırılması amaçlanmaktadır. Genel olarak sıvı inokülant formülasyonu oluşturulurken trehaloz, gliserol, polivinil prolidon (PVP), polietilen glikol (PEG), arap zankı hücre koruyucu; karboksimetil selüloz (CMC) ve ksantan zankı adjuvan, Tween 20 yüzey aktif maddesi olarak kullanılmaktadır.

2.6 Taşıyıcı Bazlı İnokülantlarla İlgili Karşılaşılan Sorunlar

Katı inokülantlarda, bakteri suşları genellikle tohumların üzerine kaplama şeklinde uygulanmaktadır. Bu nedenle tohumlara kimyasal fungusit uygulandığında ya da yerfistığı, soya fasulyesi gibi hassas tohumlara sahip bitkilere inokülasyon gerçekleştirilirken tohumun zarar görmesi gibi durumlarda alternatif inokülasyon yöntemleri gerekmektedir. Bakterilerin asidik gübrelerle teması genellikle bakterilere zarar vermektedir. Ayrıca biyoinokülantta kullanılan katı taşıyıcının, ticari bir üretim sisteminde kullanılmadan önce kurutma, öğütme ve nötralizasyon gibi işlemlerden geçmesi gerekir. Katı biyoinokülantların uygulama aşamasında spesifik makine kullanılması gerekebilmektedir. Ayrıca taşıyıcın boyutunun iyi ayarlanmamış olması uygulama esnasında kullanılan ekipmanda bozulmalara ya da yavaşlamalara neden olabilmektedir. Taşıyıcının formülasyona katılması için ön işlemlerden geçerek hazır hale gelmesi gerekmektedir. Bu ön işlemler için katı biyoinokülant üretimi yapılacak fabrikaya yüksek yatırım maliyetine neden olacak ekipmanlar alınmalıdır. Bu nedenle katı inokülantlar küçük üretim yerleri için uygun olmayabilmektedir. Steril taşıyıcı bazlı inokülantların steril olmayan taşıyıcı bazlı inokülantlara kıyasla daha yüksek kaliteye sahip olduğu kesindir. Örneğin taşıyıcı olarak kullanılabilen linyitin ticari düzeyde büyük ölçekli sterilizasyonu zor ve maliyetli bir işlemdir (Trimurtulu, 2014). Tablo 2.8’de katı ve sıvı biyoinokülantların karşılaştırılması yapılmıştır.

Tablo 2.8 Katı ve sıvı biyoinkülanların karşılaştırılması (Trimurtulu, 2014; Sahu et al., 2016)

Katı Biyoinkülanlar	Sıvı Biyoinkülanlar
Kullanılan taşıyıcıların kalitelerinin stabil olmaması,	Katı inkülanların aksine herhangi bir taşıyıcı malzemeye ihtiyaç duyulmaz.
Bakteri hücrelerinin taşıyıcıya uyum sağlayamamasından kaynaklı düşük canlı hücre sayıları,	Üretim prosesi katı inkülanların üretim prosesine göre daha kolaydır.
Raf ömürlerinin sıvı inkülanlara kıyasla daha az olması	Üretim maliyetleri katı inkülanlarla karşılaştırıldığında daha azdır.
Taşıyıcıların büyük ölçekte sterilizasyonlarının zor olması	Tamamen sterilizasyonu sağlanabilir bu nedenle kontaminasyon riski katı inkülanlara kıyasla daha azdır.
Zayıf nem tutma kapasitelerine sahip olmaları	Modern tarım makineleri ile uyumlu olduğu için uygulaması kolaydır.
Kullanılan taşıyıcının tozundan kaynaklanan kontaminasyon riski	Sulama suyu ile toprağa uygulanması kolaydır.

2.7 Mikrobiyal Gübre Pazarı

2.7.1 Dünyada mikrobiyal gübre pazarı

Küresel mikrobiyal gübre pazar büyüklüğü 2020'de yaklaşık 2,37 milyar ABD doları değerine ulaşmıştır. Pazarın, 2022- 2027 yılları arasında %12,8'lik bir bileşik büyüme oranı ile 2026 yılına kadar yaklaşık 4,33 milyar ABD doları değerine ulaşması beklenmektedir (Expertmarket, 2022)

Avrupa, en büyük ikinci mikrobiyal gübre tüketicisidir ve 2019'da küresel mikrobiyal gübre pazarının %30'luk payına sahip olmuştur. Avrupada kimyasal gübre kullanımına ilişkin zorlayıcı düzenlemelerin getirilmesi nedeniyle, kimyasal gübrelerin yerini biyolojik gübreler alma eğilimindedir. Avrupa Birliği, uygun maliyetli oldukları için mikrobiyal gübrelerin kullanımını sürekli olarak teşvik

etmekte ve daha iyi ekonomik getiri elde etmek için çiftçilere kimyasal gübre uygulamalarını optimize etmelerini veya bunları tamamen veya kısmen çevre dostu olanlarla değiştirmelerini tavsiye etmektedir. Avrupa Birliği Ortak Tarım Politikası, organik tarımla birlikte biyolojik ürünlerin benimsenmesini ve kullanılmasını teşvik etmekte ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının hayata geçirilmesi için çiftçilere doğrudan yeşil ödeme olarak bütçenin %30 kadarını sağlamaktadır. Avrupa mikrobiyal gübre pazarının büyümesinin ana nedenleri mikrobiyal gübrelerin tarımda yararlı sonuçları ve organik ürünlere yönelik talebin artmasından kaynaklanmaktadır (Mordor intelligence, 2022). Avrupa, 2020 yılında da küresel biyogübre pazarının büyük bir payını oluşturmuştur. Almanya, İspanya ve Fransa Avrupa mikrobiyal gübre pazar payının yarısından fazlasına sahip olmuştur. Organik ve çevre dostu tarım uygulamalarının artması, özellikle Fransa ve Almanya'da mikrobiyal gübre ürünlerine olan talebi arttırmıştır. Almanya hükümetinin sürdürülebilirlik stratejisine göre, 2030 yılına kadar toplam tarım arazisinin %20'sini organik tarım arazisine dönüştürmesi planlanmaktadır (Mordor intelligence, 2022). Avrupa mikrobiyal gübre pazarının büyük bir payını İspanya tek başına etkilemektedir. İspanya mikrobiyal gübre pazarının 2018'de 91,4 milyon ABD doları değerinde olduğu tahmin edilmektedir. Mikrobiyal gübreler üzerine yapılan araştırmaların artması sonucunda ortaya çıkan yeniliklerin ve kimyasal gübrelerin maliyetindeki artışın İspanya'daki mikrobiyal gübre pazarını daha da ileri seviyelere taşıyacağı öngörülmektedir (Mordor intelligence, 2022).

2.7.2 Türkiye’de mikrobiyal gübre pazarı

Türkiye’de gübre sektörünün karşılaştığı en önemli sorunlar; dışa bağımlılık, fiyat istikrarsızlığı, kamu içerisindeki dağınık yapı ve yatırımlar ile ilgili engellerdir. Bu sorunların çözümüne yönelik yapılan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü çalıştayında gübre kanununun çıkarılması, hammadde kaynaklarına sahip ülkelerde yatırımların ve iş birliğinin teşvik edilmesi, etkinliği yüksek yeni gübrelerin geliştirilmesi ve kullanımı, etkin bir piyasa denetim mekanizmasının oluşturulması ve ülkemiz toprak ve iklim şartlarına uygun, yeni gübrelerin geliştirilmesi konularına yer verilmiştir. Gübreleme işlemi sadece bitki besleme ve verim artırma amaçlı değil, toprak kaynağını koruyup, sürdürülebilir

kullanımına hizmet etmek için bir araç olarak değerlendirmek gerekmektedir (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2018).

Ülkemiz için kimyasal, organik, biyoorganik, organomineral ve mikrobiyal gübreler için bir kanunun çıkarılması ve bunun sonucunda kanunun olmamasından kaynaklı mevzuat eksikliği sonucu oluşan aksaklıkların giderilmesi önem arz etmektedir. Organik gübre kullanımının yaygınlaştırılması önemli bir husus olarak değerlendirilmektedir. Ülke topraklarımızın çok büyük bir kısmının organik madde içeriğinin düşük olduğu düşünüldüğünde organik kökenli gübrelerin önemi daha da artmaktadır (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2018).

Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Gübre Sektör Politika Belgesi 2018-2022 çalıştayında Tablo:27 Gübre Sektörü Sorun Alanları ve Eylem Planlarında yer alan 9. maddede, sorun alanı biyolojik ürünlerin yeterince kullanılmaması olarak tanımlanmıştır. Çözüm önerisi olarak mikrobiyal ve diğer bitki besleme ürünlerinin teşvik, destek, denetlenme ve analizlerinin etkinleştirilmesi olarak değerlendirilmiştir. Mikrobiyal ve diğer bitki besleme ürünlerinin tam analizlerinin yapılabilmesi için laboratuvar kapasitelerinin geliştirilmesi, yerli biyolojik ürünlerin kullanımı ve geliştirilmesi konusunda teşviklerin artırılması, baklagil bitkilerinin tarımında kullanımı için etkili *Rhizobium* türlerinden gübre formlarının oluşturularak ürüne dönüştürülüp kullanımının teşvik edilmesi maddelerini içeren bir eylem planı sunulmuştur (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2018).

Türkiyede gübre pazarı içerisinde mikrobiyal gübrelerin yeri kimyasal gübrelerle kıyaslanamayacak derecede azdır. Kullanılan mikrobiyal gübrelerin büyük bir kısmı ithal edilen mikrobiyal gübrelerdir. İthal edilen mikrobiyal gübrelerde kullanılan suşların yerli olmamasından kaynaklı bazı zamanlarda saha sonuçlarında tutarsızlıklar meydana gelmektedir. Bu nedenle yeni büyümekte olan ve yerli suşlarla biyogübre üretimi yapan özel şirketlerin çoğu devlet teşvikleriyle desteklenmelidir (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Çalışmada kullanılan bakteri izolatları

Çalışmada “Biyomühendislik Bölümü Bakteri Kültür Koleksiyonu”nda yer alan çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve PGPR özellikleri belirlenmiş *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşları kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan izolatlar ve kodları

İzolat Kodu	Tür Adı	GenBank aksesyon numaraları
EGE-B-36.5	<i>Bacillus subtilis</i>	KT970385
39-d	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	SUB8299638

3.1.2 Çalışmada kullanılan besin ortamları, çözeltiler ve kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan tüm besin ortamları kullanılmadan önce 121° C’de 15-20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.1 Besiyerleri

Nutrient Broth

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarının aktive edilmesinde ticari olarak hazır halde satın alınan Nutrient Broth (Oxoid, CM0001) kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Broth	8,0 g
Distile su	1000 ml

Nutrient Agar

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarının saklanması veya aktifleştirilmesinde Nutrient Agar (Oxoid, CM0003) kullanılmıştır.

Bileşeni Adı	Miktarı
Nutrient Agar	20,0 g
Distile su	1000 ml

Tryptic Soy Agar

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarının saklanması veya aktifleştirilmesinde Tryptic Soy Agar (Merck, 22091) ortamı kullanılmıştır.

Bileşeni Adı	Miktarı
Tryptic Soy Agar	40,0 g
Distile su	1000 ml

PGPR özellik gösteren *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun büyütülmesi için kullanılan kültür ortamı

King's B Broth ortamı (Biradar and Santhosh, 2018)

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	20,0 g
Gliserol	15,0 ml
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5 g
Distile Su	1000 ml
Ph	7.2

Pseudomonas chlororaphis 39-d suşunu üretmek amacıyla King's B Broth ortamı hazırlamak için belirtilen miktarlarda bileşenler hassas terazide tartılmıştır. Daha sonra tartılan bileşenlerin üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamının pH'ı pH 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15-20 dk steril edilmiştir.

PGPR özellik gösteren *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun büyütülmesi için kullanılan kültür ortamları

1 Nolu Kültür Ortamı (Uribe et al., 2015)

Bileşenin Adı	Miktarı
Glikoz	1,04 g
Pepton	3,0 g
Maya ekstraktı	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,59 g

KH ₂ PO ₄	6,0g
NaCl	0,01 g
Distile Su	1000 ml

Stok Tuz Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
0,1 M FeSO ₄ .7H ₂ O	1,136 ml
0,1 M ZnSO ₄ .7H ₂ O	300 µl
0,1 M CaCl ₂	9,90 ml
0,1 M MnCl ₂	30 mL

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşunu üretmek amacıyla 1 nolu kültür ortamı hazırlamak için belirtilen miktarlarda bileşenler hassas terazide tartılmıştır. Daha sonra tartılan bileşenlerin üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Stok tuz solüsyonu hazırlamak için belirtilen her bir bileşen 0,1 M hazırlanmış ve belirtilen miktarlarda kültür ortamına ilave edilmiştir. Hazırlanan kültür ortamının pH'ı pH 7'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15-20 dk steril edilmiştir.

2 Nolu Kültür Ortamı (Sözer Bahadır, 2018)

Bileşenin Adı	Miktarı
Ticari Kuru Maya	3,30 g
Glikoz	8,85 g
Soya Unu	26,55 g
Mısır Islatma Şurubu	11,66 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,32 g
Stok Tuz Solüsyonu	10 ml

Köpük Kırıcı	% 0,1
Distile Su	1000 ml
pH	7

Stok Tuz Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	10,20 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,00 g
Distile Su	1000 ml

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşunu üretmek amacıyla 2 nolu kültür ortamı hazırlamak için belirtilen miktarlarda bileşenler hassas terazide tartılmıştır. Daha sonra tartılan bileşenlerin üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Stok tuz solüsyonu hazırlamak için 1000 ml distile suyun içerisine gerekli bileşenler hassas terazide tartıldıktan sonra ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Hazır hale gelen stok tuz solüsyonundan kültür ortamına 10 ml ilave edilmiştir. Hazırlanan her bir kültür ortamının pH'ı pH 7'ye ayarlandıktan sonra köpürmeyi önlemek için besin ortamına 1 ml/L silikon bazlı köpük kırıcı ilave edilmiştir. Daha sonra kültür ortamı otoklavda 121°C'de 15-20 dk steril edilmiştir.

3 Nolu Kültür Ortamı (Akbal, 2011)

Bileşenin Adı	Miktarı
Glikoz	5,00 g
Ticari Kuru Maya	3,31 g
Soya Unu	23,56 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,60 g

Stok Tuz Solüsyonu	10 ml
Silikon Bazlı Köpük Kırıcı	% 0,1
Distile Su	1000 ml
pH	7

Stok Tuz Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,30 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	10,20 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,00 g
Distile Su	1000 ml

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşunu üretmek amacıyla 3 nolu kültür ortamı hazırlamak için hassas terazide belirtilen miktarlarda bileşenler tartılmıştır. Daha sonra tartılan bileşenlerin üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Stok tuz solüsyonu hazırlamak için 1000 ml distile suyun içerisine hassas terazide gerekli bileşenler tartıldıktan sonra ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Hazır hale gelen stok tuz solüsyonundan kültür ortamına 10 ml ilave edilmiştir. Hazırlanan kültür ortamının pH'ı pH 7,0'ye ayarlandıktan sonra köpürmeyi önlemek için besin ortamına 1 ml/L silikon bazlı köpük kırıcı ilave edilmiştir. Daha sonra kültür ortamları otoklavda 121°C'de 15-20 dk steril edilmiştir.

4 Nolu Kültür Ortam (Sun et al.,2009)

Bileşenin adı	Miktarı
Glikoz	3,604 g
Tripton	20,0 g
Maya Ekstraktı	5,00 g

NaCl	1,168 g
KCl	0,15 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	4,30 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,468 g
Distile Su	1000 ml
pH	7

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşunu üretmek amacıyla 4 nolu kültür ortamı hazırlamak için hassas terazide belirtilen miktarlarda bileşenler tartılmıştır. Daha sonra tartılan bileşenlerin üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bileşenlerin homojen karışması sağlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamının pH'ı pH 7,0'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15-20 dk steril edilmiştir.

3.1.2.2 Cözeltiler

Gram boyamada kullanılan çözeltiler (Atlas et al, 1995)

Kristal Viyole Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Kristal Viyole	2,0 g
Etanol (%95 v/v)	20 ml
Amonyum okzalat	0,8 g
Distile su	80 ml

Kristal viyole etanol içerisinde; amonyum okzalat ise distile suda çözündürülüp hazırlanan solüsyonlar birleştirilmiştir. İyiye karıştırıldıktan sonra filtre edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Gram İyodür Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Potasyum iyodür	2,0 g
İyot	1,0 g
Distile su	300 ml

Gram iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun kap içerisinde yavaş yavaş su eklenerek ezilip karıştırılması şeklinde hazırlanmıştır. Bu solüsyon amber şişelere konularak muhafaza edilmiştir.

Safranin Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Distile Su	100 ml

Kullanılan safranin solüsyonu; safranin 10 ml etanol içerisinde iyice çözdürüldükten sonra üzerine 100 ml distile su eklenmiştir. Homojen bir karışım sağlandıktan sonra birkaç gün dinlenmesi için bekletilmiş ve daha sonra filtreden geçirilmiştir. Gram boyama prosedüründe preparatların muamelesinde %96'lık etil alkol ve distile su kullanılmıştır.

Endospor boyamada kullanılan çözeltiler (Atlas et al.,1995)**Malaşit Yeşili Çözeltisi**

Bileşenin Adı	Miktarı
Malaşit Yeşili	0,5 g
Distile Su	100 ml

Boyamada ikinci bir boya olarak gram boyama için hazırlanan safranin solüsyonu kullanılmıştır.

3.1.2.3 Kimyasal maddeler

Sıvı formülasyonların hazırlanması için kullanılan kimyasallar

Katkı maddeleri:

Pseudomonas chlororaphis 39-d ve *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 büyüme ortamına hücre koruyucu olarak PVP (Merck, PVP360), PEG (Merck, 89510), gliserol (%85 v/v) belirli oranlarda ilave edilmiştir; adjuvan olarak ksantan zımkı (Merck, G1253); yüzey aktif maddesi olarak Tween 20 (Merck, P1379) belirli miktarlarda eklenerek sıvı formülasyonlar hazırlanmıştır.

Organik asitler

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşu için asidik pH'larda sıvı formülasyon oluşturmak amacıyla asetik asit (Merck, %100 v/v), propiyonik asit (Merck, %99 v/v), sitrik asit (Merck, 403727), laktik asit (Merck, %90 v/v) ve borik asit (Merck, 10043-35-3) ile formülasyon sıvısının pH'sı ayarlanmıştır.

3.1.3 Kullanılan cihazlar

3.1.3.1 Hassas terazi

Çalışmada kullanılan besin ortamları ve çözeltilerin içeriklerini tartmak için Mettler toledo marka ve AL204 model hassas terazi kullanılmıştır.

3.1.3.2 pH metre

Milwaukee Mi 150 marka pH metre hazırlanan besin ortamı ve çözeltilerin pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.3 Vorteks

Homojen karıştırmayı sağlamak için Yellowline marka ve TTS2 model vorteks kullanılmıştır.

3.1.3.4 Isıtıcılı manyetik karıştırıcı

Heidolph marka ve MR 3001 model ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, kullanılan besin ortamları ve diğer çözeltilerin istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.5 Otoklav

Besin ortamlarının sterilizasyonunun sağlanması ve mikrobiyolojik olarak kontamine haldeki malzemelerin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi için öldürme amacıyla Hirayama marka ve Hiclave HVE-50 model otoklav kullanılmıştır.

3.1.3.6 İnkübatör

Binder markalı inkübatörler, kültürlerin 30⁰C'de ve 28⁰C'de inkübasyonları için kullanılmıştır.

3.1.3.7 Çalkalamalı inkübatör

ZWYR- D2402 marka çalkalamalı inkübatör, 30 ⁰C'de ve 28⁰C'de sıvı kültürde bakterilerin optimum üretim koşullarında büyümesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.8 Pastör fırını

Binder marka ısıtıcı fırın, 180 ⁰C'de iki saat çalıştırılarak cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.3.9 Mikroskop

Çalışmada kullanılan suşların saflık kontrollerinin yapılması amacıyla Leica marka DM2500 model mikroskop kullanılmıştır.

3.1.3.10 Buzdolabı

Şenocak marka D-372 SCM 4C model cam kapılı soğutucu bakteri izolatlarının +4°C’de saklanması amacıyla kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin aktivasyonu ve saflık kontrolü

“Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Bakteri Kültür Koleksiyonu” nda 4° C’de yatık olarak hazırlanmış nutrient agarlı tüplerde muhafaza edilen PGPR özelliklere sahip *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun saflık kontrolü için nutrient agar içeren petrilere çizgi ekim yöntemi ile inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolatların 30° C’de 24 saat inkübasyonun sonucunda saf koloniler elde edilmiştir.

3.2.2 PGPR özellik gösteren *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşlarından biyokütle üretimi

3.2.2.1 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun biyokütle üretimi

Pseudomonas chlororaphis 39-d suşunun biyokütle üretimi için King’s B Broth ortamı (Biradar and Santhosh, 2018) kullanılmıştır. Aşı kültürü olarak 250 ml’lik erlenlerde 50 ml’lik hazırlanmış nutrient broth ortamına *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu inoküle edilip 18 saat boyunca çalkalayıcıda $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. 500 ml’lik erlenlerde 100 ml’lik hazırlanmış üretim ortamına aşı kültüründen %2 oranında inoküle edilip 30 saat boyunca çalkalayıcıda 150 rpm ve $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretim sonrası kültür sıvısından 10^{-1} – 10^{-8} ’e kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmış ve canlı hücre sayısı “dökme plaka yöntemi”ne göre koloni oluşturan birim/ml (kob/ml) belirlenmiştir. Bu amaçla 10^{-4} - 10^{-8} lik dilüsyonların her birinden birer mL alınarak aseptik koşullar altında steril cam petrilere aktarılmıştır. İncelenen her bir seyreltme iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Daha sonra bu petrilerin üzerine 45°C - 50°C ’ye soğutulmuş, nutrient agar besiyeri yaklaşık 20 mL olacak şekilde

dökülmüştür. Petriler agar katılaşıncaya kadar elle yavaşça karıştırıldıktan sonra 28°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Kumar et al., 2015). Üretim erlenleri iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2.2 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun biyokütle üretimi

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşundan endospor formunda en yüksek biyokütle üretimini elde edebilmek için çeşitli *B. subtilis* suşlarının üretiminde kullanılmış olan dört farklı üretim ortamı denenmiştir. Bu ortamlar 3.1.2.1’de verilen 1 nolu kültür ortamı, 2 nolu kültür ortamı, 3 nolu kültür ortamı ve 4 nolu kültür ortamıdır (Uribe et al., 2015; Sözer Bahadır, 2018; Akbal, 2011; Sun et al., 2009). Her bir üretim ortamı için aşı kültürü olarak 250 ml’lik erlenlerde 50 ml’lik hazırlanmış nutrient broth ortamına *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu inoküle edilip 18 saat boyunca çalkalayıcıda $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 500 ml’lik erlenlerde 100 ml’lik hazırlanmış üretim ortamlarının her birine %2 oranında aşı kültürü ilave edilmiş ve 6 gün boyunca çalkalayıcıda 180 rpm $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de inkübasyona bırakılmıştır. Üretim sonrası kültür sıvısından 10^{-1} – 10^{-9} ’a kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmış ve canlı hücre sayısı “dökme plaka yöntemi” ne göre koloni oluşturan birim/ml (kob/ml) belirlenmiştir. Bu amaçla 10^{-4} - 10^{-9} luk dilüsyonların her birinden birer mL alınarak aseptik koşullar altında steril cam petrilere aktarılmıştır. İncelenen her bir seyreltme iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Daha sonra bu petrilerin üzerine $45-50^\circ\text{C}$ ’ye soğutulmuş, nutrient agar besiyeri yaklaşık 20 mL olacak şekilde dökülmüştür. Petriler agar katılaşıncaya kadar elle yavaşça karıştırıldıktan sonra 30°C ’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. (Kumar et al., 2015). Tüm üretim erlenleri iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Denemeler sonucunda en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği üretim ortamı bundan sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.3 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyonların hazırlanması

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşu için sıvı formülasyon oluşturulmasında farklı formülasyon denemeleri planlanmış ve buna yönelik iki farklı deneme seti kurulmuştur. İlk deneme setinde hücre koruyucu olarak PVP, PEG ve gliserol, adjuvan olarak ksantan zankı ve yüzey aktif maddesi olarak Tween 20’nin

kullanıldığı sıvı formülasyonlar hazırlanmış ve bu sıvı formülasyonlar 25 °C ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Altı ay boyunca sıvı formülasyonların raf ömrü takibi yapılarak katkı maddelerinin *B. subtilis* suşunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. İkinci deneme setinde asidik formülasyonlar oluşturmak için öncelikle formülasyon ön denemesi yapılmıştır. Formülasyon ön denemesinde beş farklı asit ile *B. subtilis* suşunun kültür ortamının pH'ları asidik değerlere ayarlanmış ve üç ay boyunca raf ömrü takibi yapılmıştır. Formülasyon ön demesinden elde edilen verilere göre bir asit seçilmiş ve bu asit ile *B. subtilis* suşunun kültür ortamının pH'ları asidik değerlere ayarlanarak asidik sıvı formülasyonlar oluşturulmuştur. Asidik sıvı formülasyonlar oda sıcaklığında muhafaza edilerek raf ömrü takibi yapılmış ve asidik pH'ların *B. subtilis* suşunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir.

3.2.3.1 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 ile sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olarak biyokütle üretim ortamında hangi hücre koruyucuların kullanılacağı ve bu hücre koruyucuların miktarlarının ne kadar olacağı tespit edilmiştir. Bu nedenle Design Expert (Versiyon 7.0) programının RSM algoritmasında yer alan Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design, CCD) ile hücre koruyucu olarak kullanılan polivinilpirolidon (PVP), polietilen glikol (PEG) ve gliserolmiktarlarıyla ilgili 20 farklı kombinasyon elde edilmiştir. Yirmi farklı kombinasyon içeriği *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun 3.1.2.1'de belirlenmiş olan üretim ortamına eklenmiş ve *B. subtilis* suşunun 3.2.2.2'de belirtilen koşullarda üretimi sağlanmıştır. Aynı zamanda iki tekrarlı olacak şekilde kontrol olarak hücre koruyucu içermeyen üretim ortamı hazırlanmış ve aynı inkübasyon koşullarda *B. subtilis* suşunun üretimi sağlanmıştır. Üretim sonrası toplam 22 adet olan kültür sıvılarından 10^{-1} – 10^{-9} 'e kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmış ve canlı hücre sayısı “dökme plaka yöntemi”ne göre koloni oluşturan birim/ml (kob/ml) belirlenmiştir (Kumar et al., 2015). Sayımlar sonucunda hücre koruyucu içermeyen iki adet üretim ortamındaki *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı ile 20 adet farklı miktarlarda hücre koruyucu içeren üretim ortamlarındaki *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak *B. subtilis* suşunun en

yüksek biyokütle miktarının (kob/ml) elde edildiği kombinasyonlar çalışmanın devamında sıvı formülasyon oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Yüksek biyokütle miktarının belirlendiği bu üretimler 100 ml'lik steril amber şişelere konularak oda sıcaklığında (25°C) ışık almayan dolaplarda muhafaza edilmişve on ay süre boyunca canlı hücre sayıları aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile takip edilmiştir. On aylık sürenin sonunda adjuvan ve yüzey aktif maddesi olmaksızın yalnızca hücre koruyucuların kullanıldığı sıvı formülasyonlarda *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı (kob/ml) üzerindeki değişim saptanmıştır.

3.2.3.2 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile hücre koruyucularının varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşunun büyütülmesi için 3.2.2.2'de belirlenmiş olan ve en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği üretim ortamının içine 3.2.3.1'de yapılan RSM ile belirlenen en yüksek biyokütle miktarlarının elde edildiği hücre koruyucularının optimum miktarları eklenmiş ve 6 gün boyunca çalkalayıcıda 180 rpm $30 \pm 2^\circ$ C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kültür sıvısına önceden steril edilmiş; adjuvan olarak %0,3 ksantan zankı ve yüzey aktif maddesi olarak %0,5 tween 20 eklenmiştir (Biradar and Santhosh, 2018). Aynı zamanda kontrol olarak herhangi bir katkı maddesi içermeyen üretim ortamında aynı üretim koşullarında *B. subtilis* suşu üretilmiştir.

Üçer tekrarlı olarak hazırlanan sıvı formülasyonlar ve kontroller 100 ml'lik steril amber şişelere 50 ml konularak oda sıcaklığında 25 °C'de ve +4 °C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sıvı formülasyonlardaki ve kontrollerdeki canlı hücre sayıları (kob/ml) aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile altı ay boyunca takip edilmiştir.

3.2.3.3 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun asidik pH'larda sıvı formülasyonu

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşu, 3.2.2.2'de belirlenmiş olan ve en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği üretim ortamında 6 gün boyunca çalkalayıcıda

180 rpm $30 \pm 2^\circ$ C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üretim sonrası kültür sıvısından 10^1 – 10^8 'e kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmış ve canlı hücre sayısı “dökme plaka yöntemi”ne göre kob/ml olarak belirlenmiştir. Formülasyonlarda kullanılmak üzere başlangıç toplam canlı hücre sayısı 10^8 kob/ml dozuna ayarlanmıştır. Daha sonra *Bacillus* suşlarının asidik pH'larda formülasyonu konusunda yapılmış çeşitli çalışmalarda kullanılan asetik asit (U.S. Patent No. 20110200572, 2011)), laktik asit (U.S. Patent No.2012015454, 2012), propiyonik asit (U.S. Patent No.2012015454, 2012), sitrik asit (U.S. Patent No.2012015454, 2012) gibi organik asitler ve borik asit (TR Patent No. 201613931, 2017) kullanılarak bir formülasyon ön denemesi yapılmıştır. Bu amaçla 10^8 kob/ml canlı hücre içeren kültür sıvısının pH'ı incelenen beş farklı asidin her birisi ile ayrı ayrı 3,0, 4,0 ve 5,0'e ayarlanmıştır. Her bir asit ve her bir pH için üçer tekrarlı hazırlanan sıvı formülasyonlar 100 ml'lik steril amber şişelere 50 ml konularak karanlıkta ve oda sıcaklığında 25° C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca *B. subtilis* suşu üretildikten sonra üretim ortamının pH'ında herhangi bir değişiklik yapılmadan üçer tekrarlı olacak şekilde kontrol hazırlanmıştır. Hazırlanan asidik sıvı formülasyonlardaki canlı hücre sayıları aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile 3 ay boyunca takip edilmiştir. Eş zamanlı olarak asidik sıvı formülasyonların aylık pH ölçümleri yapılarak canlı hücre sayısı ile pH değişimi arasındaki ilişki de belirlenmiştir. Formülasyon ön denemesinin sonuçlarına göre *B. subtilis* suşu ile asidik sıvı formülasyon oluşturmak için kullanılacak aside karar verildikten sonra seçilen asit ile asidik sıvı formülasyonlar hazırlanmıştır.

Formülasyon ön denemesi sonucunda seçilen asit ile hazırlanan asidik sıvı formülasyonlardaki canlı hücre sayıları aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile 12 ay boyunca takip edilmiştir. Eş zamanlı olarak asidik sıvı formülasyonların aylık pH ölçümleri yapılarak canlı hücre sayısı ile pH değişimi arasındaki ilişki belirlenmiştir.

3.2.4 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile sıvı formülasyonların hazırlanması

Pseudomonas chlororaphis 39-d suşu ile sıvı formülasyon oluşturmak için deneme seti kurulmuştur. Deneme setinde hücre koruyucu olarak PVP, PEG ve gliserol, adjuvan olarak ksantan zımkı ve yüzey aktif maddesi olarak Tween 20'nin

kullanıldığı sıvı formülasyonlar hazırlanmış ve bu sıvı formülasyonlar 25 °C ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Altı ay boyunca sıvı formülasyonların raf ömrü takibi yapılarak katkı maddelerinin *P. chlororaphis* suşunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir.

3.2.4.1 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi

Pseudomonas chlororaphis 39-d ile sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olarak biyokütle üretim ortamında hangi hücre koruyucuların kullanılacağı ve bu hücre koruyucuların miktarlarının ne kadar olacağı tespit edilmiştir. Bu nedenle Design Expert (Versiyon 7.0) programının RSM algoritmasında yer alan Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design, CCD) ile hücre koruyucu olarak kullanılan polivinilpirolidon (PVP), polietilen glikol (PEG) ve gliserolmiktarlarıyla ilgili 20 farklı kombinasyon elde edilmiştir. Yirmi farklı kombinasyon içeriği *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun 3.1.2.1’de içeriği belirtilmiş olan King’s B Broth üretim ortamına eklenmiş ve 3.2.2.1’de belirtilen koşullarda üretimi sağlanmıştır. Aynı zamanda iki tekrarlı olacak şekilde kontrol olarak hücre koruyucu içermeyen üretim ortamı hazırlanmış ve aynı inkübasyon koşullarda *P. chlororaphis* suşunun üretimi sağlanmıştır. Üretim sonrası toplam 22 adet olan kültür sıvılarından 10^{-1} – 10^{-9} ’e kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmış ve canlı hücre sayısı “dökme plaka yöntemi”ne göre koloni oluşturan birim/ml (kob/ml) belirlenmiştir (Kumar et al., 2015). Sayımlar sonucunda hücre koruyucu içermeyen iki adet üretim ortamındaki *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısı ile 20 adet farklı miktarlarda hücre koruyucu içeren üretim ortamlarındaki *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısı karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak *P. chlororaphis* suşunun en yüksek biyokütle miktarının (kob/ml) elde edildiği kombinasyonlar çalışmanın devamında sıvı formülasyon oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Yüksek biyokütle miktarının belirlendiği bu üretimler 100 ml’lik steril amber şişelere konularak oda sıcaklığında (25°C) ışık almayan dolaplarda muhafaza edilmiş ve dokuz ay süre boyunca canlı hücre sayıları aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile takip edilmiştir. Dokuz aylık sürenin sonunda adjuvan ve yüzey aktif maddesi olmaksızın yalnızca hücre koruyucuların kullanıldığı sıvı

formülasyonlarda *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısı (kob/ml) üzerindeki değişim saptanmıştır.

3.2.4.2 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile hücre koruyucularının varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi

Pseudomonas chlororaphis 39-d suşunun büyütülmesi için 3.1.2.1’de içeriği belirtilmiş olan King’s B broth üretim ortamının içine 3.2.4.1’de yapılan RSM ile belirlenen en yüksek biyokütle miktarlarının elde edildiği hücre koruyucularının optimum miktarları eklenmiş ve 6 gün boyunca çalkalayıcıda 150 rpm $28 \pm 2^\circ \text{C}$ ’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kültür sıvısına önceden steril edilmiş; adjuvan olarak %0,3 ksantan zımkı ve yüzey aktif maddesi olarak %0,5 tween 20 eklenmiştir (Biradar and Santhosh, 2018). Aynı zamanda kontrol olarak herhangi bir katkı maddesi içermeyen üretim ortamında aynı üretim koşullarında *P. chlororaphis* suşu üretilmiştir.

Üçer tekrarlı olarak hazırlanan sıvı formülasyonlar ve kontroller 100 ml’lik steril amber şişelere 50 ml konularak oda sıcaklığında 25°C ’de ve $+4^\circ \text{C}$ ’de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sıvı formülasyonlardaki ve kontrollerdeki canlı hücre sayıları (kob/ml) aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile altı ay boyunca takip edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 PGPR Özellik Gösteren *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d Suşlarından Biyokütle Üretimi

4.1.1 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun biyokütle üretimi

Pseudomonas suşları toprakta, özellikle rizosferde bulunan aerobik, gram negatif bakterilerdir. *Pseudomonas* suşları bitki büyümesini teşvik etme kapasiteleri ve biyolojik kontrol potansiyelleri sayesinde tarımda yüksek ilgi görmektedirler. Çok çeşitli besin maddelerini metabolize etme yetenekleri, çeşitli bitki-toprak ortamlarında adaptasyon yetenekleri sayesinde hızlı ve kolay büyümeleri *Pseudomonas* suşlarını biyokontrol ve biyogübre ürünlerinin geliştirilmesi için umut verici mikroorganizmalar haline getirmiştir. Bitki köklerini aktif olarak kolonize etmek için flagella kullanabildiklerinden dolayı bitki kök kolonizasyonu için çok uygundurlar. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* spp.'nin bitki sağlığını ve/veya mahsul verimini iyileştirmede büyümeyi teşvik edici yetenekleri gözlemlenmiştir. Örneğin *Pseudomonas* spp. inoküle edilen patates bitkilerinde birinci ayın sonunda bitkilerde iki kat sürgün ve kök oluşumu ile arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* suşları azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğü veya büyüme hormonları (özellikle oksinler ve giberellinler) üretme gibi çeşitli mekanizmalar kullanarak bu etkiyi sağladığı bildirilmiştir (Arseneault and Filion, 2016)

Çalışmamızda *P. chlororaphis* suşunun biyokütle üretimi için 3.2.2.1'de belirtildiği üzere uygun inkübasyon koşullarında King's B broth ortamı kullanılarak toplam canlı hücre sayısı $2,3 \times 10^8$ kob/ml olarak elde edilmiştir.

4.1.2 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun biyokütle üretimi

Bacillus türleri, toprakta bulunan baskın bakteri türlerinden bir tanesidir. Genetik ve metabolik çeşitliliğe sahip olan *Bacillus* spp. besin döngüsünden bitkilere stres toleransı sağlamaya kadar toprak ekosisteminde birçok ekolojik

işleve hizmet etmektedir. *Bacillus* türlerinin, bitkilerin büyümesine doğrudan veya dolaylı olarak yardımcı olması, fitohormonların üretimiyle bitki büyümesinde genel bir iyileşme sağlanması ve bitkileri patojenlerden ve diğer abiyotik stres faktörlerinden koruması gibi birçok faydalı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Saxena et al., 2020)

Ayrıca bu bakteri türlerinin PGPR inokülantı endüstrisinde ticari olarak kullanılmasındaki en büyük etkenlerden bir tanesi endospor oluşturabilmeleridir. *Bacillus* türlerinde endospor oluşumu, hücre kültürü durağan büyüme fazına ulaştığında gerçekleşmektedir. Sporülasyon, besin yoksunluğu veya hücre yoğunluğu ile indüklenmekte ve sıcaklık, pH, havalandırma ve besin çeşitliliği gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Jenson, 2014). Endospor yapıları, yüksek hücre canlılığının korunmasında, depoda tutulan formülasyonların raf ömrünün uzatılmasında ve farklı çevresel koşullar altında suşların iyi performans göstermesinde kritik öneme sahiptir. Özellikle *Bacillus* türleri sahip olduğu endospor mekanizması sayesinde olumsuz çevresel koşullar altında uzun süre hayatta kalabilirler.

Çalışmamızda *B. subtilis* suşunun üretimi için 3.1.2.1’de içerikleri belirtilen dört farklı kültür ortamı denenmiştir. Çalışmanın devamında sıvı formülasyonlar hazırlanmak için en yüksek toplam canlı hücre sayısını teşvik eden 3 numaralı kültür ortamı seçilmiştir.

Tablo 4.1 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun farklı kültür ortamlarında toplam canlı hücre sayıları (kob/ml)

Kültür Ortamları	Toplam canlı hücre sayısı (kob/ml)
1 Nolu Kültür ortamı	1,5x10 ⁹
2 Nolu Kültür ortamı	3,0x10 ⁸
3 Nolu Kültür ortamı	4,3x10⁹
4 Nolu Kültür ortamı	1,5x10 ⁹

4.2 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 Suşu ile Sıvı Formülasyonların Hazırlanması

Sıvı formülasyonlar hazırlanırken farklı özelliklere ve etki mekanizmalarına sahip katkı maddeleri kullanılmaktadır. Çeşitli hücre koruyucuları, adjuvanlar, yüzey aktif maddeleri içeren bu katkı maddeleri ile mikrobiyal suşların raf ömürlerinin arttırılması amaçlanmaktadır. Genel olarak sıvı inokülant formülasyonu oluştururken trehaloz, gliserol, PVP, PEG ve arap zamkı hücre koruyucu; CMC ve ksantan sakızı adjuvan, Tween 20 yüzey aktif maddesi, potasyum sorbat koruyucu amacıyla kullanılmaktadır (Kumaresan and Reetha, 2011; Biradar and Santhosh, 2018). Arap zamkı, ısı transferini sınırlayan ve yüksek su aktivitesine sahip yapışkan özelliklere sahip bir biyopolimerdir (Valetti et al., 2016). Polivinilpirrolidin (PVP), bakteri hücrelerinin metabolizmaları için hücrelerin etrafında suyu tutabilen yüksek bir su bağlama kapasitesine sahiptir. PVP ve arap zamkının hücreleri toksik faktörlere karşı koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca PVP, kolloidlerdeki bakterileri koruyan kolloidal stabilizasyon olarak bilinen bir özelliğe sahiptir. Polivinilpirolidon, inokülasyon ve tohum çimlenmesi sırasında mobilize olan tohum kabuğunda bulunan toksik bileşikleri bağlayabilmektedir. PVP'nin yüksek su bağlama kapasitesi sayesinde inokülant uygulandıktan sonra inokülantın kurummasını yavaşlattığı görülmüştür. PVP diğer bazı bileşiklerden daha kalın bir koruma tabakası sağlar. Yapışkan kıvamı, hücre ve inokülantın tohuma yapışmasını arttırabilmektedir (Singleton et al., 2002). Polietilen glikol düşük molekül ağırlıklı (3000), suda çözünebilen bir polimerdir. PEG hücrenin tohuma yapışmasını arttıracak yapışkan bir kıvama sahiptir ve viskoz yapısı inokülantın kuruma sürecini yavaşlatmaktadır (Biradar and Santhosh, 2018). Gliserol, yüksek su tutma kapasitesine sahiptir bu nedenle inokülantın kurutma hızını yavaşlatarak hücreleri kurumaya karşı koruduğu için hücre koruyucu olarak kullanılır. Karboksimetilselüloz (CMC) düşük konsantrasyonlarda kullanılan, yarı sentetik ve kolayca temin edilebilen bir polimerdir ve formülasyon hazırlanmasında adjuvan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Herrmann and Lesueur, 2013).

Çalışmamızda mikrobiyal hücreleri koruyucu bir ortam sağlamak amacıyla bu maddelerden bazıları üretim ortamına eklenmiştir. Bu yardımcı bileşenler kullanılarak bitkinin kök, yaprak, tohum gibi yüzeylerine bakteri hücrelerinin daha iyi yapışması, ürünlerin stabilitesini arttırma, toksinlerin etkisiz hale getirilmesi

veya depolama sırasında ve ekstrem koşullarına maruz kaldıktan sonra suşun hayatta kalma süresinin artırılması yoluyla inokülan kalitesinin geliştirilmesi amaçlanmıştır (Anith et al., 2016.)

Çalışmamızda *Bacillus subtilis EGE-B-36.5* suşu ile sıvı formülasyonların **optimizasyon çalışmalarında** Yanıt Yüzeyi Yöntemi (RSM) kullanılmıştır. RSM, optimizasyon süreci için karmaşık hesaplamaları içeren bir teknik olarak tanımlanmaktadır. Bu yaklaşım, tüm bağımsız değişkenleri birleştiren ve deneyden elde edilen veri girişini, sonunda bir yanıtın teorik değerini verebilecek bir denklemler kümesi oluşturmak için kullanan uygun bir deney tasarımı geliştirmektedir. Yanıtlar, bağımsız değişkenlerin kontrollü değerlerine dayanan iyi tasarlanmış bir regresyon analizinden elde edilmektedir. Daha sonra, bağımsız değişkenlerin yeni değerlerine dayalı olarak bağımlı değişken tahmin edilebilmektedir. RSM bir model denklemi ile nicel verileri kullanarak çok sayıda parametre arasındaki ilişkiyi ve etkileşimleri değerlendirebilmektedir.

Deney tasarımı, Box Behnken ve Merkezi Kompozit Tasarım oluşturulması, yanıt yüzeyi modellemesini temsil eden model denklemlerini geliştirmek için istatistiksel ve regresyon analizinin yapılması ve model denklemi yoluyla gerçekleştirilen parametreler/değişkenlerin optimizasyonu şeklinde RSM uygulamasında üç adım vardır.

RSM, deneysel prosedürleri tasarlamak için çeşitli yöntemlerden oluşur ve bunlardan biri Merkezi Kompozit Tasarımdır (CCD). CCD ile gerçekleştirilen optimizasyon, geniş bir parametre yelpazesinde her bir faktörün rolünün taranmasına izin vermektedir. Ayrıca CCD, deneysel çalışmaları azaltarak değişkenlerin yanıtta kümülatif etkisini de değerlendirebilmektedir.

RSM'in geleneksel yöntemlere kıyasla en büyük başarısı, en yüksek yanıtın elde edilmesi için en uygun değişken değerini belirleyerek deneysel çalışmaların azaltılmasıdır. Klasik optimizasyon çalışmaları bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimi tam olarak açıklayamamaktadır. Türetilen model, deneme aşamasında yanıtı önceden tahmin etmek için kullanılabilir. Ayrıca, bu adım, araştırmacı veya endüstrilerin, yanıt üzerinde en yüksek etkiye katkıda bulunan belirli

değişkenlere ya da yönlere odaklanmasına yardımcı olmaktadır. Özellikle yüksek maliyetli hammadde kullanılarak yapılan deneylerde merkezi kompozit tasarımın veya Box Behnken'in kullanılması, tek faktör yöntemiyle geleneksel optimizasyon yaklaşımına ekonomik bir alternatif olmuştur (Amin et al., 2015).

4.2.1 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi

Çalışmamızda sıvı PGPR formülasyonları oluşturmak amacıyla en çok kullanılan hücre koruyucuları arasından PVP, PEG ve gliserol literatür taraması sonucunda seçilmiştir (Lobo et al., 2019). Seçilen faktörlerin raf ömrü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum değerlerinin belirlenmesi için RSM uygulanmıştır. Design-Expert 7.0.0 programı kullanılarak belirlenen üç faktör ile seçilen aralıklarda çalışabilmek için “face center” opsiyonu seçilerek merkezde 6 tekrarı içeren merkezi kompozit tasarımı işlemi yapılmıştır (Şekil 4.1).

Şekil 4.1’de tasarımdaki farklı deney setlerine (runs) ait her bir yanıt belirtilmiştir. PVP faktör 1; PEG faktör 2 ve gliserol faktör 3 olarak belirtilmiştir. Bu aşamadan sonra RSM’de elde edilen deneme deseni ile deneyler 20 farklı kombinasyonda üretim ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu üretim ortamları, en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği 3 nolu kültür ortamına hücre koruyucuların şekil 4.1’de belirtilen farklı deney setlerindeki miktarları eklenerek hazırlanmıştır. *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu hazırlanan kültür ortamlarına inoküle edildikten sonra uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan hemen sonra hücre koruyucularını içeren her bir üretim ortamı (her biri farklı bir formülasyon olarak kabul edilmektedir) için dökme plaka yöntemi ile belirlenen toplam canlı hücre sayılarının (kob/ml) logaritması deney tasarımında yanıt 1 olarak belirtilmiştir. On ay süreyle aylık toplam canlı hücre sayıları takip edilen sıvı formülasyonların onuncu aydaki toplam canlı hücre sayılarının (kob/ml) logaritması ise Yanıt 2 olarak belirtilmiştir.

Run	Block	Factor 1 A:PVP g/ml	Factor 2 B:PEG g/ml	Factor 3 C:GLYCEROL g/ml	Response 1 Can. Hüc. Say. CFU/ml	Response 2 Can. Hüc. sa.
1	Block 1	1.75	1.75	1.75	9.14613	5
2	Block 1	2.49	2.49	1.01	9.8109	8.01284
3	Block 1	1.01	1.01	1.01	9.59879	6.4624
4	Block 1	1.75	1.75	3.00	9.21748	5
5	Block 1	2.49	1.01	1.01	9.53782	6.77159
6	Block 1	1.75	0.50	1.75	9.94101	7.00432
7	Block 1	1.75	1.75	1.75	9.76418	6.62014
8	Block 1	0.50	1.75	1.75	9.81358	7.82347
9	Block 1	1.75	1.75	1.75	8.35218	4
10	Block 1	1.75	1.75	1.75	9.0569	5
11	Block 1	1.01	1.01	2.49	9.15229	5
12	Block 1	1.75	1.75	0.50	10.0969	7.02119
13	Block 1	3.00	1.75	1.75	8.81954	4
14	Block 1	1.75	1.75	1.75	9.29003	5
15	Block 1	2.49	2.49	2.49	8.85733	4
16	Block 1	1.75	1.75	1.75	9.36361	5
17	Block 1	2.49	1.01	2.49	8.79239	4
18	Block 1	1.01	2.49	2.49	8.83569	4
19	Block 1	1.01	2.49	1.01	9.74819	6.32015
20	Block 1	1.75	3.00	1.75	8.35793	4

Şekil 4.1 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtların logaritmik değerleri.

Şekil 4.2'de ise üç faktör ile yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucu gösterilmiştir. RSM deneme deseni sonucunda elde edilen ve Yanıt 1'i ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen model, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$).

Response	1	Can. Hüc. Say.				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2.74	9	0.30	1.39	0.3066	not significant
A-PVP	0.30	1	0.30	1.35	0.2723	
B-PEG	0.45	1	0.45	2.08	0.1800	
C-GLYCEROL	1.51	1	1.51	6.89	0.0254	
AB	0.032	1	0.032	0.15	0.7105	
AC	0.014	1	0.014	0.066	0.8024	
BC	0.057	1	0.057	0.26	0.6214	
A ²	0.017	1	0.017	0.078	0.7857	
B ²	8.768E-003	1	8.768E-003	0.040	0.8453	
C ²	0.35	1	0.35	1.58	0.2374	
Residual	2.19	10	0.22			
Lack of Fit	1.10	5	0.22	1.01	0.4945	not significant
Pure Error	1.09	5	0.22			
Cor Total	4.92	19				

Şekil 4.2 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşunun biyokütle üretimindeki canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.

Şekil 4.2’de görülen modelde F değeri (1,39) denemeye ait modelin anlamlı olmadığını göstermektedir. Ayrıca 1,01 olan uyum eksikliği F değeri, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya göre büyük olduğunu ve bu uyumsuzluğun anlamlı olduğunu göstermektedir. ANOVA testi sonuçlarına göre toplam canlı hücre sayısı üzerinde PVP, PEG ve gliserolün etkisinin *B. subtilis* suşunun biyokütle üretiminden hemen sonra belirlenen toplam canlı hücre sayısı üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Sum of Squares (kareler toplamı); df (serbestlik derecesi); Mean Square (kareler ortalaması); Pure Error (saf hata) ve Lack of fit F Value (uyum eksikliği F değerini) temsil etmektedir.

Response 2		Can. Hüc. sa. 10.ay			
ANOVA for Response Surface Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	22.22	9	2.47	1.82	0.1814 not significant
A-PVP	2.16	1	2.16	1.59	0.2355
B-PEG	1.80	1	1.80	1.33	0.2762
C-GLYCEROL	14.28	1	14.28	10.55	0.0088
AB	0.71	1	0.71	0.52	0.4856
AC	1.13	1	1.13	0.83	0.3832
BC	0.55	1	0.55	0.41	0.5380
A ²	0.74	1	0.74	0.55	0.4766
B ²	0.097	1	0.097	0.071	0.7948
C ²	0.99	1	0.99	0.73	0.4133
Residual	13.54	10	1.35		
Lack of Fit	9.98	5	2.00	2.80	0.1412 not significant
Pure Error	3.56	5	0.71		
Cor Total	35.76	19			

Şekil 4.3 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşunun onuncu ayda elde edilen canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.

Şekil 4.3'te belirtilen RSM deneme deseni sonucunda elde edilen ve yanıt 2 ile ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen model, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Şekil 4.3'te görülen modelde F değeri (1,82), denemeye ait modelin anlamlı olmadığını göstermektedir. Ayrıca 2,80 olan uyum eksikliği F değeri, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya göre büyük olduğunu, diğer bir değişle bu uyumsuzluğun anlamlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.3'te belirtilen ANOVA değerlerine göre *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı üzerinde hücre koruyucu olarak kullanılan PVP, PEG ve gliserolün etkisinin onuncu ayın sonunda Şekil 4.1'de belirtilen deneme desenleri (runs)'ne göre ortaya çıkmadığı görülmüştür.

4.2.2 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile hücre koruyucularının varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyonlar oluşturmak için hücre koruyucular (PVP, PEG, gliserol), adjuvan (ksantan zamkı) ve yüzey aktif maddesi (Tween 20) belirli bir sıra ile kültür ortamına eklenerek kullanılmıştır. Sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olarak 3.1.2.1’de içeriği belirtilen 3 Nolu kültür ortamının içerisine şekil 4.1’de verilen RSM deneme desenine göre farklı deney setlerindeki hücre koruyucu içerikleri eklenmiştir. Kullanılacak olan RSM deney setlerinin seçiminde sıvı formülasyonların maksimum /minimum miktarlarında hücre koruyucu içermesi, sıvı formülasyonlarda hücre koruyucuların birlikte/ tek başına kullanılması ve literatür bilgisinden yararlanılmıştır. Daha sonra farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda hücre koruyucu içeren bu kültür ortamlarına *B. subtilis* suşu inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Tablo 4.2 ve 4.3’te belirtilen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 numaralı sıvı formülasyonları oluşturmak için kullanılan hücre koruyucuların miktarları ve kombinasyonları şekil 4.1’de belirtilen farklı deney setleri (runs)’nden elde edilmiştir.

1 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 5, 2 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 2, 3 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 19, 4 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 12, 5 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 3, 6 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 6, 7 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen merkezde 6 tekrarı içeren face center noktası, 8 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1’de belirtilen deneme deseni 8’e göre belirlenmiştir. 9, 10 ve 11 nolu sıvı formülasyonlarda ise için literatürde en iyi sonuçları vermiş olan hücre koruyucular ve miktarları kullanılmıştır (Biradar and Santhosh, 2018; Meena et al., 2015; Gopal and Baby, 2017).

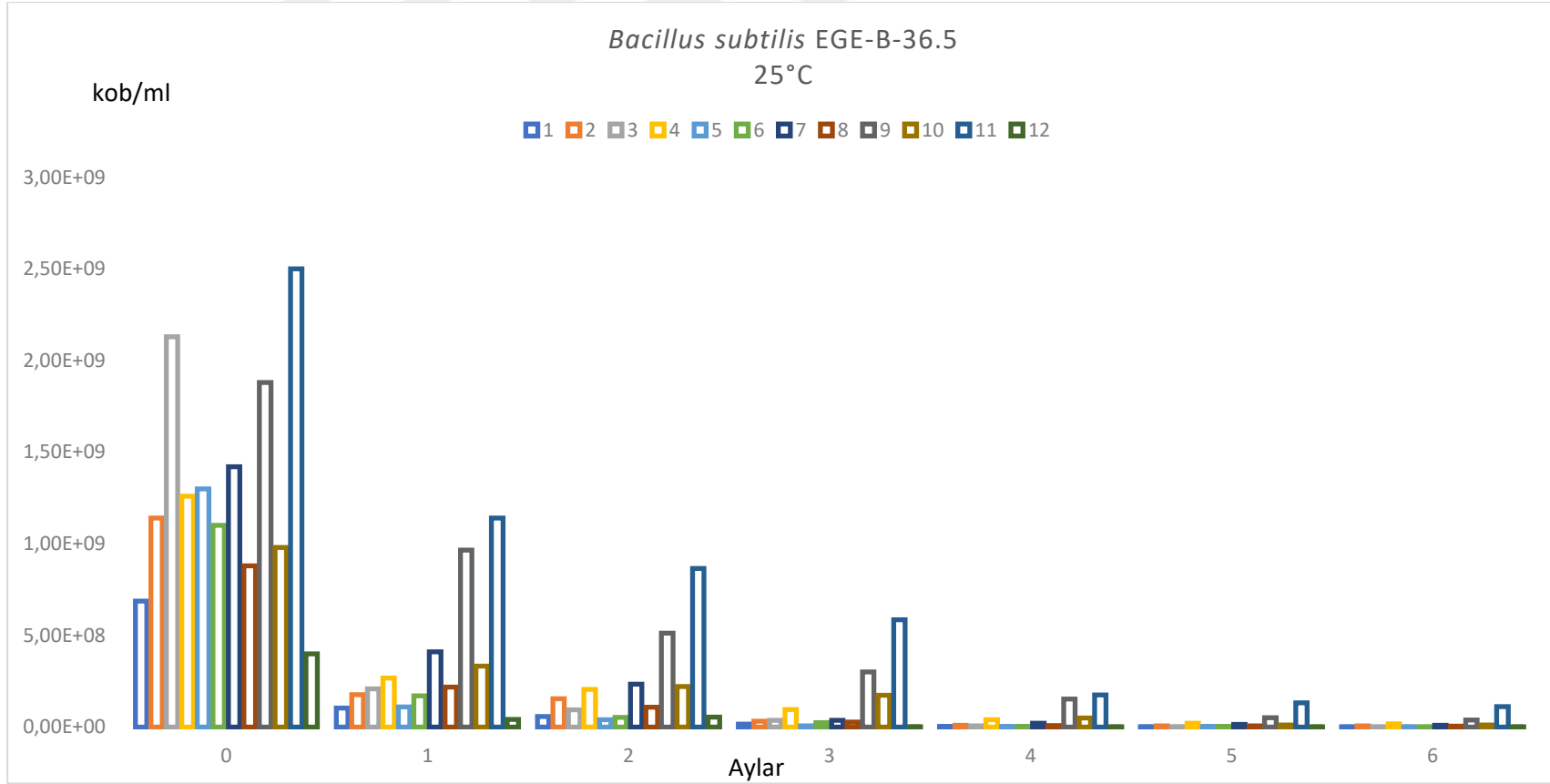
B. subtilis suşunun farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda hücre koruyucu içeren 3 nolu kültür ortamlarında 3.2.2.2’de anlatıldığı şekilde inkübasyonu tamamlandıktan sonra dökme plaka yöntemi ile toplam canlı hücre sayıları (kob/ml) belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 4.2 ve 4.3’te 0. ay olarak belirtilmiştir. Dökme plaka işleminden hemen sonra *B. subtilis* suşunun sıvı formülasyonlarını oluşturmak için son adım olan steril edilmiş adjuvan ve yüzey aktif maddesi farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda (Tablo 4.2 ve 4.3) hücre koruyucu içeren her bir kültür ortamına eklenmiştir. Ksantan zankı ve Tween 20’nin miktarları literatürde en iyi sonuçları veren değerler göz önüne alınarak eklenmiştir (Biradar and Santhosh, 2018).

Oluşturulan on bir farklı sıvı formülasyon ve kontrol (herhangi bir katkı maddesi içermez) 100 ml’lik steril amber şişelere konularak oda sıcaklığında (25°C) ve 4°C’de ışık almayan dolaplarda muhafaza edilmiştir. *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayılarındaki değişim aylık olarak yapılan dökme plaka yöntemi ile altı aya kadar takip edilmiştir. 25 °C’de muhafaza edilen sıvı formülasyonlardaki *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişim Tablo 4.2’de; 4°C’de muhafaza edilen sıvı formülasyonlardaki *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişim Tablo 4.3’te belirtilmiştir.

Tablo 4.2 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *B. subtilis* EGE-B-36.5 formülasyonlarının +25°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Formülasyon nosu	Sıvı formülasyon içerikleri (Kültür ortamına ilave edilen katkı maddeleri)	0.ay	1. ay	2. ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
		Canlı hücre sayımları (kob/ml)						
1	%2,49 PVP, %1,01 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	6,9x10 ⁸ a*	1,0x10 ⁸ ab	5,8x10 ⁷ b	1,7x10 ⁷ bc	3,7x10 ⁶ c	2,2x10 ⁶ c	1,6x10 ⁶ c
2	%2,49 PVP, %2,49 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,1x10 ⁹ a	1,8x10 ⁸ b	1,6x10 ⁸ b	3,1x10 ⁷ c	9,9x10 ⁶ d	7,2x10 ⁶ d	6,7x10 ⁶ d
3	%1,01 PVP, %2,49 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,1x10 ⁹ a	2,0x10 ⁸ b	9,3x10 ⁷ b	3,8x10 ⁷ c	6,0x10 ⁶ d	1,8x10 ⁶ e	1,5x10 ⁶ e
4	%1,75 PVP, %1,75 PEG, %0,50 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ⁹ a	2,7x10 ⁸ b	2,0x10 ⁸ bc	9,5x10 ⁷ c	4,0x10 ⁷ d	2,0x10 ⁷ de	1,9x10 ⁷ e
5	%1,01 PVP, %1,01 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,3x10 ⁹ a	1,1x10 ⁸ b	4,0x10 ⁷ c	6,0x10 ⁶ d	3,9x10 ⁶ e	2,8x10 ⁶ ef	2,3x10 ⁶ f
6	%1,75 PVP, %0,50 PEG, %1,75 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,1x10 ⁹ a	1,8x10 ⁸ b	5,2x10 ⁷ bc	2,3x10 ⁷ c	4,0x10 ⁶ d	3,0x10 ⁶ de	1,0x10 ⁶ e
7	%1,75 PVP, %1,75 PEG, %1,75 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,4x10 ⁹ a	4,1x10 ⁸ b	2,3x10 ⁸ b	3,7x10 ⁷ c	2,0x10 ⁷ cd	1,5x10 ⁷ d	1,0x10 ⁷ d
8	%0,50 PVP, %1,75 PEG, %1,75 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	8,9x10 ⁸ a	2,1x10 ⁸ b	1,0x10 ⁸ c	2,8x10 ⁷ d	7,8x10 ⁶ e	5,9x10 ⁶ ef	5,1x10 ⁶ f
9	%2,0 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,9x10 ⁹ a	9,7x10 ⁸ ab	5,1x10 ⁸ bc	3,0x10 ⁸ cd	1,5x10 ⁸ d	5,0x10 ⁷ e	3,9x10 ⁷ e
10	%2,00 PVP, %2,00 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	9,9x10 ⁸ a	3,3x10 ⁸ b	2,2x10 ⁸ bc	1,8x10 ⁸ c	4,9x10 ⁷ d	1,2x10 ⁷ e	1,0x10 ⁷ e
11	%2,00 PEG, %2,00 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,5x10 ⁹ a	1,1x10 ⁹ b	8,7x10 ⁸ bc	5,9x10 ⁸ c	1,8x10 ⁸ d	1,3x10 ⁸ d	1,1x10 ⁸ d
Kontrol	Kültür ortamı	4,0x10 ⁸ a	4,1x10 ⁷ b	5,4x10 ⁷ b	2,6x10 ⁶ c	9,2x10 ⁵ cd	8,5x10 ⁵ cd	6,2x10 ⁵ d

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez (p ≥ 0,05).

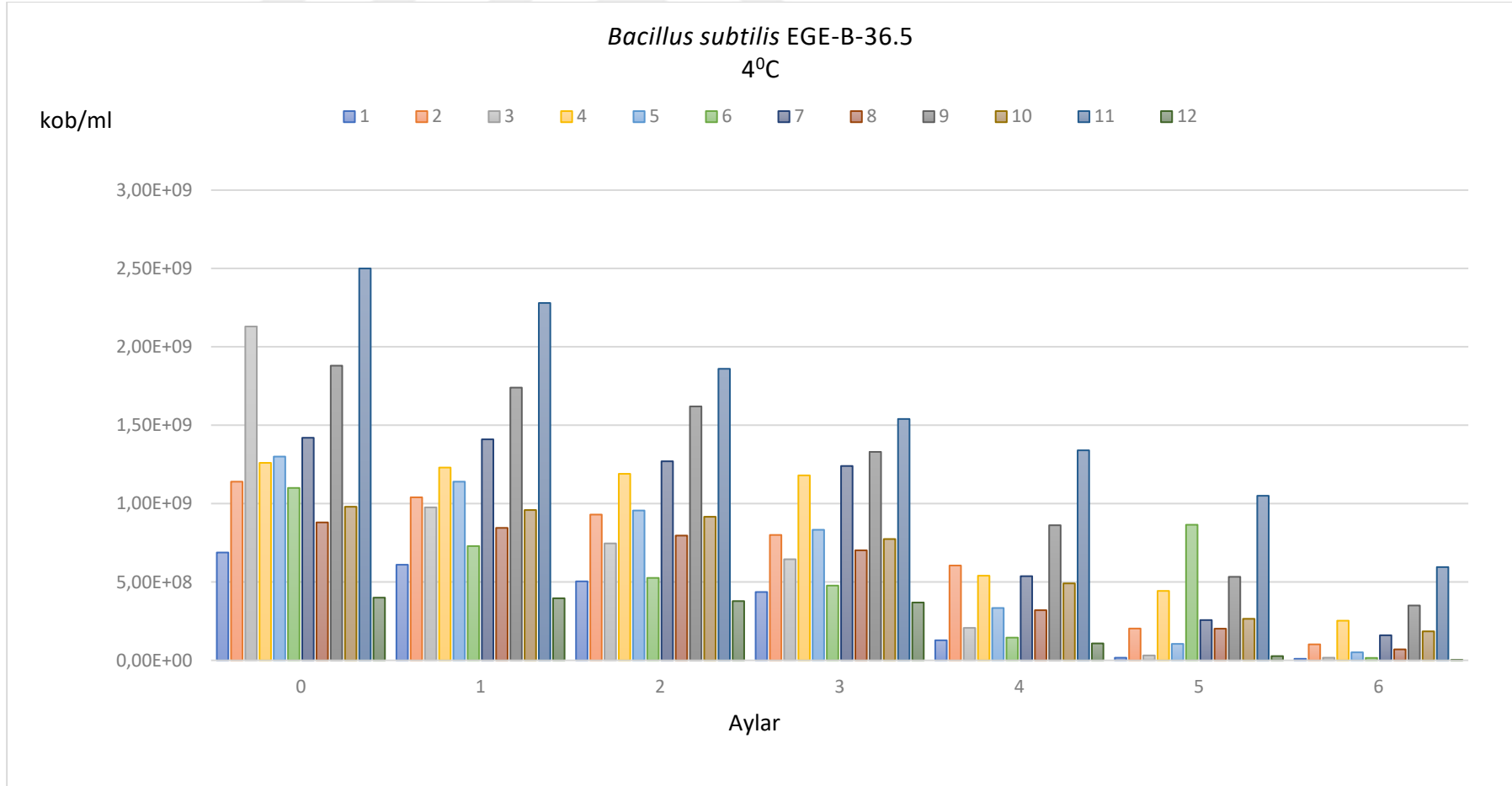


Şekil 4.4 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *B. subtilis* EGE-B-36.5 formülasyonlarının 25°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Tablo 4.3 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *B. subtilis* EGE-B-36.5 formülasyonlarının 4°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Formülasyon Nosu	Sıvı formülasyon içerikleri (Kültür ortamına ilave edilen katkı maddeleri)	0.ay	1. ay	2. ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
		Canlı hücre sayımları (kob/ml)						
1	%2,49 PVP, %1,01 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	6,9x10 ⁸ a*	6,1x10 ⁸ ab	5,0x10 ⁸ ab	4,3x10 ⁸ ab	1,2x10 ⁸ b	1,7x10 ⁷ c	1,0x10 ⁷ c
2	%2,49 PVP, %2,49 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,1x10 ⁹ a	1,0x10 ⁹ a	9,3x10 ⁸ a	8,0x10 ⁸ a	6,0x10 ⁸ a	2,0x10 ⁸ b	1,0x10 ⁸ b
3	%1,01 PVP, %2,49 PEG, %1,01 Gliserol+0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,1x10 ⁹ a	9,8x10 ⁸ ab	7,4x10 ⁸ b	6,4x10 ⁸ b	2,0x10 ⁸ c	3,1x10 ⁷ d	1,7x10 ⁷ d
4	%1,75 PVP, %1,75 PEG, %0,50 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ⁹ a	1,2x10 ⁹ a	1,2x10 ⁹ a	1,1x10 ⁹ a	5,4x10 ⁸ b	4,4x10 ⁸ b	2,5x10 ⁸ c
5	%1,01 PVP, %1,01 PEG, %1,01 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,3x10 ⁹ a	1,1x10 ⁹ ab	9,5x10 ⁸ bc	8,3x10 ⁸ c	3,3x10 ⁸ d	1,0x10 ⁸ e	5,1x10 ⁷ f
6	%1,75 PVP, %0,50 PEG, %1,75 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,1x10 ⁹ a	7,2x10 ⁸ ab	5,2x10 ⁸ b	4,8x10 ⁸ b	1,4x10 ⁸ c	8,7x10 ⁸ d	1,5x10 ⁷ e
7	%1,75 PVP, %1,75 PEG, %1,75 Gliserol+0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20;	1,4x10 ⁹ a	1,4x10 ⁹ a	1,2x10 ⁹ a	1,2x10 ⁹ a	5,3x10 ⁸ b	2,6x10 ⁸ c	1,7x10 ⁸ d
8	%0,50 PVP, %1,75 PEG, %1,75 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	8,9x10 ⁸ a	8,4x10 ⁸ a	7,9x10 ⁸ a	7,0x10 ⁸ a	3,2x10 ⁸ b	2,0x10 ⁸ b	7,0x10 ⁷ c
9	%2,0 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,9x10 ⁹ a	1,8x10 ⁹ a	1,7x10 ⁹ ab	1,3x10 ⁹ ab	8,7x10 ⁸ bc	5,3x10 ⁸ cd	3,5x10 ⁸ d
10	%2,00 PVP, %2,00 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	9,9x10 ⁸ a	9,6x10 ⁸ a	9,1x10 ⁸ a	7,8x10 ⁸ a	4,9x10 ⁸ ab	2,7x10 ⁸ bc	1,9x10 ⁸ c
11	%2,00 PEG, %2,00 Gliserol, 0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,5x10 ⁹ a	2,2x10 ⁹ ab	1,9x10 ⁹ bc	1,6x10 ⁹ cd	1,3x10 ⁹ d	1,0x10 ⁹ e	5,9x10 ⁸ f
Kontrol	Kültür ortamı	4,0x10 ⁸ a	3,9x10 ⁸ a	3,8x10 ⁸ a	3,7x10 ⁸ a	1,0x10 ⁸ b	2,8x10 ⁷ c	2,9x10 ⁶ d

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez (p ≥0,05).



Şekil 4.5 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *B. subtilis* EGE-B-36.5 formülasyonlarının 4 °C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Sıvı inokülantların raf ömürlerinin ve sahadaki performanslarının arttırılması için kullanılan inokülanta uygun katkı maddeleri kullanılarak formüle edilmesi gerekmektedir. Kullanılan katkı maddeleri yüksek su tutma kapasitesi, viskoz yapıları gibi özellikleri sayesinde inokülantların hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada; hem 25 °C’de hem de 4 °C’de muhafaza edilen *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile hazırlanan 11 farklı içerikli sıvı formülasyonun altıncı aydaki toplam canlı hücre sayıları SPSS paket programında varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak test edilmiştir. Sonuç olarak; her iki sıcaklık değerinde (25 °C, 4 °C) muhafaza edilen ve **%2 PEG, %2 gliserol, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 tween 20** içeriğine sahip **11 numaralı sıvı formülasyondaki** toplam canlı hücre sayısındaki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). 11 numaralı formülasyonda 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı $2,5 \times 10^9$ kob/ml olarak tespit edilmiştir. Diğer 10 adet farklı içeriğe sahip formülasyonlar ve kontrol ile karşılaştırıldığında 11 numaralı formülasyonun 0. aydaki toplam canlı hücre sayısının en yüksek toplam canlı hücre sayısı olduğu görülmektedir. Bu nedenle hücre koruyucu olarak kullanılan %2 oranında PEG ve gliserolün *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşunun toplam canlı hücre sayısının maksimuma ulaşması için en uygun hücre koruyucular olduğu tespit edilmiştir. Kontrolün 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı 4×10^8 kob/ml’dir ve bu değer 11 farklı içerikli sıvı formülasyonun 0. aydaki toplam canlı hücre sayıları ile karşılaştırıldığında en düşük toplam canlılık sayısı olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olan inkübasyondan önce kültür ortamının içine eklenen hücre koruyucuların *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı üzerine olan pozitif etkisi net bir şekilde görülmektedir.

25 °C’de muhafaza edilen 11 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda en yüksek toplam canlı hücre sayısı ($1,1 \times 10^8$ kob/ml) elde edilirken; kontrolün altıncı ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $6,2 \times 10^5$ kob/ml olarak bulunmuştur. 4 °C’de muhafaza edilen 11 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda en yüksek toplam canlı hücre sayısı ($5,9 \times 10^8$ kob/ml) elde edilirken; kontrolün altıncı ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $2,9 \times 10^6$ kob/ml olarak bulunmuştur. Bu değerler göz önüne alındığında sıcaklık değerinin sıvı inokülantın raf ömrü ile ters orantı içerisinde olduğu görülmektedir. Sıvı formülasyonlar oluşturulurken oda

sıcaklığına yakın veya üzerinde bir değerinde muhafaza edilebileceği göz önüne alınmalıdır. Çünkü genellikle küçük işletmelerde yüksek maliyetler nedeniyle +4 °C'ye sahip depolar bulunmamakta ve bu nedenle sıvı inokulantlar üretildikten sonra çiftçilere ya da bayilere dağıtılmadan önce oda sıcaklığına yakın veya özellikle yaz aylarında oda sıcaklığın çok üzerinde bir sıcaklık değerinde muhafaza edilmektedir. Bu nedenle uygun formüle edilememiş sıvı inokulant formülasyonlarının içerisindeki suşların raf ömürleri ürün etiketinde belirtilen raf ömründen çok daha az olmaktadır. Bu durum üreticiye itibar kaybı tüketiciye ise tarladan/seradan istenilen verimi alamamasına neden olmaktadır. Bu çalışmada her iki sıcaklık değerinde (25 °C, 4°C) muhafaza edilen *B. subtilis* suşunun raf ömrünü arttırmak amacıyla hücre koruyucu olarak %2 oranında PEG ve gliserolün birlikte kullanılması gerektiği görülmüştür.

%2 gliserol, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 tween 20 içerikli 9 numaralı formülasyonda 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı $1,9 \times 10^9$ kob/ml'dir. 4°C'de muhafaza edilen 9 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayısı $3,5 \times 10^8$ kob/ml olarak; 25°C'de muhafaza edilen 9 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayısı $3,9 \times 10^7$ kob/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler göz önüne alındığında 9 numaralı sıvı formülasyonda altı ayın sonunda toplam canlı hücre sayısında değişiklik başlangıçtaki toplam canlı hücre sayısı ile kıyaslandığında farkın az olduğu görülmektedir.

Maliyet analizi yapıldığında gliserolün birim fiyatı PEG'in birim fiyatı ile kıyaslanamayacak kadar düşüktür. Bu nedenle büyük ölçekteki üretim maliyetlerini en aza indirmek amacıyla *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyon oluşturmak için hücre koruyucu olarak sadece gliserolün %2 oranında kullanılmasının daha ekonomik olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.4'de çeşitli çalışmalarda farklı *Bacillus* suşları ile sıvı formülasyon hazırlamak için kullanılan katkı maddeleri ve bu sıvı formülasyonların raf ömürleri belirtilmiştir.

Tablo 4.4 Çeşitli çalışmalarda *Bacillus* suşları ile hazırlanan sıvı formülasyonların saklama koşulları ve raf ömrü

Suş	Katkı maddesi	Raf ömrü	Referans
<i>Bacillus siamensis</i> SCFB3-1	Karagenan	Belirtilmemiş	Pastor-Bueis et al., 2017
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Trehaloz	18 ay	Gopi et al., 2019
<i>Bacillus spp.</i>	PVP	Belirtilmemiş	Dayamani and BrahmaPrakash, 2014
<i>Bacillus megaterium</i> (BMPSB 01)	PVP, CMC, Tween 20	30 °C'de 16 ay	Leo Daniel et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i>	Trehaloz	18 ay	Gopi et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i> , Bbv 57	Gliserol	6 ay	Meena et al., 2015
<i>Bacillus subtilis</i> , EGE-B-36.5	PEG, gliserol, ksantan zamkı ve tween 20	4 °C'de ≥6 ay	Bu çalışmada
<i>Bacillus subtilis</i> , EGE-B-36.5	PEG, gliserol, ksantan zamkı ve tween 20	25 °C'de 6 ay	Bu alışmada

Meena ve arkadaşları *Bacillus subtilis*, Bbv 57 suşunu kullanarak farklı katkı maddelerinin raf ömrü üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. *Bacillus subtilis*, Bbv 57 suşu için en uzun raf ömrü gliserol (10 mM)'nin kullanıldığı sıvı formülasyon olarak belirlenmiştir (Meena et al., 2015). Çalışmamızda Meena ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşu için maliyet açısından da avantajlı olması nedeniyle hücre koruyucu olarak %2 gliserolün kullanılması önerilmektedir.

Gopi ve arkadaşları *Bacillus megaterium* suşu ile %2 gliserol, %2 PVP, 15mM trehaloz, %1 gliserol ve %1 PVP, %2 gliserol, %1 trehaloz, %1 yeast ekstrakt, %1 PVP ve %1 prolin katkı maddelerini ve kombinasyonlarını belirtilen miktarlarda kullanarak sıvı formülasyon oluşturmuşlar ve 18 ay boyunca takip etmişlerdir. On

sekiz ayın sonunda toplam canlı sayısındaki en az düşüş 15mM trehaloz ile yapılan sıvı formülasyonda bulunmuştur (Gopi et al., 2019). Gopi ve arkadaşları farklı bir denemede *Bacillus sporothermodurans* suşu ile %2 gliserol, %2 PVP, 15mM trehaloz, %1 gliserol ve %1 PVP, %2 gliserol, %1 trehaloz, %1 yeaast ekstrakt, %1 PVP ve %1 prolin katkı maddelerini ve kombinasyonlarını belirtilen miktarlarda kullanarak sıvı formülasyon oluşturmuşlar ve 18 ay boyunca takip etmişlerdir. On sekiz ayın sonunda toplam canlı hücre sayısındaki en az düşüşün 15mM trehaloz ile yapılan sıvı formülasyonda olduğunu bildirmişlerdir (Gopi et al., 2019). Trehaloz, hücrenin kurumaya, ozmotik basınca ve sıcaklık stresine karşı toleransını artırabilen bir disakkarittir. Trehalozun koruyucu etkisi, strese karşı koruma sağlayan metabolitlerin indüklenmiş sentezine bağlıdır (Gopi et al., 2019).

Trehaloz birim maliyeti yüksek bir hücre koruyucu çeşitidir. Ar-ge çalışmalarının endüstriyel üretime uyarlanması aşamasında dikkat edilmesi gereken konuların başında maliyet analizi gelmektedir. Trehalozun birim maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle çalışmamızda hücre koruyucu olarak trehaloz ile çalışılmamıştır.

Gopal ve Baby *Azospirillum* suşu ile farklı hücre koruyucuların kullanıldığı sıvı formülasyonlar geliştirmişlerdir. En yüksek *Azospirillum* popülasyonunun 270 günün sonunda trehaloz (15 mM) ve PVP (%2,5) kullanıldığı sıvı formülasyonda ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Gopal and Baby, 2017). *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile hazırlanan %2 PVP, %2 gliserol, % 0,3 ksantan zımkı ve % 0,5 tween 20 içeren 10 numaralı sıvı formülasyonda +4 °C'de başlangıçtaki hücre sayısı $9,9 \times 10^8$ kob/ml iken altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayısı $1,9 \times 10^8$ kob/ml olmuştur. Fakat 25 °C'de 10 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı 1×10^7 kob/ml'ye düşmüştür. Sıcaklık değerinin artması *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı azalttığı için %2 oranında PVP ve gliserol *B. subtilis* suşu için uygun hücre koruyucu kombinasyonu değildir.

Rouissi doktora tezinde *Sinorhizobium meliloti* suşu ile farklı formülasyonlar üzerinde çalışmalar yapmıştır. Sıvı formülasyonları oluştururken katkı maddeleri olarak sükröz, PVP, PEG, sodyum aljinat ve bu maddelerin kombinasyonlarını kullanmıştır. Formülasyonlarda sorbitol %1, 2, 5 w/v; sükröz %2, 3, 10 w/v; sodyum aljinat %0,2, 0,3, 0,5 w/v; polyvinyl pyrrolidone (PVP) %1, 2, 5 w/v ve

PEG %1, 2, 5 w/v miktarlarında ilave edilmiştir. Sonuç olarak *Sinorhizobium meliloti* suşu için en iyi hücre koruyucu sükroz olarak tespit edilmiştir. Sükrozu takiben sodium alginat, sorbitol, PEG ve PVP gelmektedir. *Sinorhizobium meliloti* suşu için en iyi sükroz konsantrasyonunun %10 w/v olduğu belirtilmiştir (Rouissi, 2012).

Kumaresan ve Reethave *Azospirillum brasilense* suşunda sıvı formülasyon oluşturmak için %2 PVP, 10 mM gliserol, %0,3 arap zımkı, 10 mM trehaloz, %1 PEG ve %0,5 PVA olmak üzere beş farklı katkı maddesini belirtilen miktarlarda kullanmışlardır. Trehaloz (10 mM) kullanıldığı sıvı formülasyonda toplam canlı hücre sayısı 0. Ayda $9,33 \times 10^{10}$ kob/ml iken 360 günün sonunda toplam canlı hücre sayısı $8,67 \times 10^7$ kob/ml'ye düşmüştür. PVA (%0,5)'nin kullanıldığı sıvı formülasyonda 360 günün sonunda toplam canlı hücre sayısındaki en büyük düşüş gözlemlenmiştir ($8,00 \times 10^4$ kob/ml). PEG (%1) ile oluşturulan sıvı formülasyonda 360 günün sonunda $6,33 \times 10^5$ kob/ml'ye kadar düşüş gerçekleşmiştir. *Azospirillum brasilense* suşu ile hazırlanan sıvı formülasyonlarda en iyi hücre koruyucunun trehaloz (10 mM) olduğu belirtilmiştir (Kumaresan and Reetha, 2011).

Literatürde çok sayıda *Bacillus* suşları kullanılarak hazırlanan sıvı formülasyon çalışmaları bulunmaktadır. *B. subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile hazırlanan sıvı formülasyonda en iyi hücre koruyucuların PEG ve gliserol olduğu bulunmuştur. Fakat yapılan çalışmalarda sıvı formülasyon oluşturmak için kullanılan katkı maddeleri ve miktarları farklılık göstermektedir. Özellikle hücre koruyucu olarak trehalozun kullanıldığı çalışmalarda kullanılan suşların raf ömrünün yüksek çıktığı belirtilmiştir. Fakat trehaloz hücre koruyucuları arasında birim maliyeti en yüksek olan hücre koruyucudur. Bu nedenle trehaloz kullanılarak hazırlanan sıvı formülasyonların ar-ge çalışmalarından büyük ölçeğe adaptasyonunda yüksek maliyet nedeniyle uygulanabilir olamayacağı düşünülmektedir.

4.2.3 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun asidik pH'larda sıvı formülasyonu

Çalışmada *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile asidik sıvı formülasyonlar oluşturularak raf ömürleri takip edilmiştir. Öncelikle *B. subtilis* suşu ile asidik sıvı formülasyon oluşturmak için kullanılacak olan asidin seçilmesi amacıyla laktik asit

(U.S. Patent No.2012015454, 2012), propiyonik asit (U.S. Patent No.2012015454, 2012), sitrik asit (U.S. Patent No.2012015454, 2012), borik asit (TR Patent No. 201613931, 2017) ve asetik asit (U.S. Patent No. 20110200572, 2011) kullanılarak formülasyon ön denemesi yapılmıştır. *B. subtilis* suşu 3.1.2.1’de içeriği belirtilen 3 nolu kültür ortamında inkübasyonunu tamamladıktan hemen sonra kültür sıvısının pH’ları laktik asit, propiyonik asit, sitrik asit ve asetik asit ile pH 3,0 pH 4,0 ve pH 5,0’e ayarlanmıştır. Ek olarak borik asit kullanılarak *B. subtilis* suşu içeren kültür ortamının pH’ı sadece pH 5,0’e ayarlanmıştır. Çünkü borik asitin zayıf asit grubunda yer alması nedeniyle kültür ortamının pH’ını pH 3,0 ve pH 4,0 gibi asidik değerlere çekmek için fazla miktarlarda kullanılması gerektiği görülmüştür. Bu nedenle borik asidin fazla miktarda kullanılmasının maliyet açısından uygun olmadığına karar verilmiştir.

Tablo 4.5 ve 4.6’da belirtildiği üzere farklı asitlerle hazırlanmış formülasyonlarda üç ay boyunca *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı ve formülasyonların pH’ı aylık olarak takip edilmiştir. Formülasyon ön denemesinden sonra *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişime göre asidik sıvı formülasyon oluşturmak için uygun olan asidin tespiti yapılmıştır.

Tablo 4.5’te belirtildiği üzere laktik asit kullanılarak kültür ortamının pH 3,0’e ayarlanması sonucunda üçüncü ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $3,22 \times 10^8$ kob/ml olmuştur. Başlangıçtaki toplam canlı hücre sayısı ($3,27 \times 10^8$ kob/ml) ile üçüncü ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı arasındaki farkın çok az olduğu görülmektedir. Fakat asidik sıvı formülasyon oluşturmak için laktik asidin uygun olmadığına karar verilmiştir. Çünkü diğer asitler kullanılarak oluşturulan asidik formülasyonlarda herhangi bir fungus üremesi gözlemlenmezken laktik asidin kullanıldığı sıvı formülasyonlarda birinci ayın sonunda fungus üremesi gözlemlenmiştir. Bu nedenle koruyucu olarak potasyum sorbat kullanılması gerektiğine karar verilmiştir. İlave olarak eklenecek olan potasyum sorbadın bir maliyeti olması nedeniyle asidik sıvı formülasyon oluşturmak için laktik asit kullanılmamıştır. Sitrik asit kullanılarak kültür ortamının pH 3,0’e ayarlanması sonucu üçüncü ayın sonunda diğer asitlere göre en yüksek toplam canlı hücre sayısı elde edilmiştir ($4,10 \times 10^8$ kob/ml). Fakat sitrik asit kullanılarak kültür ortamının pH 4,0’e ayarlanması sonucunda üçüncü aydaki toplam canlı hücre sayısında düşüş meydana gelmiştir. Bu nedenle sitrik asit kullanılarak kültür ortamının pH 4,0’e

ayarlanmasının *B. subtilis* suşu için uygun pH değeri olmadığına karar verilmiştir. Propiyonik asit kullanılarak kültür ortamının pH 3,0'e ayarlanması sonucu üçüncü ayın sonunda diğer asitlere göre en düşük toplam canlı hücre sayısı elde edilmiştir ($1,39 \times 10^8$ kob/ml). Bu nedenle *B. subtilis* suşu ile asidik sıvı formülasyon hazırlamak için propiyonik asidin uygun olmadığına karar verilmiştir.

Tablo 4.6'da belirtildiği üzere laktik asit, sitrik asit, propiyonik asit ve borik asit kullanılarak pH 3,0'e ayarlanan *B. subtilis* kültür ortamının pH değeri üçüncü ayın sonunda değişmezken, laktik asit ve sitrik asit kullanılarak pH 4,0'e ayarlanan *B. subtilis* kültür ortamının pH değeri üçüncü ayın sonunda 0. aydaki pH değerine göre artmış ve kültür ortamlarının değeri nötr pH değerine yaklaşmıştır. Asetik asit kullanılarak pH 5,0'e ayarlanan *B. subtilis* kültür ortamının pH değeri 0. ayda pH 5,06'ya ayarlanmasına rağmen bir ay sonra kültür ortamının pH değeri bazik pH değeri olan pH 8,16'ya çıkmıştır. İkinci ayın sonunda kültür ortamının pH değeri tekrar pH 5,06'ya düşmüş üçüncü ayın sonunda ise bazik pH değerine (pH 7,46) çıkmıştır. Tablo 4.5'te belirtildiği üzere asetik asidin birinci aydaki toplam canlı hücre sayısı $3,08 \times 10^8$ kob/ml iken üçüncü ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısının $1,55 \times 10^8$ kob/ml olduğu görülmektedir. Asetik asit ile pH 5,0'e ayarlanan kültür ortamının pH değişimi ve *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısının birbirleri ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde kültür ortamının pH değeri bazik pH değerlere çıktığında *B. subtilis* suşunun canlılık değeri azalmaktadır. pH 5,0'e ayarlanan asidik sıvı formülasyonların içerisindeki *B. subtilis* suşunun çoğaldığı ve bu nedenle kültür ortamının pH değerinin değiştiği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda *B. subtilis* suşunun hücre sayısının ikinci ayın sonunda birinci aya göre artmış olması *B. subtilis* suşunun çoğaldığını göstermektedir. Bu nedenle bir ay sonra kültür ortamındaki besin yetersizliği, ...vb. gibi nedenlerden dolayı hücre ölümleri meydana gelmiştir.

Tablo 4.5 Farklı asitler ile hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri(kob/ml)

Asidik sıvı formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri ($\times 10^8$ kob/ml)											
Ay	pH 3,0				pH 4,0				pH 5,0		Kontrol
	*L.A.	*P.A.	*S.A.	*A.A.	*L.A.	*P.A.	*S.A.	*A.A.	*B.A.	*A.A.	
0	3,27±0,030	2,83±0,430	3,91±0,089	3,2±1,100	3,82±0,325	2,30±0,355	3,05±0,405	3,40±0,095	1,48±0,220	4,05±0,045	2,48±0,066
1	2,30±0,931	1,21±0,210	1,30±0,126	1,74±0,172	1,67±0,780	1,86±0,886	1,54±0,301	2,53±1,423	1,40±0,254	3,08±0,407	1,74±0,234
2	2,08±0,542	1,58±0,601	2,19±0,597	1,86±0,528	2,22±0,050	2,96±0,467	1,57±0,053	3,16±0,049	1,77±0,742	3,40±0,885	3,36±1,209
3	3,22±1,986	1,39±0,141	4,10±1,257	1,98±0,590	2,45±0,316	1,83±0,518	1,58±1,14	2,15±1,116	1,63±0,395	1,55±0,410	2,02±0,770

*L.A.: Laktik Asit, *P.A.: Propiyonik Asit, *S.A.: Sitrik Asit, *B.A.: Borik Asit, *A.A.: Asetik Asit

Tablo 4.6 Farklı asitler ile hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık pH değişimleri

Asidik sıvı formülasyonların aylık pH değişimleri											
	pH 3,00				pH 4,00				pH 5,00		
Ay	*L.A.	*P.A.	*S.A.	*A.A.	*L.A.	*P.A.	*S.A.	*A.A.	*B.A.	*A.A.	Kontrol
0	2,97±0,045	3,00±0,045	3,03±0,068	3,06±0,050	4,06±0,052	3,96±0,036	4,04±0,056	4,00±0,011	4,74±0,250	5,06±0,105	8,61±0,053
1	2,87±0,032	2,96±0,049	2,93±0,051	2,91±0,043	4,05±0,112	3,89±0,020	4,10±0,161	3,90±0,017	4,67±0,276	8,16±0,195	6,92±0,035
2	3,59±0,040	3,00±0,045	3,03±0,068	3,06±0,050	4,60±0,110	3,96±0,036	4,04±0,056	4,00±0,011	4,74±0,250	5,06±0,105	7,50±0,063
3	3,05±0,010	2,97±0,030	3,05±0,005	2,96±0,040	6,43±0,141	3,95±0,017	6,49±0,295	3,96±0,021	4,74±0,290	7,46±0,338	7,51±0,181

*L.A.: Laktik Asit, *P.A.: Propiyonik Asit, *S.A.: Sitrik Asit, *B.A.: Borik Asit, *A.A.: Asetik Asit

Tablo 4.7’de belirtildiği üzere beş farklı asit kullanılarak oluşturulan formülasyon ön denemelerinde üçüncü ay toplam canlı hücre sayıları SPSS paket programında varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak test edilmiştir. Sitrik asit kullanılarak pH 3,0’e ayarlanan formülasyondaki toplam canlı hücre sayısındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu programın verdiği sonuçlara göre istatistiksel olarak toplam canlı hücre sayısındaki ikinci anlamlı değişimin ($p < 0.05$) asetik asit ile pH 5,0’e ayarlanan kültür ortamında olduğu görülmüştür.

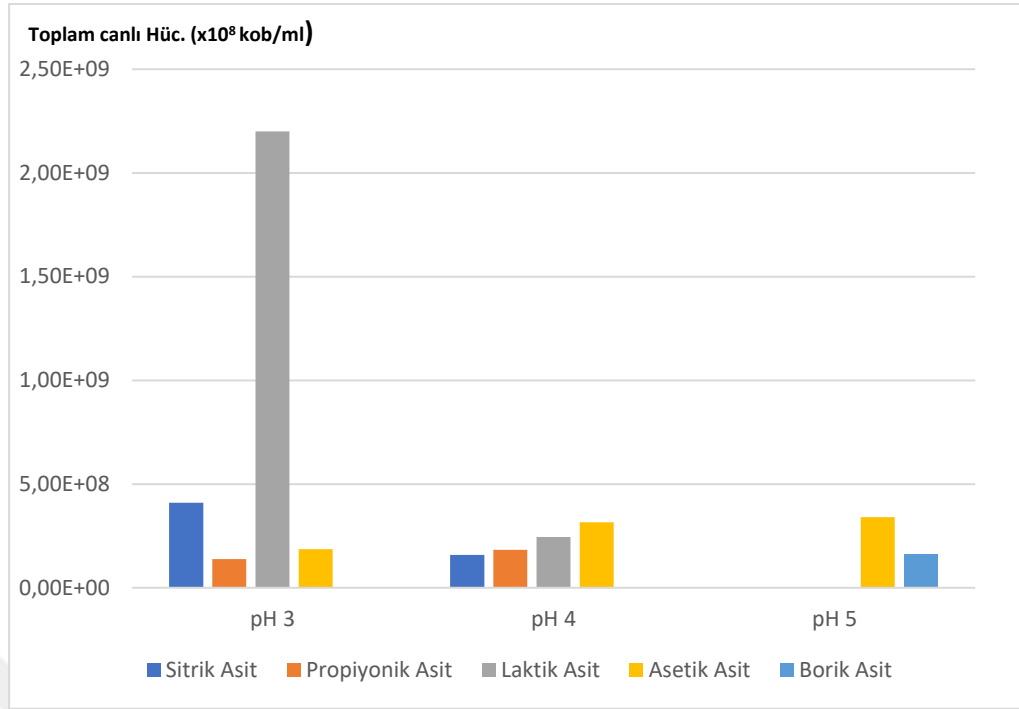
Ticari olarak büyük ölçekte yapılacak olan formülasyonlarda sitrik asitin birim maliyeti asetik asite göre çok daha fazladır. Bu nedenle asetik asitin uygun maliyetli bir asit olması nedeniyle *B. subtilis* suşu ile asidik formülasyon oluşturmak için çalışmanın devamına asetik asit ile devam edilmiştir.

Tablo 4.7 Farklı asitler ile hazırlanan formülasyonların üçüncü aylarındaki toplam canlı sayılarının (kob/ml) karşılaştırılması

Asitler	Üçüncü ay sonunda toplam canlı hücre sayısı ($\times 10^8$ kob/ml)		
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0
Sitrik Asit	4,10 \pm 1,25 ^{*a}	1,58 \pm 1,15 ^d	-
Propiyonik Asit	1,39 \pm 0,14 ^{cd}	1,83 \pm 0,51 ^{bcd}	-
Borik Asit	-	-	1,63 \pm 0,4 ^{bcd}
Laktik Asit	22 \pm 1,98 ^{abc}	2,45 \pm 0,32 ^{abcd}	
Asetik Asit	1,86 \pm 0,53 ^{bcd}	3,16 \pm 0,15 ^{ab}	3,40 \pm 0,88 ^{ab}
Kontrol	2,02 \pm 0,77 ^{abcd}		

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez ($p \geq 0,05$).

-: Asidik sıvı formülasyon hazırlanmamıştır.



Şekil 4.6 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun çeşitli organik asitler ile formülasyon ön deneme sonuçlarının sütun grafiği

Bacillus subtilis EGE-B-36.5 suşu 3.1.2.1’de içeriği belirtilen 3 nolu kültür ortamında inkübasyonunu tamamladıktan hemen sonra kültür sıvısının pH’ları formülasyon ön denemesi sonucunda karar verilen asetik asit ile pH 3,0, pH 4,0 ve pH 5,0’e ayarlanmıştır. Tablo 4.8 ve 4.9’da belirtildiği üzere on iki ay boyunca *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısı ve kültür ortamlarının pH’ı aylık olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8’de belirtildiği gibi asetik asit kullanılarak kültür ortamının pH’ının pH 4,0’e ayarlanması sonucunda *B. subtilis* suşunun on iki ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $1,39 \times 10^8$ kob/ml olarak bulunurken; kültür ortamının pH’ının pH 3,0’e ayarlanması sonucunda *B. subtilis* suşunun on iki ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $0,64 \times 10^8$ kob/ml; kültür ortamının pH’ının pH 5,0’e ayarlanması sonucunda *B. subtilis* suşunun on iki ayın sonundaki toplam canlı hücre sayısı $0,20 \times 10^8$ kob/ml olarak bulunmuştur. *B. subtilis* suşu ile oluşturulan asidik sıvı formülasyonda pH 5,0’in uygun bir pH değeri olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.8 Asetik asit kullanılarak hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri (kob/ml)

Asetik asitle hazırlanmış formülasyonların aylık toplam canlı hücre sayısı değişimleri ($\times 10^8$ kob/ml)				
Ay	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	Kontrol
0	3,2 \pm 1,100 *a	3,40 \pm 0,095 a	4,05 \pm 0,045 a	2,48 \pm 0,066 a
1	1,74 \pm 0,172 ab	2,53 \pm 1,423 ab	3,08 \pm 0,407 ab	1,74 \pm 0,234 ab
2	1,86 \pm 0,528 abc	3,16 \pm 0,049 abc	3,40 \pm 0,885 ab	3,36 \pm 1,209 ab
3	1,98 \pm 0,590 abc	2,15 \pm 1,166 abc	1,55 \pm 0,410 abc	2,02 \pm 0,770 ab
4	1,57 \pm 0,329 abc	2,45 \pm 0,517 abc	1,91 \pm 0,245 abc	1,97 \pm 0,682 abc
5	1,76 \pm 0,102 bcd	2,19 \pm 0,170 abc	1,89 \pm 0,115 abc	1,85 \pm 0,146 abc
6	1,54 \pm 0,060 bcd	2,14 \pm 0,160 abc	1,77 \pm 0,204 abc	1,84 \pm 0,446 abc
7	1,45 \pm 0,167 bcde	2,12 \pm 0,104 abc	1,51 \pm 0,264 bc	1,87 \pm 0,111 abc
8	1,01 \pm 0,115 cdef	1,80 \pm 0,182 abc	1,12 \pm 0,097 cd	1,62 \pm 0,226 abc
9	0,92 \pm 0,196 def	1,71 \pm 0,214 abc	0,79 \pm 0,130 cd	1,38 \pm 0,171 bc
10	0,83 \pm 0,166 ef	1,51 \pm 0,135 bc	0,50 \pm 0,166 de	0,88 \pm 0,208 cd
11	0,82 \pm 0,242 ef	1,36 \pm 0,080 c	0,30 \pm 0,248 e	0,51 \pm 0,140 d
12	0,64 \pm 0,127 f	1,39 \pm 0,074 c	0,20 \pm 0,091 e	0,47 \pm 0,147 d

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez ($p \geq 0,05$).

B. subtilis suşunun kültür ortamında asetik asit kullanılarak pH değimi ile elde edilen sıvı formülasyonların 12. aydaki toplam canlı hücre verileri SPSS paket programında varyans analizi (ANOVA, Tukey post hoc) ile istatistiksel olarak birbiri aralarında test edilmiştir. Sonuç olarak on ikinci ayın sonunda *B. subtilis* suşunda asetik asit ile pH 4,0'e ayarlanan sıvı formülasyonda toplam canlı hücre sayısındaki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir farka sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.9 Asetik asit kullanılarak hazırlanan asidik sıvı formülasyonların aylık pH değişimleri

Asetik asitle hazırlanmış formülasyonların aylık pH değişimleri				
Ay	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	Kontrol
0	3,06±0,050	4,00±0,011	5,06±0,105	8,61±0,053
1	2,91±0,043	3,90±0,017	8,16±0,195	6,92±0,035
2	3,06±0,050	4,00±0,011	5,06±0,105	7,50±0,063
3	2,96±0,040	3,96±0,021	7,46±0,338	7,51±0,181
4	3,02±0,020	4,06±0,026	7,63±0,263	7,49±0,066
5	3,02±0,011	4,02±0,010	7,62±0,231	7,50±0,064
6	3,03±0,021	3,99±0,010	7,65±0,254	7,53±0,026
7	3,04±0,015	4,00±0,011	7,72±0,162	7,55±0,030
8	3,09±0,015	3,98±0,015	7,82±0,182	7,59±0,043
9	3,10±0,010	3,98±0,021	7,84±0,154	7,71±0,078
10	3,13±0,025	4,00±0,020	7,78±0,381	7,79±0,147
11	3,15±0,030	3,99±0,025	7,84±0,419	7,85±0,133
12	3,15±0,038	3,97±0,030	7,88±0,389	7,93±0,283

Reuter US 2011/0100094 A1 patentinde asetik asit yardımı ile kültür sıvısının pH'ının düşürülmesi sonucunda *Bacillus* sporlarının büyümesinin engellendiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda kültür ortamı düşük bir pH değerine sabitlendiği için istenmeyen mikroorganizmaların üremesinin de önüne geçildiği gözlemlenmiştir (U.S. Patent No. 20110200572, 2011).

Tablo 4.9'da belirtildiği üzere asetik asit ile pH 4'e ve pH 3'e ayarlanan kültür ortamlarında pH değişikliği stabil kalmıştır. Fakat pH'ı 3'e ayarlanan kültür ortamı içerisinde *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısında düşüş meydana

gelmiştir. *B. subtilis* suşu için asidik bir pH değeri olan pH 3'ün sıvı formülasyon hazırlamak için uygun bir pH değeri olmadığına karar verilmiştir. Tablo 4.9'da bulunan sonuçlara göre pH 5'e ayarlanan kültür ortamı içerisinde *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun büyüme gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle kültür ortamının pH değerinde sürekli artış meydana gelmiştir. *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun toplam canlı hücre sayısının artması ile bir süre sonra ortamdaki besin yetersizliğinden dolayı ölümler gerçekleşmiştir. Kontrolün on iki ay sonunda toplam canlı hücre sayısı $0,47 \times 10^8$ kob/ml iken asetik asit kullanılarak kültür ortamının pH'ının pH 5'e ayarlanması ile oluşturulan sıvı formülasyonun on iki ayın sonunda toplam canlı hücre sayısı $0,20 \times 10^8$ kob/ml olarak bulunmuştur.

Vehapi ve Özçimen yapmış oldukları çalışmada *B. subtilis* suşunun büyümesi için Luria-Bertani Broth (LB) ortamının pH değerini pH 3, pH 5 ve pH 7'ye ayarlamışlardır. *B. subtilis* suşunun büyümesi için gerekli diğer koşullar sağlandıktan sonra *B. subtilis* suşunun spesifik büyüme hızının pH 7'e ayarlanan kültür ortamında pH 3'e ayarlanan kültür ortamına göre yedi kat daha fazla olduğu pH 5'e ayarlanan kültür ortamına ise hemen hemen eşit olduğunu bulmuşlardır (Vehapi and Özçimen, 2020). Formülasyonların temel görevi kullanılacak olan suşun toplam canlı hücre sayısını sabit tutmaktır. Eğer kullanılan formülasyon içeriği suşun büyümesine olanak sağlıyorsa bir süre sonra ortamdaki besin yetersizliği, vb. gibi nedenlerden dolayı suşun ölümüne de neden olacaktır. Bu nedenle *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile asidik formülasyon oluşturmak için kültür ortamının pH'5 ayarlanması uygun değildir.

4.3 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d Suşu ile Sıvı Formülasyonların Hazırlanması

4.3.1 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun üretim ortamına çeşitli hücre koruyucuların eklenmesi

Çalışmamızda sıvı PGPR formülasyonları oluşturmak amacıyla en çok kullanılan hücre koruyucuları arasından PVP, PEG ve gliserol literatür taraması sonucunda seçilmiştir (Lobo et al., 2019). Seçilen faktörlerin raf ömrü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum değerlerinin belirlenmesi için RSM uygulanmıştır.

Design-Expert 7.0.0 programı kullanılarak belirlenen üç faktör ile seçilen aralıklarda çalışabilmek için “face center” opsiyonu seçilerek merkezde 6 tekrarı içeren merkezi kompozit tasarımı işlemi yapılmıştır (Şekil 4.6).

Şekil 4.7’de tasarımdaki farklı deney setlerine (runs) ait her bir yanıt belirtilmiştir. PVP faktör 1; PEG faktör 2 ve gliserol faktör 3 olarak belirtilmiştir. Bu aşamadan sonra RSM’de elde edilen deneme deseni ile deneyler 20 farklı kombinasyonda üretim ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu üretim ortamları, en yüksek biyokütle miktarının elde edildiği King’s B broth ortamına hücre koruyucuların şekil 4.7’de belirtilen farklı deney setlerindeki miktarları eklenerek hazırlanmıştır. *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu hazırlanan King’s B broth ortamlarına inoküle edildikten sonra uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan hemen sonra hücre koruyucularını içeren her bir üretim ortamı (her biri farklı bir formülasyon olarak kabul edilmektedir) için dökme plaka yöntemi ile belirlenen toplam canlı hücre sayılarının (kob/ml) logaritması deney tasarımında yanıt 1 olarak belirtilmiştir. Dokuz ay süreyle aylık toplam canlı hücre sayıları takip edilen sıvı formülasyonların dokuzuncu aydaki toplam canlı hücre sayılarının (kob/ml) logaritması ise Yanıt 2 olarak belirtilmiştir.

Run	Block	Factor 1 A:PVP g/ml	Factor 2 B:PEG g/ml	Factor 3 C:Glycerol g/ml	Response 1 Can. Hüc. Say. CFU/ML	Response 2 Canlı Hücre 9.4 CFU/ml
1	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.61278	8
2	Block 1	0.41	1.59	3.99	9.59106	6
3	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.56229	8
4	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.76343	8
5	Block 1	1.59	1.59	3.99	9.5966	7
6	Block 1	1.59	0.41	1.01	9.20412	5
7	Block 1	1.59	0.41	3.99	9.49136	5
8	Block 1	0.41	1.59	1.01	9.63347	3
9	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.04139	8
10	Block 1	0.41	0.41	3.99	9.43933	3
11	Block 1	2.00	1.00	2.50	9.32222	7
12	Block 1	1.00	0.00	2.50	9.11059	4
13	Block 1	1.00	2.00	2.50	7.34242	7
14	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.07918	8
15	Block 1	1.00	1.00	5.00	9.01703	6
16	Block 1	0.41	0.41	1.01	9.13672	3
17	Block 1	0.00	1.00	2.50	9.49136	6
18	Block 1	1.00	1.00	2.50	9.49136	8
19	Block 1	1.59	1.59	1.01	9.36173	5
20	Block 1	1.00	1.00	0.00	9.04139	2

Şekil 4.7 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtların logaritmik değerleri

Üç faktör ile yapılan ANOVA sonuçları ise Şekil 4.8’de belirtilmiştir. RSM deneme deseni sonucunda elde edilen ve yanıt 1’i ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen model, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Şekil 4.8’de görülen modelde F değeri (0,78), denemeye ait modelin anlamlı olmadığını göstermektedir. Ayrıca 5,61 olan uyum eksikliği F değeri, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya göre büyük olduğunu, diğer bir değişle bu uyumsuzluğun anlamlı olduğunu göstermektedir. ANOVA testi sonuçlarına göre toplam canlı hücre sayısı üzerinde PVP, PEG ve gliserolün etkisinin *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu suşunun inkübasyonundan hemen sonra belirlen toplam canlı hücre sayısı üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.

Response	1	Can. Hüc. Say.				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2.03	9	0.23	0.78	0.6427	not significant
A-PVP	0.014	1	0.014	0.047	0.8331	
B-PEG	0.31	1	0.31	1.07	0.3252	
C-Glycerol	0.040	1	0.040	0.14	0.7177	
AB	0.019	1	0.019	0.064	0.8055	
AC	8.574E-003	1	8.574E-003	0.029	0.8671	
BC	0.020	1	0.020	0.068	0.7998	
A ²	0.19	1	0.19	0.66	0.4360	
B ²	1.31	1	1.31	4.52	0.0594	
C ²	4.782E-003	1	4.782E-003	0.016	0.9005	
Residual	2.91	10	0.29			
Lack of Fit	2.47	5	0.49	5.61	0.0407	significant
Pure Error	0.44	5	0.088			
Cor Total	4.94	19				

The "Model F-value" of 0.78 implies the model is not significant relative to the noise. There is a 64.27 % chance that a "Model F-value" this large could occur due to noise.

Şekil 4.8 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun biyokütle üretimindeki canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.

Şekil 4.9’da belirtilen RSM deneme deseni sonucunda elde edilen ve yanıt 2’yi ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen model, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Şekil 4.9’da görülen modelde F değeri (33,51), denemeye ait modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 108,59 olan uyum eksikliği F değeri, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya göre küçük olduğunu ve bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir.

Response	2	Canlı Hücre 9.Ay				
ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	72.82	7	10.40	33.51	< 0.0001	significant
A-PVP	5.52	1	5.52	17.78	0.0012	
B-PEG	7.39	1	7.39	23.80	0.0004	
C-Glycerol	10.07	1	10.07	32.43	< 0.0001	
BC	3.13	1	3.13	10.06	0.0080	
A ²	6.01	1	6.01	19.35	0.0009	
B ²	14.39	1	14.39	46.34	< 0.0001	
C ²	33.72	1	33.72	108.59	< 0.0001	
Residual	3.73	12	0.31			
Lack of Fit	3.73	7	0.53			
Pure Error	0.000	5	0.000			
Cor Total	76.55	19				

The Model F-value of 33.51 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

Şekil 4.9 Kullanılan hücre koruyucu miktarlarının *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşunun dokuzuncu ayda elde edilen canlı hücre sayıları üzerine etkisine ait ANOVA değerleri.

4.3.2 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile hücre koruyucularının varlığında büyütülmesiyle elde edilen biyokütlenin sıvı formülasyonunda bazı yardımcı maddelerin etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada *Pseudomonas chlororaphis* 39-d ile sıvı formülasyonlar oluşturmak için hücre koruyucular (PVP, PEG, gliserol), adjuvan (ksantan zımkı) ve yüzey aktif maddesi (Tween 20) belirli bir sıra ile kültür ortamına eklenerek kullanılmıştır. Sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olarak 3.1.2.1'de içeriği belirtilen King's B broth ortamının içerisine şekil 4.7'de verilen RSM deneme desenine göre farklı deney setlerindeki hücre koruyucu içerikleri eklenmiştir. Kullanılacak olan RSM deney setlerinin seçiminde sıvı formülasyonların maksimum /minimum miktarlardaki hücre koruyucu içermesi, sıvı formülasyonlarda hücre koruyucuların

birlikte/ tek başına kullanılması ve literatür bilgisinden yararlanılmıştır. Daha sonra farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda hücre koruyucu içeren bu kültür ortamlarına *P. chlororaphis* suşu inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Tablo 4.12 ve 4.13'te belirtilen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 numaralı sıvı formülasyonları oluşturmak için kullanılan hücre koruyucuların miktarları ve kombinasyonları şekil 4.6'da belirtilen farklı deney setleri (runs)'nden elde edilmiştir.

1 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.6'da belirtilen deneme deseni 8, 2 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.6'da belirtilen deneme deseni 12, 3 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.6'da belirtilen deneme deseni 17, 4 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.6'da belirtilen deneme deseni 20, 7 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.6'da belirtilen deneme deseni 7, 8 nolu sıvı formülasyondaki hücre koruyucular Şekil 4.1'de belirtilen deneme deseni 10'e göre belirlenmiştir. 5, 6, 9, 10 ve 11 nolu sıvı formülasyonlar için ise literatürde en iyi sonuçları vermiş olan hücre koruyucular ve miktarları kullanılmıştır (Biradar and Santhosh, 2018; Selvaraj et al., 2014; Dayamani and Brahmaprakash, 2014).

P. chlororaphis suşunun farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda hücre koruyucu içeren King's B broth ortamlarında 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde inkübasyonu tamamlandıktan sonra dökme plaka yöntemi ile toplam canlı hücre sayıları (kob/ml) belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 4.10 ve 4.11'te 0. ay olarak belirtilmiştir. Dökme plaka işleminden hemen sonra *P. chlororaphis* suşunun sıvı formülasyonlarını oluşturmak için son adım olan steril edilmiş adjuvan ve yüzey aktif maddesi farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda (Tablo 4.10 ve 4.11) hücre koruyucu içeren her bir kültür ortamına eklenmiştir. Ksantan zamkı ve Tween 20'nin miktarları literatürde en iyi sonuçları veren değerler göz önüne alınarak eklenmiştir (Biradar and Santhosh, 2018).

Oluşturulan on bir farklı sıvı formülasyon ve kontrol (herhangi bir katkı maddesi içermez) 100 ml'lik steril amber şişelere konularak oda sıcaklığında (25°C) ve 4°C'de ışık almayan dolaplarda muhafaza edilmiştir. *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayılarındaki değişim aylık olarak yapılan dökme plaka

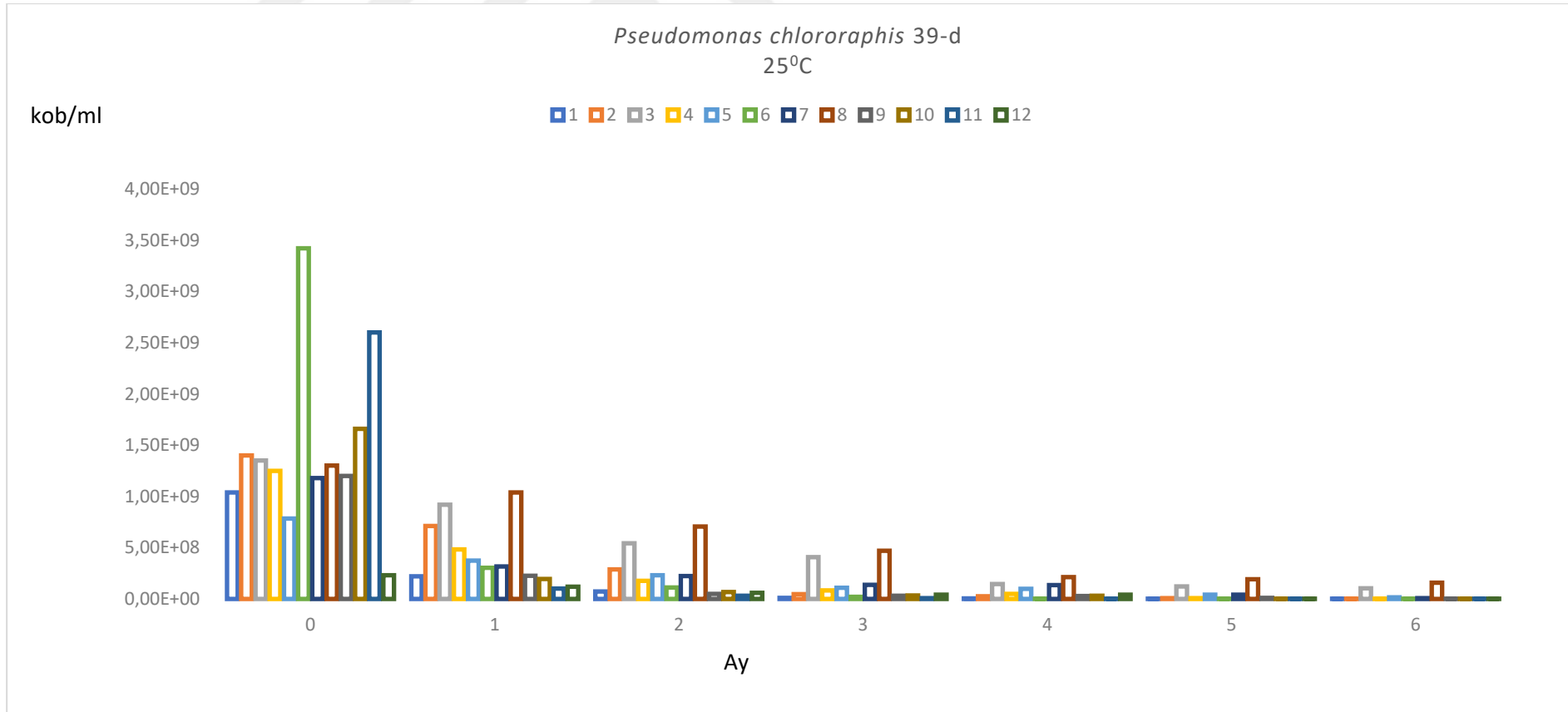
yöntemi ile altı aya kadar takip edilmiştir. 25 °C’de muhafaza edilen sıvı formülasyonlardaki *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişim Tablo 4.10’da; 4°C’de muhafaza edilen sıvı formülasyonlardaki *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişim Tablo 4.11’de belirtilmiştir.



Tablo 4.10 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *Pseudomonas chlororaphis* 39-d formülasyonlarının +25°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Formülasyon Nosu	Sıvı formülasyon içerikleri (Kültür ortamına ilave edilen katkı maddeleri)	0.ay	1. ay	2. ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
		Canlı hücre sayımları (kob/ml)						
1	%0,41 PVP, %1,59 PEG, %1,01 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,0x10 ^{9 a*}	2,2x10 ^{8 b}	7,3x10 ^{7 b}	1,0x10 ^{7 c}	5,8x10 ^{6 cd}	1,7x10 ^{6 de}	1,3x10 ^{6 e}
2	%1 PVP, %2,5 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,4x10 ^{9 a}	7,1x10 ^{8 ab}	2,9x10 ^{8 bc}	4,7x10 ^{7 cd}	2,7x10 ^{7 de}	7,4x10 ^{6 de}	3,6x10 ^{6 e}
3	%1 PEG, %2,50 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,3x10 ^{9 a}	9,2x10 ^{8 ab}	5,4x10 ^{8 ab}	4,0x10 ^{8 bc}	1,4x10 ^{8 cd}	1,2x10 ^{8 d}	1,0x10 ^{8 d}
4	%1 PVP+%1 PEG, 0,3% Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ^{9 a}	4,9x10 ^{8 ab}	1,8x10 ^{8 bc}	8,4x10 ^{7 c}	4,9x10 ^{7 cd}	8,4x10 ^{6 de}	3,1x10 ^{6 e}
5	%2 PVP, %2 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	7,9x10 ^{8 a}	3,8x10 ^{8 ab}	2,3x10 ^{8 ab}	1,1x10 ^{8 bc}	9,9x10 ^{7 bc}	4,2x10 ^{7 cd}	1,6x10 ^{7 d}
6	%0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	3,4x10 ^{9 a}	3,0x10 ^{8 ab}	1,1x10 ^{8 b}	2,1x10 ^{7 bc}	1,4x10 ^{6 cd}	1,3x10 ^{6 cd}	6,7x10 ^{5 d}
7	%1,59 PVP, %0,41 PEG, %3,99 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,1x10 ^{9 a}	3,1x10 ^{8 ab}	2,2x10 ^{8 b}	1,4x10 ^{8 bc}	1,3x10 ^{8 bc}	4,1x10 ^{7 cd}	9,0x10 ^{6 d}
8	%0,41 PVP, %0,41 PEG, %3,99 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,3x10 ^{9 a}	1,0x10 ^{9 ab}	7,0x10 ^{8 ab}	4,7x10 ^{8 bc}	2,1x10 ^{8 cd}	1,9x10 ^{8 cd}	1,6x10 ^{8 d}
9	%2 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ^{9 a}	2,2x10 ^{8 ab}	5,0x10 ^{7 abc}	3,2x10 ^{7 bc}	3,0x10 ^{7 bc}	1,1x10 ^{7 c}	2,7x10 ^{6 c}
10	%1 PEG, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,7x10 ^{9 a}	1,9x10 ^{8 ab}	6,7x10 ^{7 abc}	3,3x10 ^{7 bcd}	3,2x10 ^{7 bcd}	2,7x10 ^{6 cd}	6,5x10 ^{5 d}
11	%2 PVP, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,6x10 ^{9 a}	1,0x10 ^{8 b}	3,1x10 ^{7 bc}	7,8x10 ^{6 cd}	3,2x10 ^{6 d}	1,4x10 ^{6 de}	3,01x10 ^{5 e}
Kontrol	Kültür Ortamı	2,3x10 ^{8 a}	1,2x10 ^{8 ab}	6,1x10 ^{7 bc}	4,3x10 ^{7 c}	4,1x10 ^{7 c}	2,6x10 ^{6 d}	2,0x10 ^{5 e}

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez (p ≥0,05).

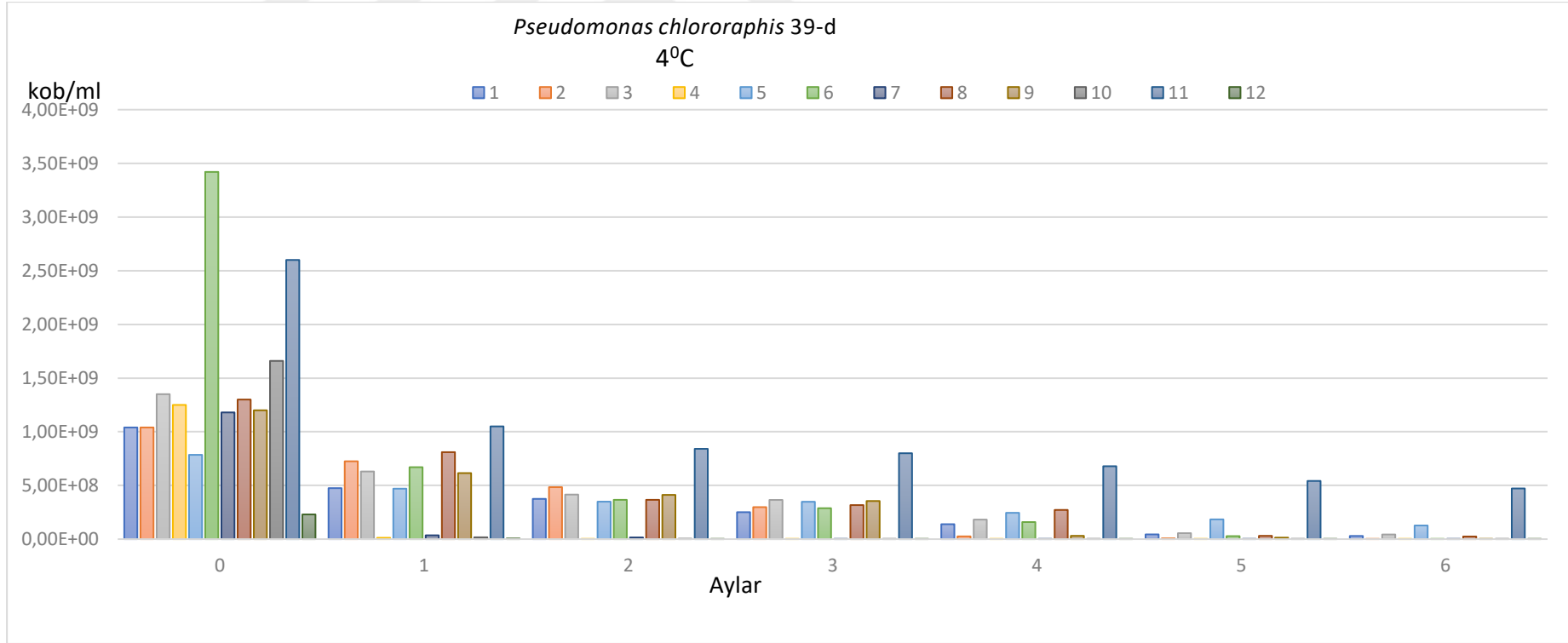


Şekil 4.10 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *P. chlororaphis* 39-d formülasyonlarının 25 °C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Tablo 4.11 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *Pseudomonas chlororaphis* 39-d formülasyonlarının 4°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

Formülasyon Nosu	Sıvı formülasyon içerikleri (Kültür ortamına ilave edilen katkı maddeleri)	0.ay	1. ay	2. ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
		Canlı hücre sayımları (kob/ml)						
1	%0,41 PVP, %1,59 PEG, %1,01 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,0x10 ^{9 a*}	4,8x10 ^{8 ab}	3,8x10 ^{8 abc}	2,5x10 ^{8 abc}	1,4x10 ^{8 abc}	4,4x10 ^{7 bc}	3,0x10 ^{7 c}
2	%1 PVP, %2,5 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,0x10 ^{9 a}	7,3x10 ^{8 a}	4,9x10 ^{8 ab}	3,0x10 ^{8 abc}	2,6x10 ^{7 bcd}	7,0x10 ^{6 cd}	2,3x10 ^{6 d}
3	%1 PEG, %2,50 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,4x10 ^{9 a}	6,3x10 ^{8 ab}	4,2x10 ^{8 ab}	3,7x10 ^{8 ab}	1,9x10 ^{8 ab}	5,6x10 ^{7 b}	4,3x10 ^{7 b}
4	%1 PVP, %1 PEG, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ^{9 a}	1,2x10 ^{7 ab}	2,2x10 ^{6 b}	1,7x10 ^{6 b}	1,5x10 ^{6 b}	1,3x10 ^{5 b}	1,1x10 ^{5 b}
5	%2 PVP, %2 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	7,9x10 ^{8 a*}	4,7x10 ^{8 a}	3,5x10 ^{8 a}	3,5x10 ^{8 a}	2,5x10 ^{8 a}	1,9x10 ^{8 a}	1,3x10 ^{8 a}
6	%0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	3,4x10 ^{9 a}	6,7x10 ^{8 ab}	3,7x10 ^{8 ab}	2,9x10 ^{8 ab}	1,6x10 ^{8 abc}	2,8x10 ^{7 bc}	1,6x10 ^{6 c}
7	%1,59 PVP, %0,41 PEG, %3,99 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ^{9 a}	3,5x10 ^{7 b}	1,6x10 ^{7 bc}	2,1x10 ^{6 bcd}	3,6x10 ^{5 cde}	1,7x10 ^{5 de}	5,1x10 ^{4 e}
8	%0,41 PVP, %0,41 PEG, %3,99 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,3x10 ^{9 a}	8,1x10 ^{8 a}	3,7x10 ^{8 ab}	3,2x10 ^{8 ab}	2,7x10 ^{8 ab}	3,1x10 ^{7 b}	2,5x10 ^{7 b}
9	%2 Gliserol, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,2x10 ^{9 a}	6,2x10 ^{8 a}	4,1x10 ^{8 a}	3,6x10 ^{8 a}	3,1x10 ^{7 a}	1,4x10 ^{7 a}	2,8x10 ^{6 a}
10	%1 PEG, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	1,7x10 ^{9 a}	1,7x10 ^{7 b}	3,4x10 ^{6 bc}	2,1x10 ^{6 c}	7,3x10 ^{5 cd}	2,7x10 ^{5 d}	2,1x10 ^{4 e}
11	%2 PVP, %0,3 Ksantan zamkı, %0,5 Tween 20	2,6x10 ^{9 a}	1,1x10 ^{9 b}	8,4x10 ^{8 bc}	8,0x10 ^{8 bc}	6,8x10 ^{8 bcd}	5,4x10 ^{8 cd}	4,7x10 ^{8 d}
Kontrol	Kültür ortamı	2,3x10 ⁸	5,9x10 ⁶	2,8x10 ⁵	2,0x10 ⁵	3,5x10 ⁴	1,9x10 ⁴	5,9x10 ³

* Aynı harflerin takip ettiği bir sütundaki rakamlar önemli ölçüde farklılık göstermez (p ≥0,05).



Şekil 4.11 Kültür ortamına farklı kombinasyonlarda ilave edilen katkı maddeleri ile hazırlanmış *P. chlororaphis* 39-d formülasyonlarının 4°C'de aylık canlı hücre sayımları (kob/ml)

P. chlororaphis suşu kullanılarak hazırlanan her bir sıvı formülasyonun altıncı ay verileri SPSS paket programında varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak test edilmiştir. Sıvı formülasyonların ve kontrolün muhafaza edildiği her iki sıcaklık değerinde (25 °C ve 4 °C) altıncı ayın sonunda *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısında en az değişim gözlenen sıvı formülasyonlar istatistiki verilere göre tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; 25 °C'de muhafaza edilen ve **% 0,41 PVP, % 0,41 PEG, %3,99 gliserol, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 tween 20** içeriğine sahip **8 numaralı sıvı formülasyondaki** toplam canlı hücre sayısındaki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Hücre koruyucu olarak sadece %1 PEG içeren 10 numaralı sıvı formülasyonda ($1,7 \times 10^9$ kob/ml) ve sadece hücre koruyucu olarak %2 PVP içeren 11 numaralı sıvı formülasyonda ($2,6 \times 10^9$ kob/ml) 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı 8 numaralı sıvı formülasyondaki 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı ($1,3 \times 10^9$ kob/ml) ile karşılaştırıldığında 10 ve 11 numaralı sıvı formülasyonların 0. aydaki toplam canlı hücre sayısının daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat altıncı ayın sonunda 8 numaralı sıvı formülasyonun toplam canlı hücre sayısı ($1,6 \times 10^8$ kob/ml) 10 numaralı sıvı formülasyonun ($6,5 \times 10^5$ kob/ml) ve 11 numaralı sıvı formülasyonun ($3,0 \times 10^5$ kob/ml) toplam canlı hücre sayısından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle 25 °C'de muhafaza edilen sıvı formülasyonlarda *P. chlororaphis* suşunun canlılığı için tek bir hücre koruyucunun yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

8 numaralı sıvı formülasyon içeriğine göre daha az çeşitlilikte ve miktarda hücre koruyucu içeren ve hücre koruyucu olarak %1 PEG ve %2,50 gliserol kullanılarak hazırlanan 3 numaralı sıvı formülasyonda altıncı ayın sonunda toplam canlı hücre sayısı $1,0 \times 10^8$ kob/ml olarak bulunmuştur. 25 °C'de muhafaza edilen *P. chlororaphis* suşu içeren 3 numaralı sıvı formülasyonun büyük ölçekteki üretim maliyetlerini en aza indirmek amacıyla daha ekonomik olduğu sonucuna varılmıştır.

Kontrolün 0. aydaki toplam canlı hücre sayısı $2,3 \times 10^8$ kob/ml'dir ve bu değer 11 farklı içerikli sıvı formülasyonun 0. aydaki toplam canlı hücre sayıları ile

karşılaştırıldığında en düşük toplam canlılık sayısı olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle sıvı formülasyon oluşturmak için ilk adım olan inkübasyondan önce kültür ortamının içine eklenen hücre koruyucuların *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısı üzerine olan pozitif etkisi net bir şekilde görülmektedir.

4 °C’de muhafaza edilen ve **% 2 PVP, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 tween 20** içeriğine sahip **11 numaralı sıvı formülasyondaki** toplam canlı hücre sayısındaki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Altıncı ayın sonunda hücre koruyucu olarak %1 PEG içeren 10 numaralı sıvı formülasyonun toplam canlı hücre sayısının ($2,1 \times 10^4$ kob/ml) diğer 10 adet sıvı formülasyondaki toplam canlı hücre sayıları içerisindeki en düşük canlılığa sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle hücre koruyucu olarak %1 oranında PEG kullanılmasının *P. chlororaphis* suşunun canlılığı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sıcaklık değeri sıvı formülasyonların raf ömrü üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Çünkü bakteri hücrelerinin büyüebileceği bir sıcaklık değerinde muhafaza edilen sıvı formülasyonlar içerisindeki hücreler çoğalmakta ve bir süre sonra bu hücreler besin yetersizliği, ... vb. gibi nedenlerden dolayı ölmektedirler. Bu nedenle oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının üzerindeki sıcaklık değerlerinde muhafaza edilen sıvı formülasyonların uygun formüle edilmiş olması gerekmektedir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere sıcaklık faktörünün suşun canlılığı üzerinde negatif etkiyi en aza indirmek için 25 °C’de *P. chlororaphis* suşu ile sıvı formülasyon oluşturmak için PVP, PEG ve gliserol bir arada kullanılırken 4 °C’de hücre koruyucu olarak yalnızca PVP’nin kullanılması gerektiği görülmüştür.

Tablo 4.12’de çeşitli çalışmalarda farklı *Pseudomonas* suşları ile sıvı formülasyon hazırlamak için kullanılan katkı maddeleri ve bu sıvı formülasyonların raf ömürleri belirtilmiştir.

Tablo 4.12 Çeşitli çalışmalarda *Pseudomonas* suşları ile hazırlanan sıvı formülasyonların saklama koşulları ve raf ömrü

Suş	Katkı maddesi	Raf ömrü	Referans
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AMB-8 109	Hindistan cevizi suyu, PVP, gliserol	Oda sıcaklığında 6 ay (10^7 kob/mL)	Anith et al., 2016
<i>Pseudomonas putida</i> RS-198	Mısır unu, hümik asit	Oda sıcaklığında 6 ay (10^8 kob/mL)	He et al., 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf1	Gliserol	Belirtilmemiş	Selvaraj et al., 2014
<i>Pseudomonas sp.</i>	Trehaloz	10 ay (10^7 kob/mL)	Manimekalai and Kannahi, 2018
<i>Pseudomonas sp.</i>	PVP	Belirtilmemiş	Dayamani and Brahma Prakash, 2014
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PVP, ksantan sakızı, Tween 20	6 ay ($1,76 \times 10^{10}$ kob/ml)	Biradar, 2018
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gliserol	6 ay ($9,50 \times 10^7$ kob/mL)	Manikandan et al., 2010
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d	PVP, ksantan sakızı, Tween 20	4 °C'de ≥ 6 ay ($4,7 \times 10^8$ kob/ml)	Bu çalışmada
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 39-d	PVP, PEG, gliserol, ksantan zamkı, Tween 20	25 °C'de 6 ay ($1,6 \times 10^8$ kob/ml)	Bu çalışmada

Biradar ve arkadaşları *Pseudomonas fluorescens* suşu kullanarak farklı sıvı formülasyonlar üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada hücre koruyucu olarak polivinilpirolidon (%2), adjuvan olarak ksantan sakızı (%0,3), yüzey aktif maddesi olarak Tween 20 (%0,5) ve koruyucu olarak potasyum sorbat (%0,2) içeren sıvı formülasyonun 180 günün sonunda en yüksek toplam canlı hücreye sahip olduğu belirtilmiştir ($1,76 \times 10^{10}$ kob/ml). *Pseudomonas fluorescens* suşu için en iyi hücre koruyucunun PVP daha sonra PEG olduğunu çalışmaları sonucunda

belirtmişlerdir (Biradar, 2018). Çalışmamızda Biradar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile paralel olarak, 4 °C'de *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu için en iyi hücre koruyucunun PVP olduğu sonucuna varılmıştır.

Manimekalai ve Kannahi *Pseudomonas* sp. ile %2 gliserol, %1 PEG 400, %1 PVP K 30 ve %1 trehaloz kullanılarak sıvı formülasyonlar oluşturmuşlardır. 290 günün sonunda trehaloz %1 içeren sıvı formülasyon en yüksek canlı hücre sayısına sahip olduğu görülmüştür (5×10^7 kob/ml). Herhangi bir koruyucu kullanılmayan kültür ortamında canlı hücre sayısı $1,2 \times 10^3$ kob/ml'ye düşmüştür. Trehaloz *Pseudomonas* sp. için gliserol, PEG ve PVP den daha etkili bir koruma sağlamıştır (Manimekalai and Kannahi, 2018).

Dayamani ve Brahma prakash *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Acinetobacter* sp. suşları kullanarak sıvı formülasyonlar oluşturmuşlar. Katkı maddesi olarak PVP K-15, PVP K-25, PVP K-30, PVP K-90, PEG 400, PEG 600, PEG 4000, PEG 6000 ve gliserol (%0,5, %1, %2) kullanmışlardır. *Bacillus* sp. için %2 PVP K-15; *Pseudomonas* sp. için %2 PVP K-15; *Azotobacter* sp. için %2 gliserol, *Acinetobacter* sp. %2 PEG 4000 ile oluşturulan sıvı formülasyonlarda toplam canlı hücre sayılarını istatistik olarak anlamlı bulmuşlardır. Bu çalışmada moleküler ağırlık bakımından farklılık gösteren PVP ve PEG formülasyonları gibi katkı maddelerinin etkisi değerlendirilmiştir (Dayamani and Brahma prakash, 2014).

Manikandan ve arkadaşları *Pseudomonas fluorescens* Pfl suşu ile sıvı formülasyonlar oluşturmuşlardır. Katkı maddesi olarak gliserol (10 mM), trehaloz (10 mM) ve PVP (2%) kullanmışlardır. Gliserol (10 mM) ile hazırlanan sıvı formülasyonda başlangıçtaki canlı hücre sayısı $4,55 \times 10^{10}$ kob/ml iken altıncı ayın sonunda $9,50 \times 10^7$ kob/ml'ye; trehaloz (10 mM) ile hazırlanan sıvı formülasyonda başlangıçtaki canlı hücre sayısı $4,25 \times 10^{10}$ kob/ml iken altıncı ayın sonunda $1,00 \times 10^5$ kob/ml'ye düşmüştür. PVP (2%) ile hazırlanan sıvı formülasyonda başlangıçtaki canlı hücre sayısı $4,10 \times 10^{10}$ kob/ml iken altıncı ayın sonunda canlı bakteri hücreleri gözlemlenmemiştir. Herhangi bir katkı maddesi kullanılmadan hazırlanan King's B broth içerisinde ise altıncı ayın sonunda canlı *Pseudomonas* hücreleri gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak *Pseudomonas fluorescens* Pfl suşu için

en iyi hücre koruyucunun gliserol olduğu belirlenmiştir (Manikandan et al., 2010). Çalışmamızda *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile %2 gliserol kullanılarak hazırlanan sıvı formülasyonlarda altıncı ayın sonunda her iki sıcaklık değerinde (25 °C ve 4 °C) toplam canlı hücre sayısında azalmalar görülmüştür. *P. chlororaphis* 39-d suşu için hücre koruyucu olarak %2 oranında gliserolün tek başına kullanılmasının yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde *Pseudomonas* suşları kullanılarak hazırlanan birçok sıvı formülasyon çalışmaları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda sıvı formülasyon oluşturmak için kullanılan katkı maddeleri ve miktarları farklılık göstermektedir. Bu nedenle sıvı formülasyon hazırlamak için kullanılacak katkı maddeleri, bu katkı maddelerinin miktarları ve kombinasyonları her suş için özgün olarak geliştirilmelidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında mikrobiyal gübre için en çok tercih edilen ve PGPR özellikleri taşıyan ülkesel orijinli yerel gen kaynaklarından izole edilmiş yerli *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşları için en uygun sıvı formülasyonların geliştirilmesi, bu formülasyonların optimize edilmesi bunu takiben uzun raf ömrüne sahip yerli ve milli bir ürün üretilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda PGPR özelliklerine sahip yerli *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşları için ayrı ayrı optimize edilen özgün formülasyon içerikleri ile etkinliği ve raf ömrü yüksek özgün mikrobiyal gübreler elde edilmiştir.

Çalışmada *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu için hazırlanan sıvı formülasyonlarda 4 °C ve 25 °C’de toplam canlı hücre sayısında istatistiki olarak en anlamlı fark %2 PEG, %2 gliserol, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 Tween 20 içeren 11 numaralı sıvı formülasyon olmuştur. *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile hazırlanan sıvı formülasyonlarda +4 °C’de %2 PVP, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 Tween 20’nin kullanıldığı 11 numaralı sıvı formülasyon; 25 °C ise %0,41 PVP, %0,41 PEG, %3,99 gliserol, %0,3 ksantan zamkı ve %0,5 Tween 20’nin kullanıldığı 8 numaralı sıvı formülasyonlardaki toplam canlı hücre sayıları altı ayın sonunda istatistiki olarak en anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Literatürde çalışmalarında farklı suşlar için farklı sıvı formülasyon içerikleri mevcuttur. Bu nedenle her suş için formülasyon içerikleri optimize edilmelidir. Sıvı formülasyon hazırlamak için kullanılacak katkı maddeleri, bu katkı maddelerinin miktarları ve kombinasyonları her suş için özgün olacak şekilde geliştirilmelidir.

Bu çalışmada kullanılan polivinil pirolidon (PVP) ve polietilen glikol (PEG) polimerleri için molekül ağırlıkları dikkate alınmamış, bu iki polimer için konsantrasyonlar ve kombinasyonlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 ve *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşları ile sıvı formülasyon oluşturulmak için farklı molekül ağırlıklarına sahip PVP ve PEG ile çalışmaların yapılması önerilmektedir. Adjuvan olarak kullanılan ksantan zamkı ve yüzey aktif maddesi olarak kullanılan Tween 20 bütün formülasyonlarda aynı

konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bu nedenle *B. subtilis* EGE-B-36.5 ve *P. chlororaphis* 39-d suşları ile sıvı formülasyon oluşturmak için ksantan zankı ve Tween 20'nin farklı konsantrasyonları için denemeler yapılması önerilmektedir. *B. subtilis* ve *P. chlororaphis* suşu için hücre koruyucu olarak trehaloz ve arap zankı, adjuvan olarak karboksimetil selüloz (CMC) kullanılarak alternatif sıvı formülasyon çalışmaları yapılabilir.

Şekil 5.1'de hücre koruyucu olan PVP, PEG ve gliserolün miktarlarının üretim maliyetlerini düşürmek için minimize edilip *B. subtilis* suşunun toplam canlı hücre sayısının maksimize edilmesi ile ilgili optimizasyon çalışması belirtilmiştir. Bunun sonucunda program sıvı formülasyon oluşturmak için hücre koruyucu olarak %1,01 PVP, %1,01 PEG ve % 1,01 gliserol değerlerinde kullanılırsa toplam canlı hücre sayısındaki değişimin en az olacağı sonucunu vermiştir. Fakat programın vermiş olduğu optimum değerlerin etkisini görmek için *B. subtilis* suşu ile yeni sıvı formülasyonlar oluşturulup raf ömürlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Raf ömrü çalışmalarında uzun zamanlara ihtiyaç olduğu için Şekil 5.1'de belirtilen miktarlar kullanılarak deneme seti kurulamamıştır. Sonuç olarak validasyon işlemi gerçekleştirilememiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda hücre koruyucu olarak %1,01 PVP, %1,01 PEG ve % 1,01 gliserol değerleri ile hazırlanacak kültür ortamlarında validasyon için biyokütle üretiminin ve elde edilecek formülasyonlarının raf ömürlerinin takip edilmesi önerilmektedir.

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
PVP	minimize	1.00675	2.49325	1	1	3
PEG	minimize	1.00675	2.49325	1	1	3
GLYCEROL	minimize	1.00675	2.49325	1	1	3
Can. Hüc. Say.	maximize	8.35218	10.0969	1	1	3
Can. Hüc. sa. 1f	maximize	4	8.01284	1	1	3

Solutions

Number	PVP	PEG	GLYCEROL	Can. Hüc. Say.	Can. Hüc. sa. 1f	Desirability	
1	<u>1.01</u>	<u>1.01</u>	<u>1.01</u>	<u>9.92794</u>	<u>7.12585</u>	<u>0.932</u>	<u>Selected</u>
2	1.01	1.01	1.01	9.92593	7.11929	0.931	
3	1.01	1.01	1.01	9.92367	7.11833	0.930	
4	1.01	1.02	1.01	9.9256	7.11421	0.929	
5	1.03	1.01	1.01	9.92208	7.10677	0.928	
6	1.01	1.03	1.01	9.92439	7.10824	0.928	
7	1.01	1.06	1.01	9.91944	7.08433	0.922	
8	1.01	1.01	1.07	9.88694	7.05336	0.915	
9	1.01	1.01	1.08	9.87761	7.03698	0.911	
10	1.01	1.12	1.01	9.90969	7.0401	0.910	
11	1.06	1.01	1.04	9.88698	7.02651	0.910	

Şekil 5.1 *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşu ile sıvı formülasyon hazırlamak için üretim ortamına katılması gerekli olan optimum hücre koruyucu miktarları

Şekil 5.2’de hücre koruyucu olan PVP, PEG ve gliserolün miktarlarının aralıkta bırakılıp toplam canlı hücre sayısının maksimize edilmesi ile ilgili optimizasyon çalışması belirtilmiştir. Bunun sonucunda program *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu kullanılarak yapılan sıvı formülasyonlarda hücre koruyucu olarak %1,27 PVP, %1,23 PEG ve %3,43 gliserol değerlerinde kullanılırsa *P. chlororaphis* suşunun toplam canlı hücre sayısındaki değişimin en az olacağını göstermiştir. Fakat Şekil 5.2’de belirtildiği üzere programın vermiş olduğu optimum değerlerin deneme seti üzerinde etkisini görmek için *P. chlororaphis* suşu ile yeni sıvı

formülasyonlar oluşturulup raf ömrü takibi yapılarak toplam canlı hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Raf ömrü çalışmalarında uzun zamanlara ihtiyaç olduğu için bu optimum miktarlarla deneme seti kurulamamıştır. Sonuç olarak validasyon işlemi gerçekleştirilememiştir.

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
PVP	is in range	0.405396	1.5946	1	1	3
PEG	is in range	0.405396	1.5946	1	1	3
Glycerol	is in range	1.01349	3.98651	1	1	3
Canlı Hücre 9.A ₃	maximize	2	8	1	1	3

Solutions

Number	PVP	PEG	Glycerol	Canlı Hücre 9.A	Desirability	
1	<u>1.27</u>	<u>1.23</u>	<u>3.43</u>	<u>8.39947</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	1.22	1.09	2.59	8.30088	1.000	
3	1.41	1.11	3.29	8.3306	1.000	
4	1.56	1.24	2.80	8.34056	1.000	
5	0.94	1.42	3.03	8.23233	1.000	
6	1.04	1.35	3.25	8.37154	1.000	
7	1.00	1.15	3.35	8.2225	1.000	
8	1.34	1.19	3.14	8.47436	1.000	
9	1.25	1.19	2.35	8.17746	1.000	
10	0.99	1.38	2.53	8.09601	1.000	
11	1.37	1.18	2.58	8.34469	1.000	
12	1.03	1.44	2.64	8.16307	1.000	

Şekil 5.2 *Pseudomonas chlororaphis* 39-d suşu ile sıvı formülasyon hazırlamak için üretim ortamına katılması gerekli olan optimum hücre koruyucu miktarları

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda hücre koruyucu olarak %1,27 PVP, %1,23 PEG ve %3,43 gliserol değerleri ile hazırlanacak kültür ortamlarında validasyon için biyokütle üretiminin ve elde edilecek formülasyonlarının raf ömürlerinin takip edilmesi önerilmektedir.

EK AÇIKLAMALAR

Tez çalışması FYL-2020-21642 nolu Bilimsel Araştırma Projesi ile E.Ü Rektörlüğü BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Tez çalışması “2210/D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı” ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akbal, Z., 2011, Bazı Psikrotolerant Bacillus izolatlarında Çeşitli Hidrolitik Enzimlerin Taranması ve Yüksek Aktivite Gösteren İzolatların Pİlot Ölçekte Spor Üretiminin Yapılması ve Formülasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 172s.
- Akinrinlola, R. J., Yuen, G. Y., Drijber, R. A., & Adesemoye, A. O., 2018, Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits, *International Journal of Microbiology*,
- Amin, M., Anwar, K., Said, M., & Afizal, M., 2015, Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, 2(1).
- Anith, K. N., Vyshakhi, A. S., Viswanathan, A., Varkey, S., & Aswini, S., 2016, Population dynamics and efficiency of coconut water based liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* AMB-8, 54(2), 184–189.
- Arseneault, T., Fillion, M., 2016, Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. as Biocontrol Agents of Plant Pathogens, In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Springer, New Delhi, pp. 53-68.
- Atlas, R.M., Parks, L.C. and Brown, A.E., 1995, Laboratory Manual of Experimental Microbiology, Mosby-YearBook, St. Louis, Missouri, 565p
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P., 2014, Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). In *Plant and Soil* (Vol. 378, Issues 1–2, pp. 1–33), Kluwer Academic Publishers.
- Beneduzi, A., & Passaglia, L. M., 2011, Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting bacilli. In *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-20.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K., 2012, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1327–1350).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biradar, B. P., & Santhosh, G. P., 2018, Cell protectants, adjuvants, surfactant and preservative and their role in increasing the shelf life of liquid inoculant formulations of *Pseudomonas fluorescens*, *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 6, 116-122.
- Borriss, R., 2011, Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture, In *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 41-76.
- Chandini, K. R., Kumar, R., & Prakash, O., 2019, The impact of chemical fertilizers on our environment and ecosystem, *Research trends in environmental sciences*, 69-86.
- Daniel Amalraj, L. E., Desai, S., Kumar, P. G., Hassan Ahmed, M. S., Sultana, U., Pinisetty, S., & Narasu, L. M., 2013, Effect of Polymeric Additives, Adjuvants, Surfactants on Survival, Stability and Plant Growth Promoting Ability of Liquid Bioinoculants, *J Plant Physiol Pathol*, 1(2).
- Daniels, R. S., 2012, Corn Steep Liquor as a Biostimulant Composition, U.S. Patent No.2012015454.
- Europe Biofertilizers Market- Growth, Trends, Covid-19 Impact, And Forecasts (2022- 2027)
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/europe-biofertilizers-market>
(Son erişim tarihi: 10.01.2022)
- Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., de Araujo, F. F., & Stamford, N. P., 2016, Beneficial microorganisms: current challenge to increase crop performance, In *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*, Springer, New Delhi, pp. 53-70.
- Global Biofertilizers Market- Growth, Trends, Covid-19 Impact, And Forecasts (2022- 2027)
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry>
(Son erişim tarihi: 10.01.2022)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Global Biofertilisers Market Outlook

<https://www.expertmarketresearch.com/reports/biofertilizer-market>

(Son erişim tarihi: 10.01.2022)

Gopal, S., & Baby, A., 2017, *Enhanced shelf-life of Azospirillum and PSB through addition of chemical additives in liquid formulations.*

Gopi, G. K., Meenakumari, K. S., Nysanth, N. S., & Subha, P., 2019, An optimized standard liquid carrier formulation for extended shelf-life of plant growth promoting bacteria, *Rhizosphere*, 11

Herrmann, L., & Lesueur, D., 2013, Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation, In *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, Issue 20, pp. 8859–8873

İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M. N., Yakışır, E., & Okur, O., 2014, Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 12(2), 1-19.

Jenson, I., 2014, BACILLUS | Introduction, *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), pp. 111-117.

KJ, D., & Brahma Prakash, G. P., 2014, Influence of form and Concentration of the Osmolytes in Liquid Inoculants Formulations of Plant Growth Promoting Bacteria, *International Journal of Scientific and Research Publications*, 449.

Kimyasal Gübreler ve Olumsuz Etkileri

https://www.gubreler.com/kimyasal-gubreler-ve-olumsuz-etkileri_419.htm

(Son erişim tarihi: 01.01.2022)

Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N., 2011, Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem, In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 37–59,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, A. P., Janardhan, A., Radha, S., Viswanath, B. and Narasimha, G., 2015, Statistical Approach to Optimize Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* 2297, 3 Biotech, 5: 71-79 pp.
- Kumaresan, G., & Reetha, D., 2011, Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives, *Journal of Phytology*, 3(10), 48–51.
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E., 2019, Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural Technologies, In *Microbiological Research*, Elsevier GmbH, Vol. 219, pp. 12–25.
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J., 2012, Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers, *In The Scientific World Journal*, Vol. 2012
- Manimekalai, G., & Kannahi, M., 2018, Evaluation of low cost liquid formulation of PGPR inoculants with protective substances, *Int J Recent Sci Res*, 9(6), 27330-27335.
- Meena, K. S., Archana, S., Jonathan, E. I., & Raguchander, T., 2015, Study on Viability and Effect of Liquid Formulation of *Bacillus subtilis*, Bbv 57 Against Nematode-Fungus Disease Complex in Tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill, *Indian Journal of Nematology*, 45(2), 184-194.
- Mishra, J., & Arora, N. K., 2016, Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach, In *Bioformulations: For sustainable agriculture*, Springer, New Delhi, pp. 3-33.
- Nakkeeran, S., Fernando, W. D., & Siddiqui, Z. A., 2005, Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases, In *PGPR: Biocontrol and biofertilization*, Springer, Dordrecht, pp. 257-296.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pathma, J., Kennedy, R. K., & Sakthivel, N., 2011, Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants, In *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 77-105.
- Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)
<https://thebiologynotes.com/plant-growth-promoting-rhizobacteria-pgpr/>
 (Son erişim tarihi: 02.01.2022)
- Posada-uribe, L. F., & Villegas-escobar, M. R. V., 2015, *Effect of medium components and culture conditions in Bacillus subtilis EA-CB0575 spore production*, 1879–1888.
- Ramzan, S., Ashraf, I., Ali, T., Rasool, T., Ahmad, P., Wani, M. A., ... & Rouf, A., 2021, Responses of Soil Properties to Organic Amendments, In *Microbiota and Biofertilizers*, Springer, Cham, pp. 39-55
- Reuter, C. J., 2011, Compositions for stabilizing bacillus spores and methods of use thereof, U.S. Patent No. 20110200572
- Rouissi, T., 2012, *Développement de formulations efficaces et économiques de Sinorhizobium meliloti cultivé dans les eaux usées de l'industrie d'amidon* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Saffeullah, P., Nabi, N., Liaqat, S., Anjum, N. A., Siddiqi, T. O., & Umar, S., 2021, Organic Agriculture: Principles, Current Status, and Significance, In *Microbiota and Biofertilizers*, Springer, Cham, pp. 17-37.
- Sahu, P. K., & Brahma Prakash, G. P., 2016, Formulations of biofertilizers—approaches and advances, In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Springer, New Delhi, pp. 179-198.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S., 2016, Soil microbes: the invisible managers of soil fertility, In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Springer, New Delhi, pp. 1-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J., 2020, *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition, In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 128, Issue 6, pp. 1583–1594), Blackwell Publishing Ltd.
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K. D., Singh, P. K., & Kumar, A., 2019, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, Elsevier, pp. 41–66.
- Singleton, P., Keyser, H., & Sande, E., 2002, Development and evaluation of liquid inoculants, *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam, ACIAR Proceedings 109e, Canberra*, 52-66.
- Sözer Bahadır, P., 2018, Mikrobiyal Gübre Olarak Çeşitli *Bacillus* Biyopreparatlarının Optimum Üretim Koşulları ve Performanslarının İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 232s.
- Sun, Q. Y., Ding, L. W., He, L. L., Sun, Y. B., Shao, J. L., Luo, M., & Xu, Z. F., 2009, Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes, *Analytical biochemistry*, 394(1), 144-146.
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K., 2017, Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR, In *Applied Soil Ecology* (Vol. 121, pp. 102–117), Elsevier B.V.
- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2018, Gübre Sektör Politika Belgesi 2018-2022, Ankara
- Trimurtulu, N., Rao, D. L. N., Trimurtulu, N., & Amaravathi, G., 2014, Liquid Microbial Inoculants and their Efficacy on Field Crops, ANGRAU, *Agricultural Research Station, Amaravathi*, 54.
- Turan, M., 2017, Mısır Maserasyon Sıvısı, Çinko Oksit, Borik Asit İle Bakteri Karışımından Meydana Gelen Bir Organik Gübre, TR Patent No. 201613931.
- Valetti, L., Angelini, J. G., Taurian, T., Ibáñez, F. J., Muñoz, V. L., Anzuay, M. S., ... & Fabra, A., 2016, Development and field evaluation of liquid inoculants with

native Bradyrhizobial strains for peanut production. *African Crop Science Journal*, 24(1), 1-13.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresinde bilgisi, tecrübesi ve pozitif enerjisi ile her zaman yanımda olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Rengin ELTEM'e teşekkürü bir borç bilirim. Değerli hocam Prof. Dr. Murat Elibol'a çalışmamdaki katkı ve yardımları için teşekkür ederim. "2210/D Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı" ile beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. FYL-2020-21642 nolu Bilimsel Araştırma Projesi ile tezime mali destek veren E.Ü Rektörlüğü BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Biyomühendislik bölümü C117 laboratuvar ekibine teşekkürlerimi sunarım. Beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

18 / 02 / 2022

İmzası

Sevgi İŞLEK

ÖZGEÇMİŞ

SEVGİ İŞLEK

İŞ DENEYİMLERİ

Aralık 2020 -devam ediyor: Supersol Biyoteknoloji A.Ş. – Arge Sorumlusu

EĞİTİM BİLGİLERİ

2018- : Ege Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyomühendislik ABD (Devam ediyor.)

2013 – 2018: Ege Üniversitesi - Mühendislik Fakültesi – Biyomühendislik Bölümü

2009-2013: Tire Öğretmen Melahat Aksoy Anadolu Öğretmen Lisesi

STAJ BİLGİSİ

Temmuz-Ağustos 2017: Algen Biyoteknoloji , İstanbul

YABANCI DİL BİLGİSİ

Upper Intermediate (YÖKDİL:88.75)

BİLGİSAYAR BECERİSİ

Microsoft Ofis Programları

BAŞARILAR

İşlek S., Eltem R., 2022, The Effect Of Additives For Developing PGPR Formulation On Shelf Life Of *Pseudomonas chlororaphis* 39-d, Avrasya 5. Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi, 15-16 Ocak 2022, Varna, Bulgaristan

Karaca K., İşlek S., Eltem R., 2022, Effect Of Various pH Ranges On Shelf Life For *Bacillus Subtilis* Strains, Avrasya 5. Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi,15-16 Ocak 2022, Varna, Bulgaristan

17/07/2017 III.Temel Yönetim Becerileri Sempozyumu'Sosyal Mühendislik Eğitim Programı' – 'Problem Çözme Teknikleri Eğitim Programı '

16/07/2016 III.Temel Yönetim Becerileri Sempozyumu 'Zaman Yönetimi Eğitim Programı' – 'Temel Yönetim Becerileri Eğitim Programı'

20-21/02/2016 4. Genetik ve Biyomühendislik Günleri (Yeditepe Üniversitesi)

02/05/2015 EGEKÖK Temel Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu

12-13/03/2015 3. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi (Marmara Üniversitesi)

06/11/2014 Ege Üniversitesi Girişimcilik Semineri

12/03/2013 2. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi(Ege Üniversitesi)

PROJE

Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteriler (PGPR) için Formülasyon Geliştirilmesi / Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi

BURS

2210/D TÜBİTAK Yurt İçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı