

**BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAKTERİLERİN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE NOHUT
(*Cicer arietinum* L. cv. Aziziye-94) BİTKİSİNDE
BİYOGÜBRE AJANI OLARAK KULLANILABİLME
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Alev SEZEN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU
Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR
2012
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAKTERİLERİN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE NOHUT (*Cicer arietinum*
L. cv. Aziziye-94) BİTKİSİNDE BİYOGÜBRE AJANI OLARAK
KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Alev SEZEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2012

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU VE NOHUT (*CICER ARIETINUM* L. CV. AZİZİYE-94)
BİTKİSİNDE BİYOGÜBRE AJANI OLARAK KULLANILABİLME
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU danışmanlığında, Alev SEZEN tarafından hazırlanan bu çalışma 22/02/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza:

Üye : Doç. Dr. Hasan GÜRBÜZ

İmza:

Üye : Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Aydan KARA

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

.....

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2011/104

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE NOHUT (*Cicer arietinum* L. Cv. Aziziye-94) BİTKİSİNDE BİYOGÜBRE AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Alev SEZEN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU
Ortak Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

Erzurum ve Kırşehir civarındaki bölgelerden alınan farklı bitki rizosferlerine ait topraklardan toplam olarak 180 bakteri izole edildi. Bu bakteriler azot bağlayıcı ve fosfat çözücü özellikleri bakımından test edildi. İzolatlardan 16 tanesinin çeşitli düzeylerde hem azot bağlayıcı hem de fosfat çözücü özelliğe sahip olduğu belirlendi. Bazı kültürel ve sitolojik özellikleri ile yağ asiti profillerine göre izolatlar *Cellulomonas turbata* (AS-1), *Bacillus megaterium* (AS-2), *Pseudomonas putida* (AS-3), *Bacillus cereus* (AS-4), *Neisseria mucosa* (AS-5), *Enterobacter cloacae* (AS-6), *Bacillus megaterium* (AS-8), *Bacillus mycoides* (AS-9), *Enterobacter cloacae* (AS-10), *Vibrio furnissii* (AS-11), *Bacillus cereus* (AS-12), *Bacillus cereus* (AS-13), *Bacillus cereus* (AS-14), *Bacillus megaterium* (AS-15), *Bacillus megaterium* (AS-16) olarak tanımlandı. AS-7 izolatu MIS sistemi ile tanılanamadı. Nohut (*Cicer arietinum* L. cv. Aziziye-94) tohumları bu izolatlar ile aşılandı ve steril kum içeren saksılarda sera şartlarında büyütüldü. Hasattan sonra bitkilerin kök ve gövde boyları, yaprak kuru ağırlıkları ve protein içerikleri ölçüldü. İzolatlarla aşılamanın nohut bitkisinde büyüme parametrelerini önemli düzeyde ($p<0,05$) etkilediği belirlendi. Kök boyu, gövde boyu, yaprak kuru ağırlığı ve yaprak protein içeriği üzerinde en etkili ırkların sırasıyla AS-8; AS-10; AS-2 ve AS-13 oldukları bulundu. Sonuçlar izolatlarımızla aşılamanın nohut üretiminde pahalı azot- fosfor gübrelerinin yerine kullanılabileceğini gösterdi.

2012, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bitki gelişimini teşvik edici bakteriler, biyogübre, biyoinokülant, nohut.

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPB) AND DETERMINATION OF THEIR POTENTIAL FOR USE A BIOFERTILIZER AGENT FOR CHICKPEA

Alev SEZEN

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

Supervisor: Assoc. Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU
Co-Supervisor: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

Totally 180 bacterial strains, isolated from the rhizosphere soils of different wild plants collected from te regions in Erzurum and Kırşehir vicinity, were tested for their nitrogen fixing and phosphate solubilizing capacity. Results indicated that 16 isolates have both nitrogen fixing and phosphate solubilizing popential at different levels. On the basis of some cultural and cytological characteristics and fatty acid profiles the strains were identifiicated as *Cellulomonas turbata* (AS-1), *Bacillus megaterium* (AS-2), *Pseudomonas putida* (AS-3), *Bacillus cereus* (AS-4), *Neisseria mucosa* (AS-5), *Enterobacter cloacae* (AS-6), *Bacillus megaterium* (AS-8), *Bacillus mycoides* (AS-9), *Enterobacter cloacae* (AS-10), *Vibrio furnissii* (AS-11), *Bacillus cereus* (AS-12), *Bacillius cereus* (AS-13), *Bacillus cereus* (AS-14), *Bacillus megaterium* (AS-15) and *Bacillus megaterium* (AS-16). AS-7 could not be identified by MIS system. The seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. Aziziye-94) were inoculated with these isolates and grown in pots containing sterile sand at greenhouse conditions. Hogland solution was used for irrigation of pots. After harvest the length of roots and shoots, dry weight and protein content of leaves were measured. Inoculations with isolates effected the growth parameters of chickpea significantly ($p<0,05$). Most effective strains on root and shoot lengths, dry weight and protein contents of leaves were AS-8; AS-10; AS-2 and AS-13, respectively. The results showed that microbial inoculation of seeds with our isolates may substitute costly Nitrogen-Phosphate fertilizer in chicpea production.

2012, 73 pages

Keywords: Plant growth promoting bacteria, biofertilizer, bioinoculant, chickpea.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma BAP (Proje No: 2011/104) tarafından desteklenmiş olup, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji ve Bitki Fizyolojisi laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmalarım esnasında ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, tezimin laboratuvar aşaması ve incelenme sürecinde yardımlarda bulunup; her türlü eksik ve hatalarımı görmezden gelerek yalnızca öğrenmem için çabalayan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut TAŞKIN ve Sayın Ar. Gör. Özden CANLI'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları boyunca yardımları ile yanımda olan arkadaşlarım Uzman Murat ÖZDAL, Serkan ÖRTÜCÜ, Muhammed Emin ÇÖĞENDER, Deniz TİRYAKİ, Özlem GÜR ve Neslihan YÜCE'ye; ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli arkadaşım Siyami PORİKLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Sadece bu süreçte değil, her koşulda yanımda olan, bana güvenen, teşvik eden kısaca hayatımın her aşamasında maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen, teşvik ve tavsiyeleriyle büyük ölçüde yol gösteren, bugünlere gelmemdeki en büyük katkıyı sağlayan ve asla haklarını ödeyemeyeceğim çok değerli babam Halit SEZEN, annem Nimet SEZEN, ablalarım Gül SEZEN ZENGİN ve Demet SEZEN'e sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca uygulama ve deneyimlerimin oluşmasındaki tüm süreçte doğrudan ve dolaylı olarak yer alan burada hepsinin adlarını sayamadığım hocalarıma, büyüklerime, dostlarıma, ev arkadaşlarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Alev SEZEN

Şubat 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitki Gelişimini Teşvik Edici Bakteriler	1
1.2. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Başlıca Bakteriler	2
1.3. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin Etki Mekanizmaları	2
1.4. Azot Fiksasyonu	3
1.5. Bakterilerin Fosforlu Bileşikleri Çözücü Potansiyelleri	5
1.6. Bitki Büyümesini Düzenleyici Maddelerin Üretimi	5
1.7. ACC (1-amino siklopropan-1-karboksilik asit) Deaminaz Aktivitesine Sahip Bakteriler	6
1.8. Biyogübre Nedir?	7
1.9. Nohut Bitkisinin Ülkemiz Tarımsal Üretimindeki Yeri ve Önemi	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Kimyasal maddeler	16
3.1.2. Bitki kök ve rizosfer toprağı örneklerinin alınması	16
3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar	17
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	17
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Mikroorganizmaların (bakterilerin) izolasyonu ve saflaştırılması	19
3.2.2. Asetilen redüksiyon testi	20
3.2.3. İnorganik fosfatın (tri kalsiyum fosfat) mikrobiyal yolla çözünmesinde etkili olan mikroorganizmaların kalitatif olarak belirlenmesi	20

3.2.4. İzolatların tanısı - karakterizasyonu.....	21
3.2.4.a. Kültürel ve morfolojik testler	21
3.2.4.b. Moleküler metotlar.....	23
3.2.5. İzolatların bitki büyümesini teşvik edici potansiyellerini belirlemek.....	25
3.2.5.a. İnokulum (aşı kültürü) hazırlanması	25
3.2.5.b. Tohumların sterilizasyonu	25
3.2.5.c. Tohumların çimlendirilmesi	26
3.2.5.d. Saksı ve kum sterilizasyonu	26
3.2.5.e. Denemenin kurulması	26
3.2.6. Bitkilerin kök ve boy uzunlukları.....	28
3.2.7. Bitki yaprak dokusunda çözünebilir protein miktarının tayini.....	29
3.2.8. Sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	30
4.1. Potansiyel Etkili İzolatların Seçimi	31
4.2.Potansiyel Etkili İzolatların Çeşitli Özellikleri	32
4.3. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Kök Boyu Uzunlukları.....	40
4.4. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Gövde Boyu Uzunlukları	44
4.5. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Yapraklarındaki Kuru Ağırlık.....	48
4.6. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Yapraklarında Çözünmüş Protein miktarı	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
5.1. İzolatların Azot Bağlama Potansiyelleri	57
5.2. Fosfat Çözücü Özelliğın Belirlenmesi İçin Yapılan Tarama (Screening) Çalışmaları.....	58
5.3. İzolatların Tanı İşlemleri.....	59
5.4. İzolatlarla Aşılamanın Nohut Bitkisinde Büyüme Parametreleri Üzerindeki Etkileri.....	61
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

dk	Dakika
g	Gram
g/l	Gram/litre
ml	Mililitre
mg	Miligram
µg	Mikro gram
°C	Santigrat Derece
Sn	Saniye
%	Yüzde

Kısaltmalar

BBP	Brom Fenol Mavisi
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Bitki Gelişimini Uyarıcı Kök Bakterileri)
YIB	Yield Increasing Bacteria (Verim Artırıcı Bakteriler)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. NBRIB- BPB besiyerine ekilen izolatların besiyeri renginde oluşturduğu değişiklikler.	21
Şekil 3.2. Aşılı ve aşısız uygulamaların yapıldığı saksılarda büyütülen nohut bitkileri.	27
Şekil 3.3. Protein miktarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan standart grafik.	30
Şekil 4.1 İzolatların nutrient agar içeren besiyerinde oluşturduğu koloniler.....	35
Şekil 4.2 İzolatların basit boyama ile görüntülenen hücre şekilleri	36
Şekil 4.3. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin azot için negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması	41
Şekil 4.4. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin fosfat için negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması	42
Şekil 4.5. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat için pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması	43
Şekil 4.6. İzolatlarla aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.7. İzolatlarla aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.8. İzolatlarla aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması	47
Şekil 4.9. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.10. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.11. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması	51
Şekil 4.12. İzolatlarla yapılan aşılamanın nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması	53
Şekil 4.13. İzolatlarla yapılan aşılamanın nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması	54
Şekil 4.14. İzolatlarla yapılan aşılamanın nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.2. Saksı denemelerinde, kontrol grupları için kullanılan çözeltilerin içerikleri	28
Çizelge 4.1. İzolatların inorganik fosfatı çözme etkinliklerinin kalitatif ölçümünden elde edilen bulgular	31
Çizelge 4.2. İzolatların asetilen redüksiyon testine göre oluşturdukları etilen miktarı ..	32
Çizelge 4.3. İzolatların izole edildiği habitatlar ve mıs verilerine göre bilimsel adları..	33
Çizelge 4.4. Potansiyel etkili izolatların bazı kültürel ve sitolojik özellikleri	34
Çizelge 4.5. Potansiyel etkili izolatların mıs sistemine göre içerdikleri yağ asiti çeşitleri ve bulunma oranları	37
Çizelge 4.6. Kök boyu ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistiki analizi	44
Çizelge 4.7. Gövde boyu ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistiki analizi.....	48
Çizelge 4.8. Kuru ağırlık bulgularının istatistiki analizi.....	52
Çizelge 4.9. Çözünmüş protein miktarı bulgularının istatistiki analizleri	56

1. GİRİŞ

1.1. Bitki Gelişimini Teşvik Edici Bakteriler

Toprak çok sayıda ve çeşitlilikte mikroorganizma topluluklarını içerir. Bu mikroorganizma grupları içerisinde bitki kökleri ile ilişkili olan bakteriler yer alır. Yoğun mikrobiyal etkinliğin olduğu bir bölge olan bitki rizosferinde yaşayan mikroorganizmalar, bitki büyümesini teşvik ederler. Bu bakterilerin bitki kökleri ile etkileşimleri göz önüne alındığında bir kısmının yararlı bir kısmının zararlı etkide bulunduğu görülmektedir. Yararlı etkide bulunan bu bakterilerin bazıları bitkilerde gelişmeyi uyarıcı veya biyokontrol ajanı gibi rol oynayarak ya da her iki şekilde de davranarak bitkilere yararlı etkide bulunurlar (Romerio 2000). Bu bakteriler dilimizde “Bitki Gelişimini Uyarıcı Kök Bakterileri”, İngilizce kaynaklarda ise “Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)” olarak isimlendirilmektedir. Bu terim ilk kez 1978 yılında kullanılmıştır (Kleoppe and Schroth 1978). PGPR terimi dışında başka terimler de kullanılmaktadır. Çin’de bitki gelişimini uyarıcı kök bakterileri için İngilizce “Yield Increasing Bacteria” sözcüklerinin baş harflerinden oluşan YIB terimi kullanılmaktadır (Chen *et al.* 1996). Birtakım çalışmalarda da bitki gelişimini uyarıcı bakteriler anlamına gelen “Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)” terimi tercih edilmektedir (Bashan *et al.* 2000).

PGPR’ler hem bitki gelişimini düzenleyici, hem de kök patojenlerini baskılayıcı etkileriyle dikkat çekerler (Kloepper 1993; Lucas *et al.* 2000; Lemanceau *et al.* 2000; Parmar and Dudarwal 2000). Ancak bu iki yararlı etkiyi birbirinden ayırmanın kolay olmadığı, her iki olayın da birbiriyle etkileşim içinde olduğu vurgulanmaktadır (Chen *et al.* 1996).

1.2. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Başlıca Bakteriler

Bugün dünyanın pek çok ülkesinde, bitki gelişimini teşvik eden ve biyolojik gübre olarak kullanılan başlıca bakteri cinslerinin; *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Aereobacter*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Serratia* ve *Xanthomonas* olduğu görülmektedir (Çakmakçı 2005 a, b; Çakmakçı ve Erdoğan 2008). Ülkemizde en çok çalışılan türler, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* ve *Azospirillum* cinslerine aittir (Çakmakçı vd 2006a, b; 2007 a, b; 2008 a, b). Bunlardan *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait türler patojenleri baskılayıcı özellikleriyle, *Rhizobium*, *Azotobacter* ve *Azospirillum* cinslerine ait türler ise azot bağlayıcı özellikleriyle PGPR'nin en çok çalışılan türleridir.

1.3. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin Etki Mekanizmaları

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler iki grupta sınıflandırılır. İlk grup besin elementlerinin alımını kolaylaştırarak veya bitkisel gelişime yardımcı salgı maddelerini üreterek doğrudan bitki gelişimini teşvik eder. İkinci grup ise bitki patojenlerinin zararlı etkilerinin azaltılmasını sağlar ve böylece dolaylı olarak bitki gelişimini teşvik eder.

Bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin oksin, giberellin ve etilen gibi bitkisel hormonları üretebildiği (Çakmakçı vd 2006a, b; Aslantaş vd 2007), serbest veya simbiyotik olarak N fikse ettiği (Şahin vd 2004; Çakmakçı vd 2007a, b), bitki enzim aktivitesini arttırdığı (Çakmakçı vd 2007a, 2009a), mineral fosfatı ve demiri çözebildiği ve organik fosfat ve diğer besin elementlerini mineralize ettiği (Canbolat vd 2006a, Çakmakçı vd 2006a); tuz stresinin bitki gelişmesi ve beslenmesi üzerine olumsuz etkilerini azalttığı (Yıldırım vd 2008); vitamin üretimi, siderefor, antibiyotik, enzim ve fungusit bileşikler sentezleyerek veya rekabet gibi mekanizmalarla patojenlere karşı

antagonistik etki gösterdiği (Kotan ve Şahin 2002; Eşitken vd 2003; Özaktan ve Bora 2006; Akgül ve Mirik 2008) kaydedilmektedir.

1.4. Azot Fiksasyonu

Moleküler azot dünya atmosferinin en önemli bileşenidir ve atmosfer, azotun tükenmez ve sınırsız kaynağıdır. Azot elementi tüm hayat formlarının temelini oluşturan nükleik asit ve protein gibi bileşiklerin temel yapı taşıdır. Ancak yüksek bitkiler azottan doğrudan yararlanamazlar. Yararlanabilmesi için atmosfer azotunun (N_2) öncelikle yükseltgenerek nitrat (NO_3) azotuna ya da indirgenerek amonyak (NH_3) azotuna dönüştürülmesi gerekir. Atmosferdeki N_2 gazının, toprakta serbest ve simbiyotik yaşayan ve nitrogenaz enzimine sahip olan mikroorganizmalar tarafından NH_3 'e indirgenerek toprağa bağlanması olayına biyolojik azot fiksasyonu denir (Taiz and Zeiger 1991; Salisbury and Ross 1992; Algur ve Ögütçü 2000).

Azot fiksasyonu serbest ve simbiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Simbiyotik azot fiksasyonu mikroorganizmalarla bitki kökleri arasında simbiyotik bir ilişki ile gerçekleşir. Bunun en karakteristik örneğini baklagiller ile bunların köklerinde nodül oluşturan *Rhizobium* bakterileri arasındaki ilişki oluşturur.

Serbest azot fiksasyonu, bitki kökleri çevresinde yaşayan bazı bakteriler tarafından gerçekleştirilir. Bu yolla yılda 1-5 kg-ha N fikse edildiği belirtilmektedir. İzotopik ^{15}N tekniklerinin gelişmesinden sonra, değişik ortamlarda çok sayıda bakterinin azot fikse ettiği tespit edilmiş, ancak bunlardan sadece *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Azospirillum* cinslerine ait bazı türler biyogübre olarak tarımda kullanılmıştır (Alcamo 1996; Kantar 1997; Kantar vd 1999; Algur ve Ögütçü 2000). Simbiyotik azot fiksasyonu ise baklagillerin köklerinde simbiyotik yaşayan *Rhizobium* cinsine mensup bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Rhizobium baklagil ilişkisi kemotaksis ile başlar. *Rhizobium* türleri peritrik kamçıları sayesinde kimyasal gradiente doğru hareket edebilirler. Rizosferde koloni oluşumunu

yöneten amino asit, karboksilik asit ve fenolik bileşikler gibi birçok kimyasal cezbedici (kemoatraktan) maddeler vardır.

Rhizobium–baklagil simbiyozunda kemotaksisi tutunma izlemektedir. Her bir baklagil bitkisinin özel bir *Rhizobium* türünü kabul ettiği görülür. Bu enfeksiyon olayında ilk olarak bakterilerin bitki kökü yüzeyine yapışması gerekmektedir. Bakterinin bitkiyi tanınması, bakteri hücre duvarı polisakkaritleri ile bitki hücre duvarının lektin molekülü arasındaki interaksyona bağlıdır. Lektin molekülü hem protein, hem karbohidrat içermektedir. Bakterinin hücre çeperindeki polisakkaritlerin lektin molekülleri ile interaksyona girdiği noktada kök tüylerinin hücre çeperi içeriye doğru çökmeye başlar ve bakterileri içeren tüp, hücreye doğru büyür. Bu tüp, enfeksiyon ipliği olarak adlandırılır. Enfeksiyona uğrayan hücre zarı şişer ve içerisinde bakterilerin bulunduğu bakteroid adı verilen yuvarlak yapılar meydana gelir. Enfeksiyon ipliği komşu hücrenin duvarına ulaştığı zaman, hücre çeperi çöker ve sonuç olarak kökün korteksine bakterileri taşır. Burada enfeksiyon ipliğinin ucu bozulur ve korteks hücrelerine doğru serbest hale geçerler. Bunu bakterilerin çoğalması izler ve bitki hücrelerinde azot fikse eden bakterilerle dolu hücreler içeren nodüller oluşur (Schlegel 1986; Kadioğlu 1998; Algur ve Ögütçü 2000).

Nodüllerin oluşumunda *Rhizobium* türleri tarafından bitki bünyesinde sentezlettirilen bitkisel hormonların etkili oldukları sanılmaktadır. Azot fiksasyonunun ilk safhası olan N_2 'nin amonyuma dönüşümü, nodülde gerçekleşir. Bu olay bakterinin nitrogenaz enzimi tarafından katalizlenir ve havanın azotuna hidrojen ilavesi ile gerçekleştirilir. Normal şartlar altında 1 mol azot fiksasyonu için 6-20 mol ATP harcandığı bilinmektedir (Salisbury and Ross 1992; Kadioğlu 1998).

Azot fiksasyonu, bakteride bulunan Nif molekülleri ile kontrol edilir. Son yıllarda bu genlerin azot fikse edemeyen yüksek bitkilere aşılınması için çalışmalar yapılmaktadır (Algur ve Ögütçü 2000).

1.5. Bakterilerin Fosforlu Bileşikleri Çözücü Potansiyelleri

Bitkiler için azottan sonra en önemli besin kaynaklarından biri de fosfordur. Fosfor bitki gelişimini sınırlayan elementlerdendir. Toprakta, çözünebilir fosfor kaynakları kıt olduğundan, tarımsal üretimde verimi artırmak için çözünebilir fosfor kaynaklarını içeren gübrelere ihtiyaç vardır. Toprakta bulunan bir takım bakteriler, topraktaki bu kullanılamayan fosforu çözerek bitkiler tarafından kullanılabilir forma dönüştürür. Mikroorganizmalar, doğal P döngüsünde başlıca etkindir. Bakteriler; trikalsiyum fosfat, dikalsiyum fosfat, kaya fosfatı ve hidroksi apatit gibi suda çözünemeyen fosfor kaynaklarını çözünebilir hale getirmektedir (Goldstein 1986, 1995). Mineral fosfatların çözünebilirliğinde mikroorganizmalarca üretilen organik asitlerin temel mekanizma olduğu kabul edilmektedir (Leyval and Berthelin 1989; Salih vd 1989; Hadler *et al.* 1990). Mikroorganizmaların inorganik fosfat materyalini çözebildiği (Jones and Darrah 1994; Nautiyal *et al.* 2000) ve çözünmede organik metabolitlerin önemli rol oynadığı (Kucey *et al.* 1989; Gadd 1999; Kumar and Narula 1999; Vassileva *et al.* 2000; Whitelaw 2000) bilinmektedir. Bu sayede bitki veriminde artışlar meydana gelir. Mikroorganizmaların fosforlu bileşikleri çözücü özelliği salgıladıkları organik asitlerden kaynaklanır. Bu sayede toprak pH'sı düşmekte ve fosforlu bileşiklerin çözünebilirliği artmaktadır (Seshadri *et al.* 2000; Antoun 2003).

1.6. Bitki Büyümesini Düzenleyici Maddelerin Üretimi

Kök bakterilerinin bitki gelişimi üzerindeki etkilerinden biri de onların bitki büyümesini düzenleyen maddeleri üretmeleri yoluyla gerçekleşmektedir. IAA ve etilen bu konuda ön plandadır.

İndol-3-asetik asit (IAA) ilk olarak 1885 yılında Salkowski tarafından fermentasyon ortamında bulunmuştur (Anonymous 2003a). Yapılan araştırmalarda; IAA'nın bitkilerde hücre uzamasını teşvik ettiği, floem ve ksilemin farklılaşmasını sağladığı, yaprak yaşlanmasını geciktirdiği ve çiçek gelişimini arttırdığı saptanmıştır (Anonymous 2003a).

Rizosferden izole edilen kök bakterilerinin %80'inin bitki gelişmesini düzenleyen IAA ürettikleri tahmin edilmektedir. Bu bakteriler arasında *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* ve *Pseudomonas syringae* gibi patojenlerin yanında *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* ve *Enterobacter* gibi bitki gelişimini uyaran bakterilerin bulunduğu genuslar da yer almaktadır (Patten and Glick 2000).

Kök bakterileri tarafından üretilen diğer bir bitki büyümesini düzenleyici madde de etilendir.

1.7. ACC (1-amino siklopropan-1-karboksilik asit) Deaminaz Aktivitesine Sahip Bakteriler

Bitki büyümesi birçok biyotik ve abiyotik stres faktörü ile inhibe edilmektedir. Bu stres faktörlerinden başlıcaları; yüksek sıcaklık, aşırı ışık, kuraklık, fazla su, toksik metal birikimi, organik kirletici birikimi, radyasyon, yaralanma, böcek parazitliği, aşırı tuz ve viral bakterial ve fungal patojenlere maruziyet olarak sayılabilir (Abeles *et al.* 1992). Bu stres faktörlerinin varlığı, bitki büyümesini geriletir. Çeşitli toprak mikroorganizmaları, bitkilerin bu stres faktörlerinden daha az zarar görmesine yol açan aktiviteler gösterebilirler. Bu olay çeşitli yollarla gerçekleşir ki bu yollardan bazıları; 1) Azot, fosfor veya demir gibi besinlerin topraktaki alınabilir formlarını arttırmak, 2) Patojenlerin çoğalmasını önlemek, 3) Doğrudan bitki büyümesini stimüle eden oksin ve sitokinin gibi hormonlar üretmek ve 4) Etilen gibi stres şartlarında üretilerek bitki büyümesine ket vuran maddelerin biyosentezini engellemek şeklinde sıralanabilir (Glick 1995; Glick *et al.* 1999).

Bitkiler stres şartlarına maruz kaldıklarında stres etileni olarak bilinen maddeyi üretirler. Çeşitli bitkiler strese karşı farklı tepkiler (cevaplar) verir. Etilen ve diğer bitki hormonları arasında kompleks bir etkileşim ağı vardır ve bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Dolayısıyla bitkilerin stres şartlarında ürettiği stres etileni ve onun etki mekanizması hakkında tek bir model sunmak güçtür. Çalışmalar, farklı stres şartlarında

üretileen etilenin normal biyosentez yolu ile sentezlendiğini göstermiştir. Bu sentez yoluna göre, metionin amino asiti etilenin öncü maddesidir. Metioninin etilene dönüşümünde rol oynayan ara bileşik ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit)'dir.

ACC deaminaz enzimi, ACC'nin amonyak ve α ketobütirata ayrışmasını katalizleyen enzim olup ilk olarak 1978 yılında keşfedilmiştir (Honma and Shimomura 1978). Bu enzim birçok bakteri ve fungus tarafından sentezlenmektedir (Klee *et al.* 1991; Glick *et al.* 1995; Bernard *et al.* 2007). Bu türlerin birçoğundan ACC deaminaz geni izole edilerek özellikleri belirlenmiştir. Özellikle toprak bakterilerinden *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* ve *Enterobacter* cinslerine ait türlerin bu enzim bakımından aktif oldukları da kaydedilmektedir (Blaha *et al.* 2006). Bitki büyümesini teşvik edici özellikte olan bu bakterilerin, büyümeye katkılarını, etilen miktarını azaltmak suretiyle gerçekleştirdikleri, normal şartlarda bakteri hücrelerinde az ve inaktif olan bu enzimin, bitki dokuları ile temas noktalarında ACC maddesi ile indüklenerek çoğaldığı ve aktivite kazandığı ifade edilmektedir (Glick *et al.* 1998).

1.8. Biyogübre Nedir?

Biyogübreler; kök, tohum ve toprağa uygulanarak, bitki büyümesini ve mikroflorasını iyileştirebilen faydalı mikroorganizmalardan oluşturulmuş canlı preparasyonlardır. Bu preparasyonlar, bitki yüzeyi ve toprağa uygulandığında atmosferik azotu fikse edebilen, organik ve inorganik kaynaklardan mineral elementlerin alınabilirliğini arttırmak veya sekonder metabolit üretmek suretiyle bitkisel gelişmeyi teşvik eden; rizosferde kolonize olabilen veya bitki dokularına girebilen, canlı mikroorganizmalardan oluşan materyallerdir. Artan dünya nüfusuna karşılık yoğunlaşan tarım, aşırı gübre kullanımını gerekli kılmakta ve böylece bu işlemde çevresel problemlere ve doğal kaynakların tükenmesine yol açmaktadır. Yüksek verimli ürün için birim alana daha fazla gübre uygulanması yerine, biyogübre kullanımı ile organik ve inorganik gübrelerin kullanımı sağlanmalıdır. Bitkisel üretimde verimliliğin artırılması, toprakların fiziksel ve

kimyasal yapısının iyileştirilmesi, insan sağlığının korunması ve çevre kirliliğinin önlenmesi için biyogübrelerin gerekli olduğu bilinmektedir.

Gübre uygulamasını en aza indirmek, bitki gelişimini ve beslenmesini maksimum düzeye çıkarmak amacıyla rizosferden seçilmiş farklı mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda biyogübrelemenin kapsamı genişlemiş, serbest yaşayan, bitkisel gelişimi teşvik eden, biyolojik savaş ajanı olan ve biyogübre olarak kullanılan bitki büyümesini teşvik eden mikroorganizmalar (PGPR) kullanılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda bitkisel gelişmeyi teşvik edici ve arttırıcı *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Staphylococcus* gibi bakterilerin biyogübre olarak kullanımı üzerine araştırmalar yapılmakta ve olumlu sonuçlar alınmaktadır (Kaiser 1995; Srinivasan *et al.* 1996; Bashan and Holguin 1997; Sudhakar *et al.* 2000; Çakmakçı 2002).

Mikroorganizmaların biyogübre olarak kullanılmasının pek çok faydası vardır. Biyogübre daha ucuzdur, bitkilere toksik etki göstermez, yer altı sularını kirletmez ve toprak asitliğini arttırmaz.

Biyogübrelerin bitki gelişimi üzerindeki en belirgin özellikleri simbiyotik ve non-simbiyotik azot fiksasyonu, toprak kökenli hastalıkların biyolojik kontrolü, bitki besin elementlerini mobil hale getirilmesi ve bitki gelişimini uyarıcı maddelerin salgılanmasıdır (Lucy *et al.* 2004).

1.9. Nohut Bitkisinin Ülkemiz Tarımsal Üretimindeki Yeri ve Önemi

Dünya’da ve ülkemizde artan dünya nüfusuna oranla protein kaynaklarının azalması tahıl proteinlerinden çoğunun bazı aminoasitleri içermemesi ve hayvansal kaynaklı proteinlerin pahalı oluşu protein bakımından zengin olan kuru baklagillerin değerini arttırmıştır. Diğer taraftan kuru baklagillerin tohumlarının yüksek protein içeriğine sahip

olduğu, A, B ve D vitaminleri bakımından zengin oldukları da belirtilmektedir. Şehirali (1988), baklagil kalitesinde birinci faktörün protein muhtevası olduğunu belirtmekte ve nohut bitkisinin %20-25 düzeyindeki protein oranıyla diğ er baklagillere göre daha besleyici olduğunu kaydetmektedir.

Nohut ülkemizin önemli ihraç ürünlerinden biri olup halen 625 bin hektar alanda ekilmekte ve 560 bin ton civarında üretilmektedir (Anonim 2000). Ülkemizin nohut üretiminde dünya ülkeleri arasında, ekim alanları bakımından 3. , üretim bakımından 2. , ihracatta ise 1. sırada olduğu, 2015 yılı itibarıyla hedeflenen ekim alanı büyüklüğünün 1,7 milyon hektar, üretimi ise 1,7 milyon ton olduğu da kaydedilmiştir (Şehirali vd 1995).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki gelişimini teşvik edici bakterilerle ilgili çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Aşağıda azot fiksasyonu yapan, fosfat parçalayan ve ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) deaminaz aktivitesine sahip ve biyogübre oluşturan bakterilerle ilgili bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Gürbüzer (1980) tarafından yapılan bir çalışmada; mercimek bitkisine azot bağlama özelliği gösteren 9 *R. leguminosarum* suşu izole edilerek aşılama yapılmıştır. Aşılama sonucunda ürün veriminin, dekara 4 kg azotlu gübreleme ile aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Azcon *et al.* (1976) tarafından yapılan bir çalışmada; invitro şartlarda fosfat kayası çözebilen ve bitki büyümesini düzenleyici maddeler salgılayan iki bakteri suşu ile vesiküler arbusküler mikorizal fungi arasındaki ilişkiler karşılaştırılmıştır. Bakteriler birlikte ve ayrı ayrı bitkiye aşılanmıştır. Sonuçta, mikroorganizmalarla inokule edilmiş bitkilerin, her iki durumda da fosfat kayası ilave edilmiş topraklarda kontrole göre daha fazla fosfat algıladıkları belirlenmiştir.

Rennie and Dubetz (1986) tarafından yapılan bir çalışmada; *R. leguminosarum* kültürleri ile mercimek bitkisine aşılama yapmışlardır. Aşılı bitkilerin aşısız bitkilere göre tespit ettikleri azot miktarlarında artışlar olduğunu kaydetmişlerdir.

Matos and Schröder (1988) tarafından yapılan bir çalışmada; 176 A22 straininin, N'li kontroller ve inokulasyon yapılmamış kontrollere oranla N fikse etme yeteneğini araştırmışlar ve bu araştırma sonucunda inokulasyonun yapıldığı denemelerde; bitki kuru ağırlığında, %N ve nodülasyonda önemli farklılıklar olduğunu saptamışlardır.

Beck (1992), 8 nohut ve 2 bakteri suşu kullanarak sera ve tarla şartlarında azot fiksasyonu üzerine çeşit-suş interaksiyonunun etkilerini araştıran bir çalışma yürütmüştür.

Sera şartlarında sürgün kuru ağırlığı ve azot içeriği üzerine çeşit, suş ve bu iki faktörün interaksiyonunun önemli derecede etkili olduğu sonucuna varmıştır. Tarla şartlarında ise bu iki suşun etkinliğini azotlu ve azotsuz kontrol parselleriyle test etmiştir. Her iki bakteri suşuyla yapılan aşılamanın fikse edilen azot miktarını arttırdığı ve çeşit-suş interaksiyonunun azot fiksasyonunu önemli derecede etkilediğini bulmuştur.

Rice *et al.* (1995) tarafından yapılan bir çalışmada; *Penicillium bilaii* ve *Rhizobium meliloti* türlerini turbo toprağı içerisine aktararak fosfat çözünürlüğü yoluyla bazı bitkilerin fosfat alımını arttıran bir biyogübre elde etmişlerdir.

Grupta and Namdeo (1996) tarafından yapılan bir çalışmada; *Rhizobium* ırkının etkinliği azotsuz ve azot uygulanmış parsellerde test edilmiştir. Azot uygulaması, bitki başına düşen nodül sayısı ve nodül kuru ağırlığını önemli ölçüde azaltmıştır.

Çakmakçı vd (1999) tarafından yapılan bir çalışmada; azot fikse eden (*Bacillus polymyxa*) ve fosfat çözebilen (*Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*) bakteriler, şeker pancarı (cv. Sonja) ve arpa (cv. Tokak) tohumlarına aşılansarak verim parametreleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sera şartlarında yürütülmüştür. Araştırmalar sonucunda; *Bacillus polymyxa*'nın daha etkili bir suş olduğu ve ikili aşılmalarda verimde %19,0 ve %25,9 artış sağladığı gözlemlenmiştir.

Metha and Nautiyal (2001) tarafından yapılan bir çalışmada; fosfat çözücü bakterilerin seçimi için brom fenol mavisi içeren besiyeri kullanılmış ve bu sayede fosfat çözücü bakterilerin nitel bir gözleme dayalı olarak çabucak seçilmelerinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Peix *et al.* (2001), *Mesorhizobium mediterraneum*'un bir suşunun nohut ve arpa bitkilerindeki fosfor içeriğini ve bitki gelişimini artırma özelliğı olup olmadığını saptamak için fosfatsız ve fosfatlı toprakta çalışmalar yapmışlardır. Toprağı PECA21 izolatu ile birlikte trikalsiyum fosfat ilavesinin verimde önemli artışa yol açtığını kaydetmişlerdir. PECA21 ırkı ile aşılanmış ve çözünmeyen fosfat uygulanan

topraklarda gelişen nohutun ve arpanın fosfor içeriğinin %100 ile %125 arasında önemli bir şekilde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, yapılan çalışmada bitkide kuru madde, azot, potasyum, kalsiyum ve magnezyum içeriğinin çözünmez fosfat katılmış ve bakteri aşılانmış toprakta önemli derecede artış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Jakobs *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada; bir fungus türü ile trikalsiyum fosfatın $\text{Ca}_3(\text{PO}_2)_4$ çözünmesi için, besiyerinde bulunan glikozun belli bir konsantrasyonda olması gerektiğini belirlemişlerdir. Glikoz miktarı belli bir düzeyin altına düştüğünde organik asit üretimi ve $\text{Ca}_3(\text{PO}_2)_4$ çözünürlüğünün de durduğu bulunmuştur.

Çakmakçı *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; azot fikseri olan *Bacillus licheniformis* RC02, *Rhodobacter capsulatus* RC04, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06, *Bacillus* OSU-142 ve fosfat çözücü olan *Bacillus megaterium* RC01 ve *Bacillus* M-13 bakterilerinin sera şartlarında N ve P gübresi ile karşılaştırmalı olarak arpa bitkisinin gelişimi üzerine olan ekisi test edilmiştir. Bu bakterilerden üçünün fosfat çözebildiği, altısının indol asetik asit ürettiği ve tüm izolatların azot fikse ettiği ve arpa gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Toprakta en yüksek $\text{NO}_3\text{-N}$ miktarı *Bacillus* OSU-142 aşılamasında elde edilmiştir. Bitki gelişimini teşvik edici bakteri aşılamaları ile arpa kök ağırlığı %17,9–32,1, gövde ağırlığı ise %28,8–54,2 oranında artmıştır. Azot fikse eden bakterilerle yapılan aşılamlar sonucu arpa N, Fe, Mn ve Zn alımını arttırmış ve bakterilerce hormon üretiminin bitkisel gelişimi teşvik edici mekanizmalardan biri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada; *Bacillus* OSU-142 ve *Bacillus* M-13, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Pseudomonas putida* RC06 ve *Rhodobacter capsulatus* RC04 izolatlarının tarımda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Öğütçü *et al.* (2008) tarafından yapılan bir çalışmada; Erzurum yöresinde düşük sıcaklığa sahip ve yüksek rakımlı (2000-2500 m) alanlardaki yabani nohut (*Cicer anatolicum*) bitkilerinden, toplam 21 *Rhizobium leguminosarum* subsp. *ciceri* suşu simbiyotik etkinliğin belirlenmesi amacıyla izole edilmiştir. İzolatlarla aşılانmış nohut

tohumları, içerisinde steril kum bulunan saksılara ekilerek; saksılar düşük (15°C gündüz/9°C gece) ve normal (25°C gündüz/22°C gece) sıcaklık koşullarına sahip bitki büyütme kabinlerine yerleştirilmiştir. Normal sıcaklık koşullarındaki izolatların tamamı, düşük sıcaklık koşullarındaki izolatların ise sekiz tanesi nodül oluşturmuştur. Nodül oluşturan izolatlarda genellikle bitki kuru ağırlığı ile toplam azot içeriği artmıştır. Bu da bitkiye azot sağladıklarının göstergesidir. Bu izolatların bitki kuru ağırlığı, toplam azot içeriği, fıkse edilen azot miktarı ve simbiyotik etkinlikleri dikkate alındığında, 25°C gündüz/22°C gece sıcaklık koşullarında yedi, 15°C gündüz/9°C gece sıcaklık koşullarında ise dört izolatın iyi bir performans gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, yabani nohut bitkilerinden elde edilen etkili izolatların, nohutta aşılama materyali olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Rajeshkumar *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada; arbuskular mikorizal mantarlardan *Glomus geosporum*, azot fıkse eden bakterilerden *Azotobacter chroococcum* ve mycorrhiza yardımcı bakterilerden *Bacillus coagulans*, arasındaki etkileşimi ve bunlardan hazırlanan inokulantın *Melia azedarach* L. fidelerinin büyüme ve beslenmesi üzerine etkilerini sera şartlarında araştırmıştır. *M. azedarach* fidelerine *G. geosporum*, *A. chroococcum* ve *B. coagulans* mikroorganizmalarının üçlü inokulasyonlarının bitki biyomasını, N, P, Zn ve Cu alımını, kalite indeksini maksimum düzeyde artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca kontrol bitkisi ile mukayese edildiğinde bu bitkilerin kök zonlarında mikorizal kök kolonizasyonu ve spor sayısında artış gözlemlenmiştir. Mikroorganizmalar ile inokule edilen bitkiler ile kontrol bitkileri arasında yapılan mukayese sonucu bakteri inokule edilmiş bitkilerin fosfataz, dehidrojenaz gibi enzim aktiviteleri oldukça yüksek bulunmuştur. *M. azedarach* bitkisinin seralarda sağlıklı ve en güzel şekilde yetiştirilmesinde *G. geosporum*+*A. chroococcum*+*B. coagulans* organizmaların üçlü kombinasyonlarının en uygun mikrobiyal karışım olduğu sonucuna varılmıştır.

Khan *et al.* (2010) tarafından yapılan bir çalışmada; *Azotobacter* ve *Azospirillum* bakterileri ve bu bakterilerin kombinasyonlarının *Brassica juncea* cv. bitkisinde, verim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bakteriler tekli ve ikili kombinasyonlar halinde

uygulanmıştır. Gerek tekli, gerekse kombine uygulamalarda verimde artışlar kaydedilmiştir. Ayrıca, her iki bakterinin yarım doz kombinasyonu ile yapılan uygulamanın ayrı ayrı yapılan uygulamasına oranla bitki gelişimi ve verimi için en iyi sonuç verdiği kanıtlanmıştır.

Öğütçü *et al.* (2010) tarafından yapılan bir çalışmada; çok yıllık yabani nohut (*Cicer anatolicum*) bitkilerinden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* bv. *ciceri* suşlarının simbiyotik etkinlikleri tuzlu şartlarda standart bakteri kültürü, azot uygulaması ve aşısız kontrole kıyaslamalı olarak test edilmiştir. Çalışmada dört farklı suş (DN1, DN7, TN3 ve TN4) kullanılmıştır. Suşlarla aşılansın nohut (*Cicer arietinum* L.) tohumları saksılara ekilerek farklı tuz seviyelerinde (0,50 ve 100 mM NaCl) yetiştirilmiştir. Kök ve sürgün kuru ağırlığı, kök/sürgün oranı, nodul sayısı ve kuru ağırlığı, bitki klorofil ve azot içeriğı, toplam ve fıkse edilen azot miktarı tuz miktarındaki artışla azalmıştır. Tuzlu şartlarda, özellikle 50 mM NaCl uygulamasında, DN7, TN4 ve standart bakteri kültürü ile aşılansın bitkiler, DN1 ve TN3 ile aşılansın bitkilere göre daha yüksek sürgün kuru ağırlığı, nodul kuru ağırlığı, toplam ve fıkse edilen azot miktarına sahip olmuşturlardır. Bu çalışma, yabani nohut bitkilerinden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* bv. *ciceri* suşları ile yapılan aşılamların, nohudun tuzlu şartlardaki gelişim ve dayanıklılığını arttırabileceğini göstermiştir.

Minaxi *et al.* (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; *Bacillus* sp. cinsine ait RM-2 isimli bakteri izolatu kullanılmıştır. Yarı kurak çöllerde, sürdürülebilir tarım için biyoinokulant olarak kullanılan bu bakterinin bitki gelişimini teşvik edici özelliğı tarla ve sera ortamında test edilmiştir. Bu izolatin P çözme, ACC deaminaz aktivitesi, antifungal aktivite, amonyak ve IAA üretimi gibi pek çok yararlı özelliğı tespit edilmiştir. İzolat börölce bitkisinde denenmiş; bu bitkide büyüme ve besin alımı üzerine önemli etkiler yapmıştır. RM-2 şuşu ile aşılansın tohumlarda, özellikle tohum çimlenmesinde artış, kök uzunluğu, taze ağırlık ve kuru ağırlık ve yaprak alanında artış gözlenmiştir. Verim parametreleri saksı denemeleri ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında RM-2 şuşunun, börölce bitkisinin gelişiminde rol oynayan yararlı bakterilere bir örnek oluşturduğı sonucuna varılmıştır.

Piromyou *et al.* (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; biyogübre olarak rol oynayan bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin mısır (*Zea mays*) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmalar için *Pseudomonas* sp. SUT 19 ve *Brevibacillus* sp. SUT 47 bakterileri kullanılmıştır. Denemeler sera ve tarla ortamında organik gübrelerle mukayeseli olarak yürütülmüştür. Denemeler sonucunda PGPR'nin tüm muamelelere kıyasla en iyi sonucu verdiği gözlemlenmiştir.

1-Aminosiklopropan-1-karboksilik asit deaminaz (ACC deaminaz) bitki hormonu olan etilenin öncü maddesini parçalamaktadır. Birçok toprak bakterisi ACC deaminaz aktivitesine sahiptir. Bitki büyümesini teşvik ettiği bilinen bazı *Rhizobacter* türleri de ACC deaminaz üretebilmektedir. Contesto *et al.* (2007) tarafından etilenin sinyal yoluna katılımını araştırmak için yapılan bir çalışmada; model bitki olarak *Arabidopsis thaliana* kullanmıştır. Dört *Rhizobacter* (*Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Pseudomonas putida* UW4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, *Mesorhizobium loti* MAFF303099) ve onların ACC deaminaz aktivitesi olmayan mutantları ile indüklenen kök yapısı ve uzunluğundaki değişiklikler karşılaştırılmıştır. Tüm mutantlar lateral kök gelişiminde aynı değişikliklere yol açtıkları halde ACC deaminaz aktivitesine sahip mutant suşlar ile yapılan inokulantların kök tüyleri ACC deaminaz aktivitesine sahip olmayan suşlarla yapılan inokulantların kök tüylerine göre anlamlı derecede iyi olduğu gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Bakterilerin izolasyon ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), tryptone soy agar (TSA) gibi genel besiyerleri, OXOID, FLUKA, MERCK ve SIGMA firmalarından temin edilmiştir. Azot fikse eden bakterilerin belirlenmesi için Mannitol Agar kullanılmıştır (Rao 1977). Mikrobiyal yolla çözünen inorganik fosfat miktarının kalitatif olarak belirlenmesi için NBRIP-BPB (Brom fenol mavisi ilaveli National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) besiyerinin modifiye edilmesi sonucu elde edilen sıvı besiyerleri kullanılmıştır (Mehta and Nautiyal 2000).

Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup MERCK firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Bitki kök ve rizosfer toprağı örneklerinin alınması

Çalışmada kullanılacak bakterilerin izolasyonu için Ekim-Kasım 2010 tarihleri arasında Erzurum (Kampüs içi, Bölge Araştırma Hastanesi yanı, Veterinerlik Fakültesi ve Su Ürünleri Bölümü yanı, Ilıca Şehitlik yanı ve Palandöken Dağı Kent Orman'ı), Kırşehir (Kervansaray Dağı, Karıncalı Köyü Baranlı Dağı ve Çiçekdağı ilçesinden) şehirlerinden çeşitli bitki rizosfer toprak örnekleri alınmış ve plastik poşetler içerisine alınarak laboratuvara taşınan örneklerden, uygun vasatlara ekimler yapılarak izolasyon işlemi başlatılmıştır.

3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar:

Saf su üretme cihazı	: Nüve NS 112
Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Çalkalamalı inkübatör	: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B
Vorteks	: IKA, U. S. A., MS2
Hassas terazi	: Denver, GERMANY, TP- 214
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50
İnkübatör	: Memmert, GERMANY, INBE 410 1583
Manyetik karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418
Spektrofotometre	: Shimadzu, JAPAN, RC 232C
pH metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321
Steril kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
Elektrikli mikroskop	: Boeco BM-180, Germany

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir:

1. Mannitol agar: Serbest azot fiksasyonu yapan bakterilerin izolasyonu için Rao (1977) Mannitol Agar besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla, 20 g mannitol, 0,2 g K_2PO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g NaCl, 0,1 g K_2PO_4 , 5 g $CaCO_3$ ve 15 g agar 1000 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Otoklavda $121^\circ C$ 'de 15 dk steril edilmiş ve karışım petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

2. %25'lik Gliserin: 25 ml steril distile su içerisine 25 ml gliserin ve 50 ml nutrient broth eklendikten sonra karıştırılarak çözünmesi sağlanmış ve 1'er ml'lik eppendorf tüplerinde muhafaza edilmiştir.

3. %3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

4. Kristal violet çözeltisi: 0,5 g kristal violet, 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

5.%0,25 Safranin çözeltisi: 0,25 safranin, 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

6. Aseton-Alkol: 250 ml %95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlanmıştır.

7. Gram iyodu: 1 g iyot ve 2 g KI, 5 ml distile suda çözülmüş, bu karışıma 250 ml distile su ve 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ilave edilerek hazırlanmıştır.

8. Hoagland besiyeri: Saksı deneylerindeki bitkileri sulamak ve besinlerini temin etmek için kullanılan Hoagland çözeltisi, Hoagland'ın (1989) belirttiği formüle göre hazırlanmış olup, besin içeriği aşağıda sunulmuştur:

İçerik	1000 ml için
Makro Elementler	
KNO_3	1.0 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.5 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.25 g
MgSO_4	0.5 g
Mikro Elementler	
H_3BO_3	0.003 g
MnCl_2	0.0015 g
CuSO_4	0.0001 g
H_2MoO_4	0.0001 g
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$	0.0006 g
FeSO_4	0.0003 g
ZnSO_4	0.0003 g

Yukarıdaki elementler 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüş ve elde edilen çözelti steril ortamlarda muhafaza edilmiştir.

9. NBRIP-BPB (Brom fenol mavisi ilaveli National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) besiyeri:

İçerik	1000 ml için
Glikoz	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (Tri Kalsiyum Fosfat)	5 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O (Magnezyum Klorür)	5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Magnezyum Sülfat)	0.25 g
KCl (Potasyum Klorür)	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Amonyum Sülfat)	0.1 g
BPB (Brom fenol mavisi)	0.025 g

Bu çözeltinin hazırlanışında; önce yukarıdaki elementler kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. Daha sonra çözelti pH'sı 7'ye ayarlanıp 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra uygun ısıya kadar soğutulup oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. (Mehta and Nautiyal 2000).

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların (bakterilerin) izolasyonu ve saflaştırılması

Daha önceden çeşitli bitkilerin rizosfer bölgesinden alınan toprak örnekleri ile laboratuvara getirilen bitki köklerine yapışık topraklar iyice karıştırılıp homojenize edildikten sonra her birinden, 10⁻¹–10⁻⁶'lık seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu örneklerin her birinden, daha önce hazırlanan mannitol agarlı besiyeri içeren petrilere, yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petriler oda sıcaklığında 2-4 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda gelişen çok sayıda bakteri kolonileri incelenerek, belirgin morfolojik karakterlerine göre seçildikten sonra nutrient agar içeren petri plaklarına transfer edilmek suretiyle saflaştırılmıştır. Bu bakteriler, potansiyel azot

bağlayıcılar olarak kabul edilmiştir. Her birisine ayrı bir kod numarası verilmiş, gliserinli ortamlarda ve yatık agarlarda muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Asetilen redüksiyon testi

İzolatların nitrogenaz enzim aktiviteleri “asetilen redüksiyon testi” ile belirlenmiştir. Bu amaçla 7 ml kültür sıvısı 25 ml’lik serum şişelerine konulmuş ve 37°C’de 4 gün süreyle plastik tıkaçlı şişelerde inkübe edilmiştir. Daha sonra, her bir şişeye 1 ml asetilen gazı enjekte edilmiş ve aynı şartlarda 3 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1 ml’lik örnekler şişelerden alınarak gaz kromatografisi sistemine aktarılmıştır. Etilen konsantrasyonu “Schimadzu GC-17AAF, V3, 23OV” kromatografi cihazında belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmış, kolon sıcaklığı 100°C’ye ayarlanmıştır. Kolon akış hızı 1.40 olarak uygulanmıştır (Burlage *et al.* 1998).

3.2.3. İnorganik fosfatın (tri kalsiyum fosfat) mikrobiyal yolla çözünmesinde etkili olan mikroorganizmaların kalitatif olarak belirlenmesi

Mannitol agarlı besiyerinde gelişen saf bakteri kültürlerinin her birinden, içerisinde pH’sı otoklav öncesi 7’ye ayarlı 5 ml NBRIP-BPB bulunan tüplere 25 mikrolitre (yaklaşık $0,5-1 \times 10^9$ CFU/ml) inokülasyon yapılarak, çalkalayıcıda 30°C’de ve 180 rpm’de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, kontrol grubu tüplerin (inokülüm yapılmamış tüpler) orijinal mavi renklerinde herhangi bir açılma olmadığı halde, inokülüm yapılan tüplerin bazılarında farklı derecelerde bir renk açılımı meydana gelmiş ve inorganik fosfat ortamında üreyemeyenlerde ise kontrol grubunda olduğu gibi herhangi bir renk değişimi olmamıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. NBRIB- BPB besiyerine ekilen izolatların besiyeri renginde oluşturduğu değişiklikler.

Renginde açılma gözlenen sıvı kültürlerin herbirisi 5000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek bakteriler uzaklaştırılmış, süpernatant saf su ile 1/3 oranında seyreltildikten sonra spektrofotometrede, 600 nm’de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir (Aydoğan 2004; Mehta and Nautiyal 2000).

3.2.4. İzolatların tanısı - karakterizasyonu

3.2.4.a. Kültürel, morfolojik ve biyokimyasal testler

Yapılan testler sonucunda inorganik fosfat çözmede etkili oldukları belirlenen ve azot fikse eden bakteri türlerinin bazı kültürel ve sitolojik özellikleri belirlenmiştir.

Kültürel testler: Koloni morfolojisi: Saflaştırılan bakteri kültürlerinin her birinden alınan örnekler, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine transfer edilmiş ve 25°C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda gelişen kolonilerin şekilleri ve renkleri incelenmiştir (Saygılı 1995).

Hücre morfolojisi: Stoklardan alınan saf bakteri izolatlarının 24 saatlik genç kültürleri geliştirilmiş ve bu kültürlerden preparatlar hazırlanmıştır. Gram ve basit boyama yöntemleri ile boyanan preparatlar mikroskopun immersiyon objektifinde incelenerek bakterilerin gram özelliğine ve hücre şekillerine (çubuk, yuvarlak, virgül vs.) bakılmıştır (Saygılı 1995).

Ayrıca %3'lük KOH çözeltisi kullanılarak yine bakterilerin gram özelliğine bakılmış ve basit boyama yöntemi kullanılarak bakterilerin hücre büyüklükleri ölçülmüştür.

Hareketlilik testi: Saf bakteri izolatlarının 24 saatlik kültürlerinden alınan örneklerin hareketlilik testi, “yarı katı besiyerinde üreme” ve “asılı damlama preparat yöntemi” teknikleri ile gerçekleştirilmiştir (Gök and Martin 1993; Saygılı 1995; Uçar ve Öner 1998).

Endospor testi: Stoklardan alınan saf bakteri strainleri, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine aktarıldıktan sonra 55-60°C’de 24-48 saat süreyle üremeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanmış, 20 kez alevden geçirildikten sonra üzerleri tamamen boyayla kaplanacak şekilde malaşit yeşiliyle boyanmış ve 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Saf su ile 10 sn muamele edildikten sonra, safranin ile preparatın yüzeyi kaplanmış ve 15 sn beklenmiştir. Boyanın fazlası su ile muamele edilerek atıldıktan sonra preparat kurutulmuş ve mikroskopta immersiyon merceği ile incelenmiştir (Temiz 1996).

Katalaz testi: Katalaz enzimi; hidrojen peroksit’i (H_2O_2) H_2O ve O_2 gazına parçalayan bir enzimdir. 24 – 48 saatlik genç bakteri kültürlerinin her birinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerlerine bir damla H_2O_2 damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.4.b. Moleküler metotlar

MIS (Microbial Identification System) analizi: Kùltür ortamında (Standart suni besiyerlerinde) çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı ve gerekse taksonomik yerlerinin belirlenmesi için, yağ asitleri profillerinin kullanılabileceğı, birçok bilimsel çalışma ile kanıtlanmıştır (Wayne Moss *et al.* 1973; Roy 1988; Vauterin *et al.* 1996).

Azot bağlayıcı ve aynı zamanda fosfat çözücülüğü bakımından etkili izolatların MIS analizi aşğıdaki protokole göre yapılmıştır:

Hücre kùltürlerinin hazırlanması: İstenilen özelliklere uygun olarak izole edilip saflaştırılan bakteriler, tanısı yapılmak üzere kodlanarak, nutrient agar (NA) besiyeri içeren petrilere muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bakterilerin yağ asiti profillerinin belirlenmesi için, Trypticase Soy Broth Agar (TSA) besiyeri hazırlanmıştır. Tanısı yapılacak bakteri türlerinin daha önce saflaştırılmış olan kùltürlerinden steril platin öze ile alınan örnekler (tek bir koloniden); ayrı ayrı TSB besiyerlerine transfer edilerek 4 fazlı çizgi ekim yapılmıştır. Petriler silinmeyecek şekilde etiketlendikten sonra 28°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Yağ asiti ekstraksiyonu için gerekli çözeltilerin hazırlanışı: Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole etmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır.

Çözelti 1: Hücre parçalayıcı: Sırasıyla 150 ml metil alkol (HPCL saflığında) ve 150 ml dH₂O, 1 l’lik renkli çözelti şişesine konulmuş, daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit (ACS saflığında) bu çözeltiye eklenip iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 2: Metilleştirme: Sırasıyla 325 ml hidroklorik asit (6,00N) ve 255 ml metil alkol (HPCL saflığında), 1 l’lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 3: Saflaştırma: Sırasıyla 200 ml metil–tert–butil eter (MTBE–HPCL saflığında) 200 ml hekzan üzerine ilave edilerek 1 l'lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 4: Bazik yıkama çözeltisi: Sırasıyla 10,8 g katı sodyum hidroksit (ACS saflığında) 900 ml dH₂O içerisinde, l'lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Yöntem: 1. TSA besiyerinde 25°C'de 24 saat inkübasyon sürecini takiben gelişen bakterilerin, 3 ve 4 numaraları fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir öze ile toplanarak (yaklaşık 40 mg) ağızları teflon kapaklı steril test tüplerine (5 ml'lik) aktarılmış ve kapakları kapatılarak üzerleri etiketlenmiştir.

2. Her bir test tüpüne 1ml çözelti –1 ilave edilerek, 5–10 saniye çalkalandıktan sonra 5 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler tekrar 5–10 saniye çalkalanarak 25 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda beklemeye bırakılmıştır. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

3. Test tüplerine 2 ml çözelti–2 eklenerek 5–10 saniyelik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dk su banyosunda bekletilmiş ve bunu takiben 2 dk süreyle hızlı soğutma uygulanmıştır (- 80°C'de 5dk kadar).

4. Soğutulmuş tüplere 1,25 ml çözelti–3 eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayısı ile çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Yağ asidi metil esterleri asidik fazdan ayrıştırarak organik fazda toplanmasını sağlamıştır. Tüplerin üst kısmındaki asidik faz pastör pipeti yardımıyla atılmış, organik faz muhafaza edilmiştir.

5. En son aşamada ise her bir tüpe 3 ml çözelti–4 ilave edilmiş ve 5 dk süreyle hematoloji çalkalayısı ile çalkalandıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında

bekletilmiştir. Çözelti-4, bazik bir solüsyon olup serbest yağ asidi metil esterlerinin daha saf olarak elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan ve yağ asidi metil esterleri içeren faz, pastör pipeti ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağzıları sıkıca kapatılarak etiketlenmiştir.

6. Ağzıları sıkıca kapatılarak etiketlenen gaz kromatografi tüpleri, MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine göre yerleştirildikten sonra, cihaz çalıştırılarak sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler tek tek analiz edilmiş ve her bakteri için ayrı ayrı olmak üzere tanı sonuçları, bilgisayardan çıktı olarak alınmıştır (Stead 1992; Küfrevioğlu vd 1999).

3.2.5. İzolatların bitki büyümesini teşvik edici potansiyellerini belirlemek amacıyla yapılan saksı deneyleri:

Kültür bitkisi olarak Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm'ünden alınan Aziziye-94 isimli nohut tohumları kullanılmıştır.

3.2.5.a. İnokulum (aşı kültürü) hazırlanması

Kültür bitkilerinin tohumlarına aşılacak inokulumün hazırlanması için stok izolatlar önce nutrient agar besiyerinde 48 saat süreyle üretilmiş ve buradan içerisinde 100 ml steril nutrient broth bulunduran 250 ml'lik erlenmayerlere iki öze dolusu aşılacaktır. Kültürler 28°C'de termostatl çalkalayıcıda 160 devir/dakikada 6 gün süreyle inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır (Pre'vost *et al.* 1987). Bu son kültür, tohumların aşılmasında inokulum olarak kullanılmıştır.

3.2.5.b. Tohumların sterilizasyonu

Tohumlar, aşağıdaki işlemlerden geçirilerek yüzey sterilizasyonuna tabii tutulmuştur: Ekim yapılacak nohut tohumları %10,0'luk sodyum hipoklorid solüsyonu içine

bırakılmış ve yavaş yavaş karıştırılarak 10 dakika kadar bekletilmiştir. Bu süre sonunda nohutlar önce çeşme suyu ile, ardından 3-4 kez steril distile su ile iyice yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar bir gece steril distile su içerisinde bırakılarak su alması sağlanmıştır.

3.2.5.c. Tohumların çimlendirilmesi

Yüzey sterilizasyonu yapılan ve bir gece steril distile su içerisinde bırakılarak su alması sağlanan tohumlar steril kurutma kağıtları ile kaplanmış ve steril fizyolojik saf tuzlu su ile nemlendirilmiş kaplarda 23°C’de 3 gün süre ile çimlendirilmek üzere karanlık ve steril bir ortamda bekletilmiştir. Çimlenme sonrası saksı denemelerinde kullanılmak üzere aynı oranda çimlenen tohumlar seçilmiş ve seçilen bu tohumların ekimi steril kum ile dolu saksılara yapılmıştır.

3.2.5.d. Saksı ve kum sterilizasyonu

Bitkilerin büyümesi için kullanılan kum, suyu berraklaşınca kadar musluk suyuyla yıkanmış ve otoklavda 121°C’de 2 saat süreyle steril edilmiştir. Kum, %95’lik alkole batırılmış pamuk ile dezenfekte edilen saksılara doldurularak, ekime kadar hava kontaminasyonunu önlemek amacıyla ağızları steril kurutma kağıtları ile örtülü olarak saklanmıştır (Beck *et al.* 1993).

3.2.5.e. Denemenin kurulması

Deneme aşısız kontroller (azotsuz hoagland, normal hoagland ve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ilaveli fosfatsız hoagland) ve aşılı kontroller (azotsuz hoagland+inokulum, normal hoagland+inokulum ve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ilaveli fosfatsız hoagland+inokulum) halinde düzenlenmiş ve iki paralel yürütülmüştür. Her bir saksıya 3’er tohum ekilmiş ve saksılar sera şartlarında çiçeklenme dönemine kadar büyütülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Aşılı ve aşısız uygulamaların yapıldığı saksılarda büyütülen nohut bitkileri

Nohut bitkisi 60 gün büyütüldükten sonra, çiçeklenme döneminde bitkilerin hasatı yapılmıştır. Bu aşamada bitkiler kökleri ile birlikte çıkarılarak musluk suyunda yıkanmış; kök ve boy uzunlukları ölçülmüştür. Ayrıca yaprak örneklerinde protein tayini yapılmıştır.

Saksı denemelerinde, kontrol grupları için kullanılan çözeltilerin içerikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Saksı denemelerinde, kontrol grupları için kullanılan çözeltilerin içerikleri

Hogland Çözeltisi (Elementler g/L)	Normal Hoagland (Azot ve fosfat için pozitif kontrol)	Azotsuz Hoagland (Azot için negatif kontrol)	Ca ₃ (PO ₄) ₂ + Fosfatsız Hoagland (Fosfat için negatif kontrol)
Makro Elementler			
KNO ₃ 1.0 g	+	-	+
Ca(NO ₃) ₂ 0.5 g	+	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.25 g	+	-	-
MgSO ₄ 0.5 g	+	+	+
Mikro Elementler			
H ₃ BO ₃ 0.003 g	+	+	+
MnCl ₂ 0.0015 g	+	+	+
CuSO ₄ 0.0001 g	+	+	+
H ₂ MoO ₄ 0.0001 g	+	+	+
C ₄ H ₆ O ₆ 0.0006 g	+	+	+
FeSO ₄ 0.0003 g	+	+	+
ZnSO ₄ 0.0003 g	+	+	+
Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 g	-	-	+

3.2.6. Bitkilerin kök ve boy uzunlukları

Her saksıdan sökülen bitkilerin kök ve boy uzunlukları cetvelle ölçülüp ortalaması alınarak tespit edilmiştir.

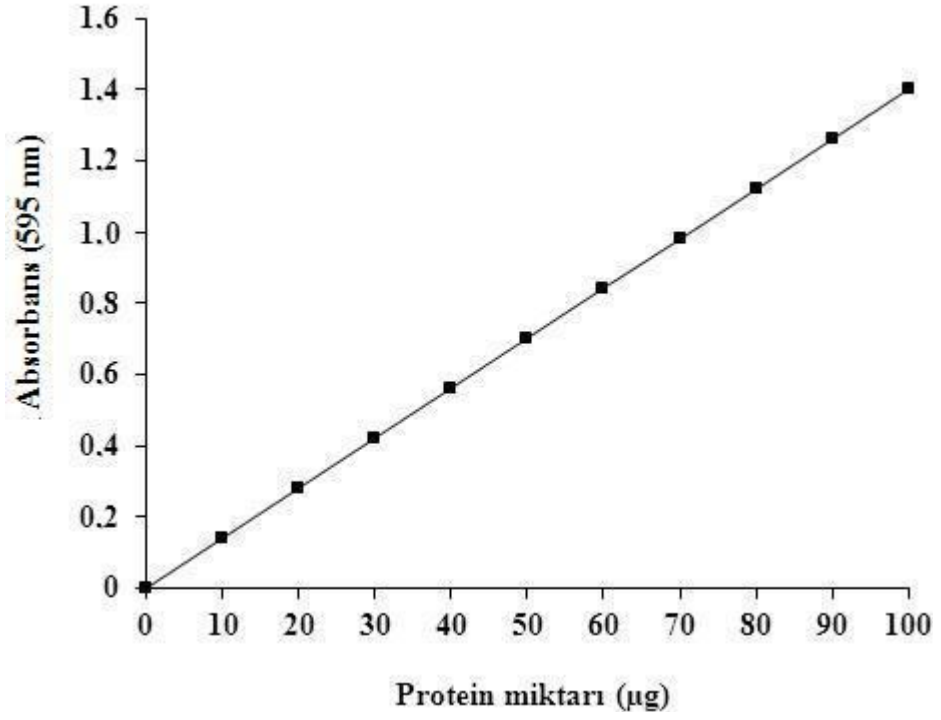
3.2.7. Bitki yaprak dokusunda çözünebilir protein miktarının tayini

Protein tayini, yaprak örneklerinde yapılmış ve Bradford'un belirttiği yöntem uygulanmıştır (Bradford, 1976). Bu amaçla 0,5 g'lık yaprak örnekleri 10 misli hacimdeki 0,05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapılmış ve homojenat dört katlı tülbentten süzöldükten sonra süzöntü 15.000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanılmıştır. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edilmiştir. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlanmıştır; 1ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içeren hacimler tüplere aktarılmış, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0,2ml'ye tamamlanmıştır. Bu tüplere 3'er ml Coomassie Blue G ilave edilip vorteks ile karıştırılmıştır. Kör numune olarak 0,2 ml tampon ve 3 ml Coomassie Blue reaktifinden oluşan karışım kullanılmıştır.

Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm'deki absorbands değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilmiştir (Şekil 3.3). Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki yapraklarından elde edilen özütlerden 0,2 ml alınmış ve 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırılmıştır.

Daha sonra 595 nm'de absorbandsları ölçülerek standart grafikten yardımıyla protein miktarı hesaplanmış ve sonuçlar protein/g doku olarak verilmiştir.



Şekil 3.3. Protein miktarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan standart grafik.

3.2.8. Sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

Denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmış elde edilen değerler SPSS 12.0 istatistik programı kullanılarak LSD çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir (Yıldız 1991).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Potansiyel Etkili İzolatların Seçimi

Bu araştırmada, çeşitli bitkilere ait rizosfer toprağı örneklerinden, toplam olarak 16 izolat elde edilmiştir. Bütün izolatlar, inorganik fosfatı çözebilme özelliğine sahip olup olmadıkları bakımından, 3.2.3’de belirtilen yöntemle test edilmiş ve pozitif sonuç verenler seçilerek Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların inorganik fosfatı çözme etkinliklerinin kalitatif ölçümünden elde edilen bulgular

İzolat No	A (600nm)	İzolat No	A (600nm)
Kontrol	1,934	AS-8	0,535
AS-1	0,085	AS-9	0,519
AS-2	0,351	AS-10	0,533
AS-3	0,525	AS-11	0,563
AS-4	0,359	AS-12	0,581
AS-5	0,460	AS-13	0,576
AS-6	0,499	AS-14	0,611
AS-7	0,264	AS-15	0,656
		AS-16	0,681

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi fosfat çözücü özelliğı bakımından en etkili izolatlar sırasıyla AS-1 (0,085), AS-7 (0,264) ve AS-2 (0,351)’dir. Diğer 13 izolat da belirli düzeylerde $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ’yi çözücü özelliğı sahiptir.

Diğer taraftan, izolasyonun ilk aşamasında, örnekler azotsuz artama aşılandığından, üreyen bütün bakterilerin azot bağlama potansiyeline sahip oldukları (yani tüm izolatların azot bağlayabildikleri) varsayılabilir. Ancak bu kanaate varmak için ayrıca “azot bağlayıcı özelliğın kesin tanısı” amacıyla kullanılan “asetilen redüksiyonu testi” uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. İzolatların Asetilen Redüksiyon Testine Göre Oluşturdukları Etilen Miktarı

İzolat No	Etilen (nmol/mg.h)	İzolat No	Etilen (nmol/mg.h)
AS-1	128	AS-9	37
AS-2	165	AS-10	42
AS-3	77	AS-11	18
AS-4	68	AS-12	13
AS-5	47	AS-13	16
AS-6	35	AS-14	8
AS-7	50	AS-15	7
AS-8	22	AS-16	14

Çizelgeden de görüldüğü gibi, asetilen redüksiyon testine göre en yüksek düzeyde azot bağlayıcı özelliğe sahip olan izolat AS-2 (165)' dir. Bunu sırasıyla AS-1 (128) ve AS-4 (68) izolatları izlemektedir. Çizelge 4.1'de verilen ve fosfat çözücü özelliği bulunan bütün izolatların aynı zamanda az çok azot da bağlayabildikleri görülmektedir. Dolayısıyla, yukarıdaki bulgular ışığında çalışmanın bundan sonraki kısmında bu potansiyel etkili izolatlar kullanılmıştır.

4.2.Potansiyel Etkili İzolatların Çeşitli Özellikleri

Etkili izolatların toplandıkları bölge, hangi bitki rizosferinden elde edildikleri ve MIS analizine göre isimleri Çizelge 4.3'de, bu izolatların bazı kültürel ve sitolojik özellikleri ise Çizelge 4.4'de, Şekil 4.1'de ve 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların izole edildiği habitatlar ve mıs verilerine göre bilimsel adları

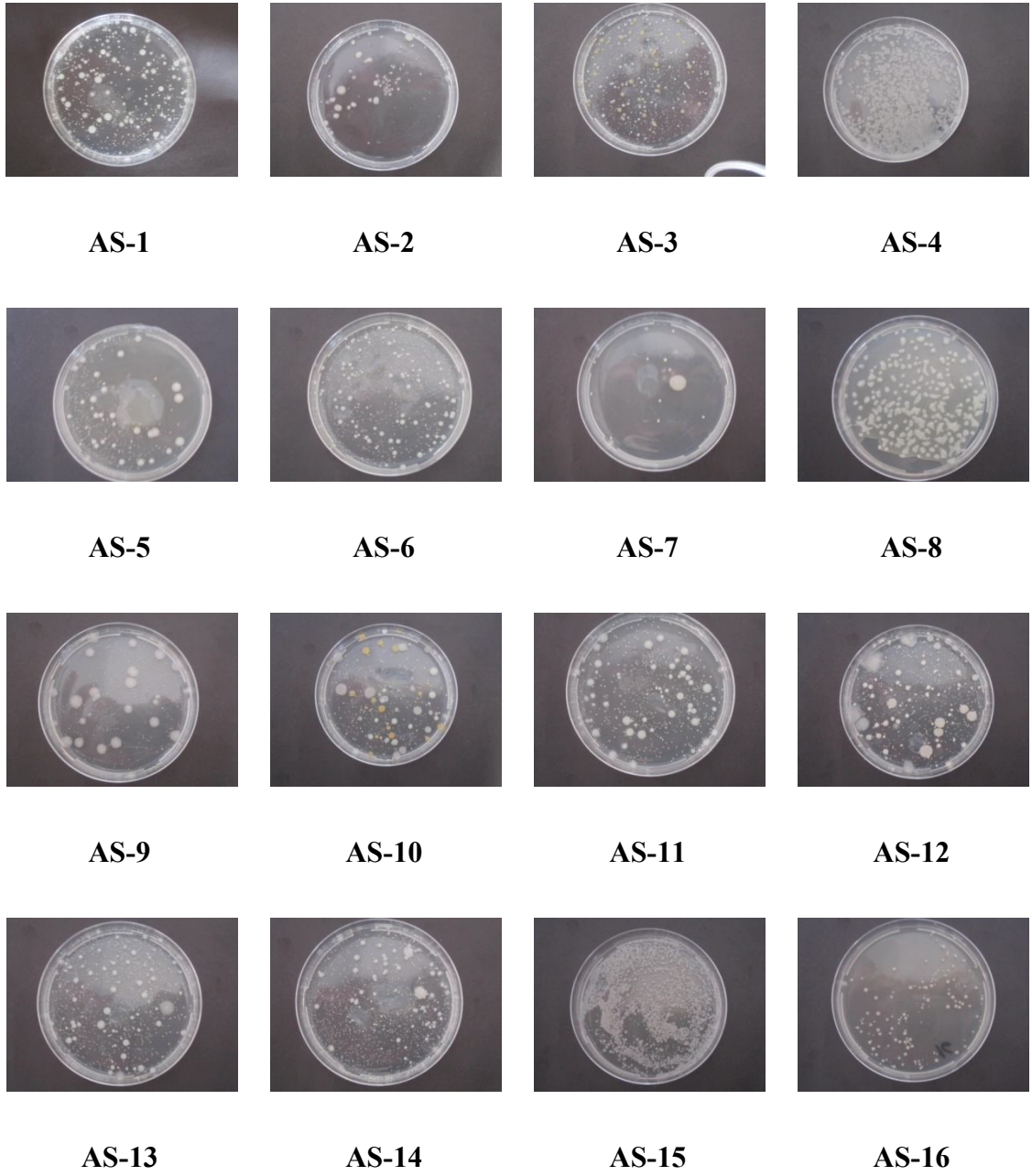
İzolat kodu	Toplandığı Bölge	Bitki Türünün Bilimsel Adı	Bitki Türünün Türkçe Adı	MIS sonuçlarına göre ismi
AS-1	Erzurum Atatürk Üniversitesi Kampüs İçi	<i>Scorzonera hispanica L.</i>	Sakız Otu	<i>Cellulomonos turbata</i>
AS-2	Erzurum Atatürk Üniversitesi Kampüs içi	<i>Xeranthemum inapertum</i>	Ölmez Otu	<i>Bacillus megaterium</i>
AS-3	Erzurum Palandöken Dağı Kent Ormanı	<i>Astragalus microcephalus</i>	Boz geven	<i>Pseudomonas putida</i>
AS-4	Kırşehir Kervansaray Dağı	<i>Xeranthemum annum</i>	Kağıt Çiçeği	<i>Bacillus cereus</i>
AS-5	Kırşehir Çiçekdağı	<i>Verbascum sp.</i>	Sığır Kuyruğugiller	<i>Neisseria mucosa</i>
AS-6	Erzurum Palandöken Dağı Kent Ormanı	<i>Echium italicum</i>	Engerek Otu	<i>Enterobacter cloacae</i>
AS-7	Kırşehir Karıncalı Köyü Baranlı Dağı	<i>Verbascum sp.</i>	Sığır Kuyruğugiller	Salkım kok
AS-8	Kırşehir Kervansaray Dağı	<i>Artemisia absintium</i>	Pelin Otu	<i>Bacillus megaterium</i>
AS-9	Erzurum Palandöken Dağı Kent Ormanı	<i>Centaures sp.</i>	Peygamber Çiçeğigiller	<i>Bacillus mycoides</i>
AS-10	Erzurum Ilıca (Şehitlik yanı)	<i>Mentha longifolia</i>	İt Nanesi	<i>Enterobacter cloacae</i>
AS-11	Kırşehir Çiçekdağı	<i>Alkanna sp.</i>	Hava civa Otugiller	<i>Vibrio furnissii</i>
AS-12	Kırşehir Çiçekdağı	<i>Onosma sp.</i>	Emzik Otugiller	<i>Bacillus cereus</i>
AS-13	Erzurum Palandöken Dağı Kent Ormanı	<i>Dipsacus sylvestris</i>	Yabani Fesçittarağı	<i>Bacillus cereus</i>
AS-14	Erzurum Bölge Araştırma Hastanesi Yanı	<i>Senecio sp.</i>	Kanarya Otugiller	<i>Bacillus cereus</i>
AS-15	Erzurum Palandöken Dağı Kent Ormanı	<i>Euphorbia sp.</i>	Sütlegengiller	<i>Bacillus megaterium</i>
AS-16	Kırşehir Çiçekdağı	<i>Verbascum sp.</i>	Sığır Kuyruğugiller	<i>Bacillus megaterium</i>

Potansiyel etkili izolatlardan 8 tanesi (AS-1, AS-2, AS-3, AS-9, AS-10, AS-13, AS-14 ve AS-15) Erzurum ve civarındaki bölgelere ait topraklardan, diğer 8 izolat ise (AS-4, AS-5, AS-6, AS-7, AS-8, AS-11, AS-12 ve AS-16) Kırşehir ve civarındaki bölgelere ait topraklardan elde edilmiştir.

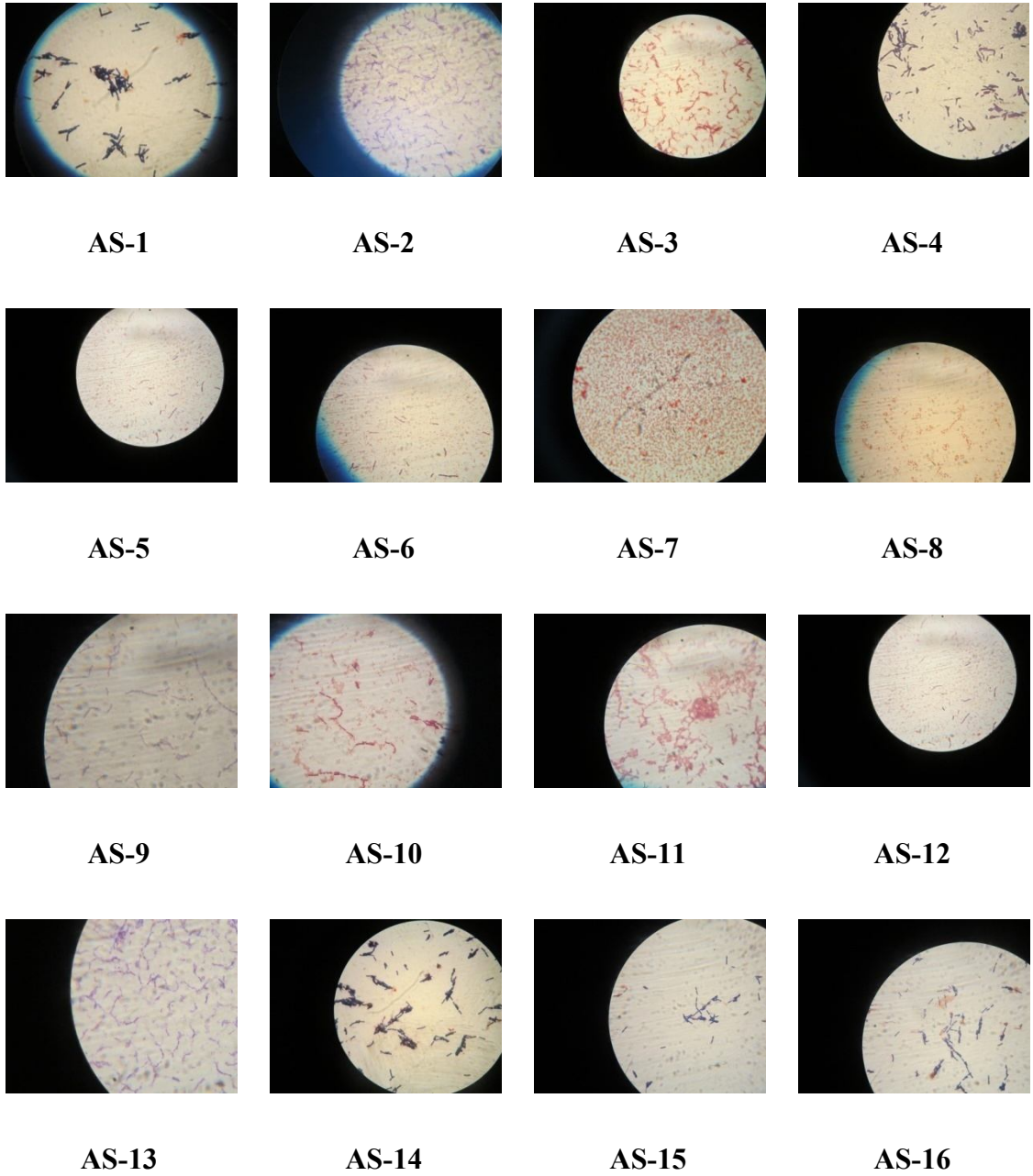
Çizelge 4.4. Potansiyel etkili izolatların bazı kültürel ve sitolojik özellikleri

ÖZELLİKLER	AS-1	AS-2	AS-3	AS-4	AS-5	AS-6	AS-7	AS-8
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Diplokok	Çubuk	Kok Salkım	Çubuk
Koloni özelliği	Parlak	Mukoid	Parlak sarı	Mat	Mukoid	Mukoid	Mat	Mukoid
Gram özelliği	+	+	-	+	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+
Endospor	-	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+

ÖZELLİKLER	AS-9	AS-10	AS-11	AS-12	AS-13	AS-14	AS-15	AS-16
Hücre şekli	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk	Çubuk
Koloni özelliği	Parlak	Parlak turuncu	Mukoid	Mukoid	Mukoid	Mukoid	Mat	Parlak
Gram özelliği	+	-	-	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+
Endospor	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+



Şekil 4.1 İzolatların nutrient agar içeren besiyerinde oluşturduğu koloniler



Şekil 4.2 İzolatların basit boyama ile görüntülenen hücre şekilleri

Çizelge ve şekillerden, 9 izolatın gram pozitif; 7 izolatın ise gram negatif özellikte olduğu, 14 izolatın çubuk şeklinde; bir izolatın koklar halinde, bir izolatın da diplokoklar halinde olduğu, bütün izolatların katalaz enzimi ürettiği ve hareketli oldukları görülmektedir. MIS analizi sonuçlarına göre izolatlardan 9 tanesi *Bacillus*

cinsine aittir. *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria* ve *Vibrio* 1'er türle ve *Enterobacter* cinsi 2 türle temsil edilmektedir. AS-7 izolatu ise MIS sistemi ile tanımlanamamıştır. MIS analizi sonuçlarına göre, izolatların yağ asiti profilleri Çizelge 4.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Potansiyel etkili izolatların mis sistemine göre içerdikleri yağ asiti çeşitleri ve bulunma oranları

YAG ASİTLERİ	AS-1	AS-2	AS-3	AS-4	AS-5	AS-6	AS-7	AS-8
10: 0								
10: 03 OH			2.43					
12: 0			2.00		9.78	4.54		3.16
12: 0 2 OH			3.74					
12: 0 3 OH			2.44					
12: 0 ISO								
13: 0 ISO				9.43	5.60		11.27	
13: 0 ANTEİSO								
14: 0	4.76		1.88	5.18		5.59	4.16	
14: 0 ISO				4.19			18.05	
15: 0								
15: 0 2 OH								
15: 0 ISO	33.60	21.38		33.76			30.93	49.02
15: 0 ANTESİO	53.41	68.32		3.54			2.67	38.57
16: 0	8.23	3.25	27.08	3.61	24.45	26.70		1.82
16: 0 N ALCOHOL								
16: 1 w7c ALCOHOL								
16: 0 ISO				4.52			3.66	
16: 1 w5c								
16: 1 w11c		7.05						
17: 0						0.48		
17: 0 ANTESİO								4.29
17: 0 CYLO			3.94			4.73		
17: 0 ISO				5.46				3.13
17: 1 w8c								
18: 0								
18:1 w7c			26.83		25.59	25.41		
18:1 w9c								
18:3 w6c								
ISO 17: 1 w10c				3.94			2.02	
ISO 17: 1 w5c				6.53			5.32	

Çizelge 4.5. (devam)

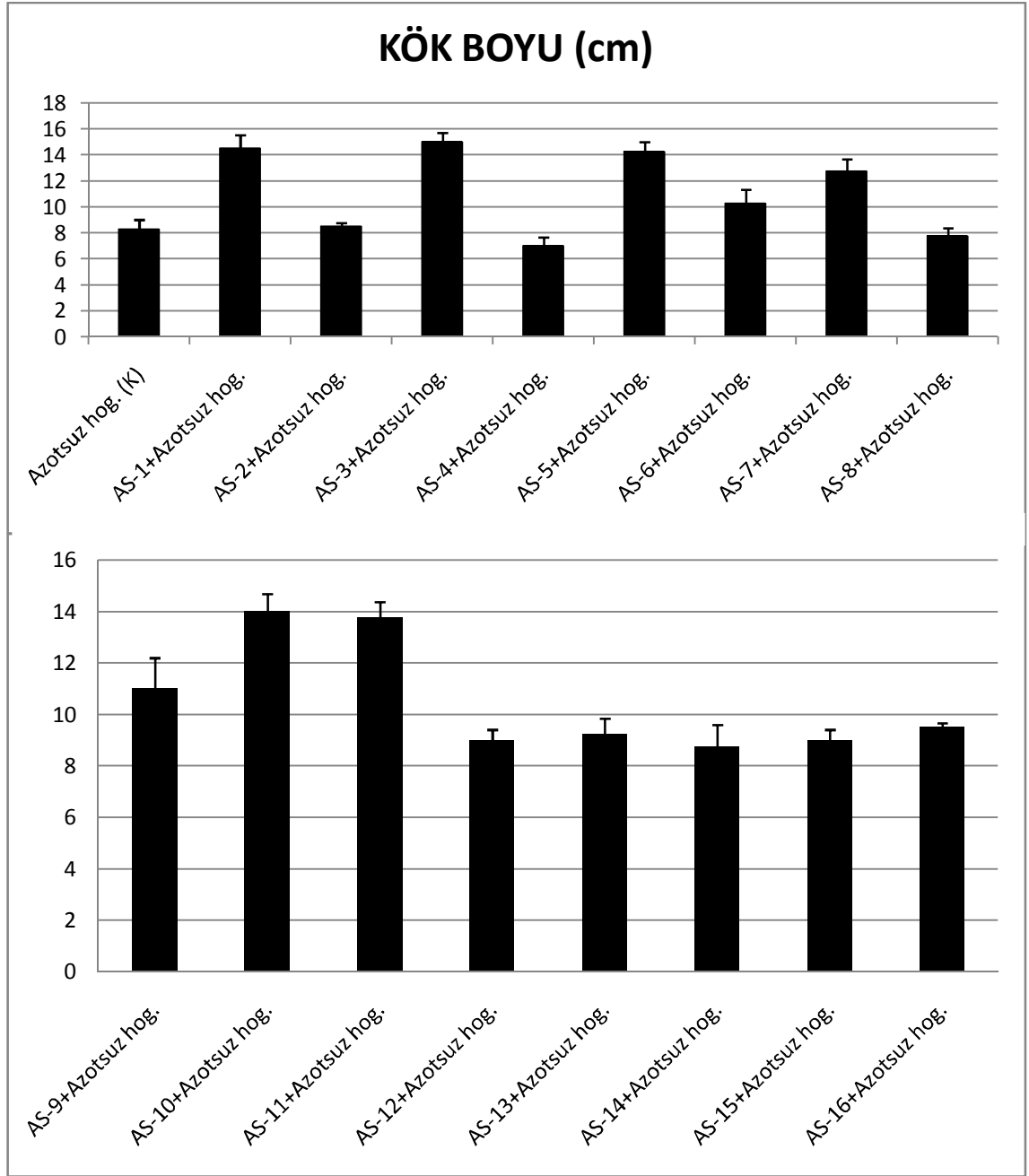
YAĞ ASİTLERİ	AS-9	AS-10	AS-11	AS-12	AS-13	AS-14	AS-15	AS-16
10: 0								
10: 03 OH		0.88						
12: 0	2.87	3.60	3.90	4.20	4.10	5.04	3.34	3.32
12: 0 2 OH		0.97						
12: 0 3 OH		0.98						
12:0 ISO				0.57	0.51	0.49		
13: 0 ISO	12.96	0.73	1.80	9.76	9.71	11.35	1.01	1.00
13: 0 ANTEISO	1.43			1.02	1.00	1.14		
14: 0	4.18	3.89	6.07	5.71	5.69	3.49	0.82	0.78
14: 0 ISO	3.38	0.61				2.46	0.47	0.45
15: 0		0.78						
15: 0 ISO	31.43	1.72	7.84	32.18	31.10	33.52	58.16	58.12
15: 0 2 OH				0.82	0.78	0.33		
15: 0 ANTEISO	3.95			3.33	3.30	4.50	26.62	24.45
16: 0	8.03	25.15	22.16	2.99		4.24	1.35	1.30
16: 0 N ALCOHOL								
16: 1 w7c ALCOHOL				0.56	0.55		0.25	0.23
16: 0 ISO	4.37	0.49		4.09	4.07	2.94	0.56	0.50
16: 1 w5c						0.72		
16: 1 w11c						0.55	0.59	0.45
17: 0		0.39						
17: 0 ANTEISO				0.38	0.35	0.87	2.15	2.11
17: 0 CYLO		2.64	1.33					
17: 1 ANTEISO A				0.77	0.72	0.66		
17: 0 ISO	7.94		1.42	3.73	3.68	6.00	3.44	3.34
17: 1 w8c								
18: 0		0.59						
18:1 w7c		23.75	21.09	0.44	0.37			
18:1 w9c						1.13		
18:3 w6c								
ISO 17: 1 w10c	4.01			2.43	2.41	3.65	0.98	0.91
ISO 17: 1 w5c				5.01		2.20		

Çizelge 4.5 incelendiğinde *Cellulomonas turbata*, olarak tanımlanan AS-1 suşu 14:0; 15:0; 15.0 ANTESIO ve 16:0 yağ asitlerini, *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan

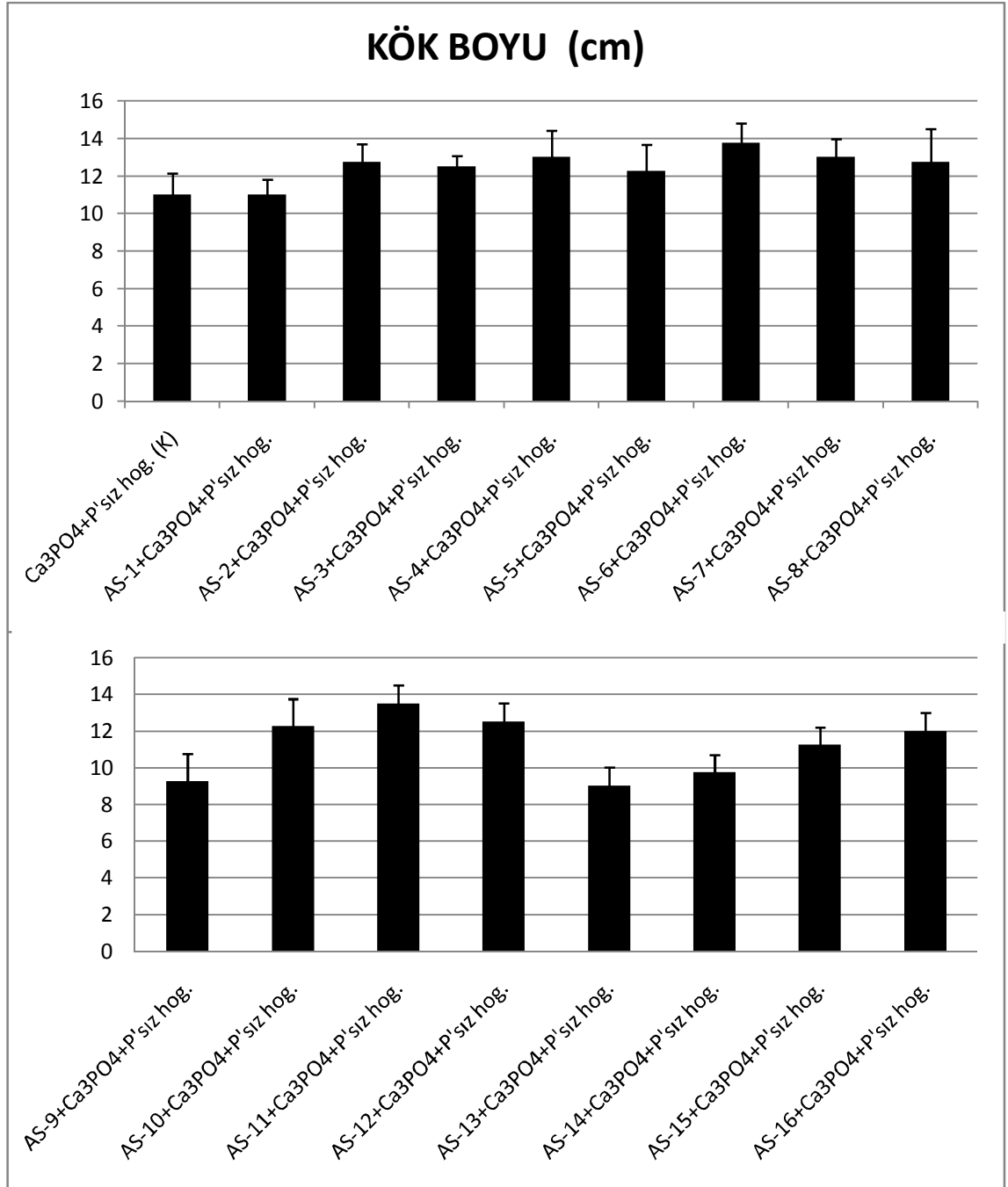
AS-2 suşu 15:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:1w11c yağ asitlerini, *Pseudomonas putida* olarak tanımlanan AS-3 suşu 10:0 3OH; 12:0; 12:0 2OH; 14:0; 16:0; 17:0 CYLO ve 18:1w7c yağ asitlerini, *Bacillus cereus* olarak tanımlanan AS-4 suşu 13:0 ISO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:0 ISO; 17:0 ISO; ISO 17:1w10c ve ISO 17:1w5c yağ asitlerini, *Neisseria mucosa* suşu olarak tanımlanan AS-5 suşu 12:0; 13:0 ISO; 16:0 ve 18:1w7c yağ asitlerini, *Entolabacter cloacae* suşu olarak tanımlanan AS-6 suşu 12:0; 14:0; 16:0; 17:0; 17:0 CLYO ve 18:1w7c yağ asitlerini, *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan AS-8 suşu 12:0; 15:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 17:0 ANTESIO ve 17:0 ISO yağ asitlerini, *Bacillus mycoides* olarak tanımlanan AS-9 suşu 12:0; 13:0 ISO; 13:0 ANTESIO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:0 ISO; 17:0 ISO ve ISO 17:1w10c yağ asitlerini, *Entorobacter cloacae* olarak tanımlanan AS-10 suşu 10:0 3OH; 12:0; 12:0 2OH; 13:0 ISO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0; 15:0 ISO; 16:0; 16:0 ISO; 17:0; 17:0 CLYO; 18:0 ve 18:1w7c yağ asitlerini, *Vibrio furnissii* olarak tanımlanan AS-11 suşu 12:0; 13:0 ISO; 14:0; 15:0 ISO; 16:0; 17:0 CYLO; 17: 0 ISO ve 18:1w7c yağ asitlerini, *Bacillus cereus* olarak tanımlanan AS-12 suşu 12:0; 12:0 ISO; 13:0 ISO; 13:0 ISO ANTEISO; 14:0; 15:0 ISO; 15:0 2OH; 15:0 ANTEISO; 16:0; 16:1w7c ALCOHOL; 16:0 ISO; 17:0 ISO; 17:1 ANTESIO; 17:0 ISO; 18:1 w7c; ISO 17:1 w10c ve ISO 17:1 W5C yağ asitlerini, *Bacillus cereus* olarak tanımlanan AS-13 suşu 12:0; 12:0 ISO; 13:0 ISO; 13:0 ISO ANTEISO; 14:0; 15:0 ISO; 15:0 2OH; 15:0 ANTEISO; 16:0; 16:1w7c ALCOHOL; 16:0 ISO; 17:0 ISO; 17:1 ANTESIO; 17:0 ISO; 18:1 w7c; ISO 17:1 w10c ve ISO 17:1 W5C yağ asitlerini, *Bacillus cereus* olarak tanımlanan AS-14 suşu 12:0; 12:0 ISO; 13:0 ISO; 13:0 ANTESIO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0 ISO; 15:0 2OH; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:0 ISO; 16:1 w5c; 16:1w11c; 17:0 ANTESIO; 17:1 ANTESIO A: 17:0 ISO; 18:3 w6c; ISO 17: 1w10c ve ISO 17:1w5c yağ asitlerini, *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan AS-15 suşu 12:0; 13:0 ISO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:1 w7c ALCOHOL; 16:0 ISO; 16:1 w11c; 17:0 ANTESIO; 17:0 ISO ve ISO 17:1 w10c yağ asitlerini, *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan AS-16 suşu 12:0; 13:0 ISO; 14:0; 14:0 ISO; 15:0 ISO; 15:0 ANTESIO; 16:0; 16:1 w7c ALCOHOL; 16:0 ISO; 16:1 w11c; 17:0 ANTESIO; 17:0 ISO ve ISO 17:1 w10c yağ asitlerini içermektedir.

4.3. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Kök Boyu Uzunlukları

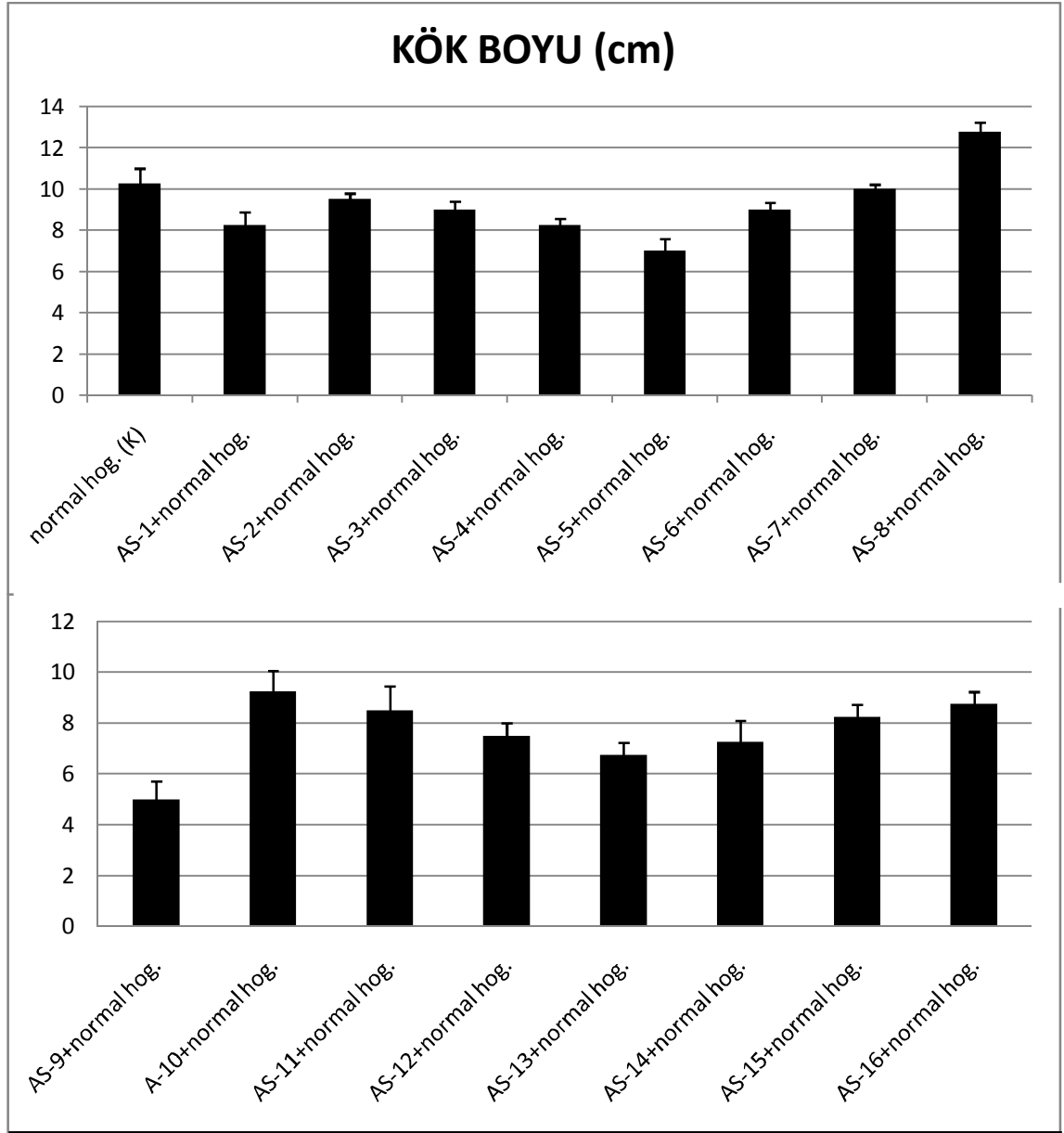
Nohut bitkisinde, farklı izolatlar ile aşılamamanın kök boyu üzerindeki etkileri Şekil 4.3; 4.4 ve 4.5’de verilmiştir. Şekil 4.3’deki Azotsuz hogland grubu, izolatların azot bakımından katkılarını görmek için; Şekil 4.4’deki fosfatsız hogland grubu; izolatların fosfat bakımından katkılarını görmek için negatif kontroller olarak; Şekil 4.5’deki normal hogland grubu ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Şekil 4.3’den görüldüğü gibi azotsuz kontrole göre kök boyu üzerinde maksimum olumlu etkiyi AS-3 (15,00) izolatı sağlamış, bu izolatı sırasıyla AS-1 (14,50), AS-5 (14,25), AS-10 (14,00) ve AS-11 (13,75) izolatları izlemiştir. Şekil 4.4 değerlendirildiğinde, fosfatsız kontrole göre en başarılı izolatlar sırasıyla; AS-6 (13,75), AS-11 (13,50), AS-7 (13,00) ve AS-4 (13,00) izolatlarıdır. İzolatların pozitif kontrol ile karşılaştırılmasını amaçlayan deney sonuçlarını gösteren şekil 4.5 incelendiğinde; sadece AS-8 (17,75) izolatının kontrolden daha yüksek kök boyu oluşumu sağladığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.3. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin azot için negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.4. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin fosfat için negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.5. İzolatlarla aşılamanın kök boyu üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat için pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması

Kök boyu ölçümlerinden elde edilen değerlerin istatistiki analizleri ise Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. Bu veriler ışığında; azotsuz kontrole göre AS-3, AS-1, AS-5, AS-10 ve AS-11 izolatlarının kök boyu artışına katkıları istatistiki bakımdan ($p < 0,05$) düzeyinde önemli bulunmuştur. Gerek fosfatsız kontrole, gerekse pozitif kontrole göre bazı izolatlar kök boylarında artışlara sebep olsa da bu artışların istatistiki bakımdan önemli olmadıkları ($p < 0,05$) da belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Kök boyu ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistiki analizi *

Kök Boyu (cm)	Azotsuz hogland	Ca ₃ (PO ₄) ₂ +fosfatsız hogland	Normal hogland
kontrol	8,25 ±0,78 ^d	11,00 ± 1,15 ^{abc}	10,25 ± 0,75 ^{ab}
AS-1	14,50 ±1,0^{ab}	11,00 ± 0,82 ^{abc}	8,25 ± 0,63 ^{bcd}
AS-2	8,50 ±0,29 ^{cd}	12,75 ± 0,96 ^{ab}	9,50 ±0,29 ^{bcd}
AS-3	15,00 ± 0,7^a	12,50 ± 0,58 ^{ab}	9,00 ± 0,41 ^{bcd}
AS-4	7,00 ±0,68 ^d	13,00 ± 1,41 ^{ab}	8,25 ± 0,31 ^{bcd}
AS-5	14,25 ± 0,75^{ab}	12,25± 1,41 ^{abc}	7,00 ±0,58 ^{bcd}
AS- 6	10,25 ±1,08 ^{bcd}	13,75 ±1,07 ^a	9,00 ±0,22 ^{bcd}
AS-7	12,75 ± 0,95 ^{abc}	13,00 ± 0,97 ^{ab}	10,00 ± 0,48 ^{abc}
AS-8	7,75 ± 0,63 ^d	12,75 ± 1,77 ^{ab}	12,75 ±0,71 ^a
AS-9	11,00 ±1,20 ^{abcd}	9,25 ±1,50 ^{abc}	5,00 ± 0,80 ^e
AS-10	14,00 ± 0,68^{ab}	12,25 ±1,50 ^{abc}	9,25 ± 0,96 ^{bcd}
AS-11	13,75 ± 0,63^{ab}	13,50 ±1,00 ^{ab}	8,50 ± 0,50 ^{bcd}
AS-12	9,00 ±0,41 ^{cd}	12,50 ±1,03 ^{ab}	7,50 ± 0,41 ^{bcd}
AS-13	9,25 ± 0,60 ^{cd}	9,00 ±1,02 ^{bc}	6,75 ±0,60 ^{cde}
AS-14	8,75 ±0,85 ^{cd}	9,75 ± 0,96 ^{abc}	7,25 ± 0,85 ^{bcd}
AS-15	9,00 ± 0,41 ^{cd}	11,25 ±0,96 ^{abc}	8,25 ± 0,48 ^{bcd}
AS-16	9,50 ±0,16 ^{cd}	12,00 ± 1,01 ^{abc}	8,75 ± 0,48 ^{bcd}

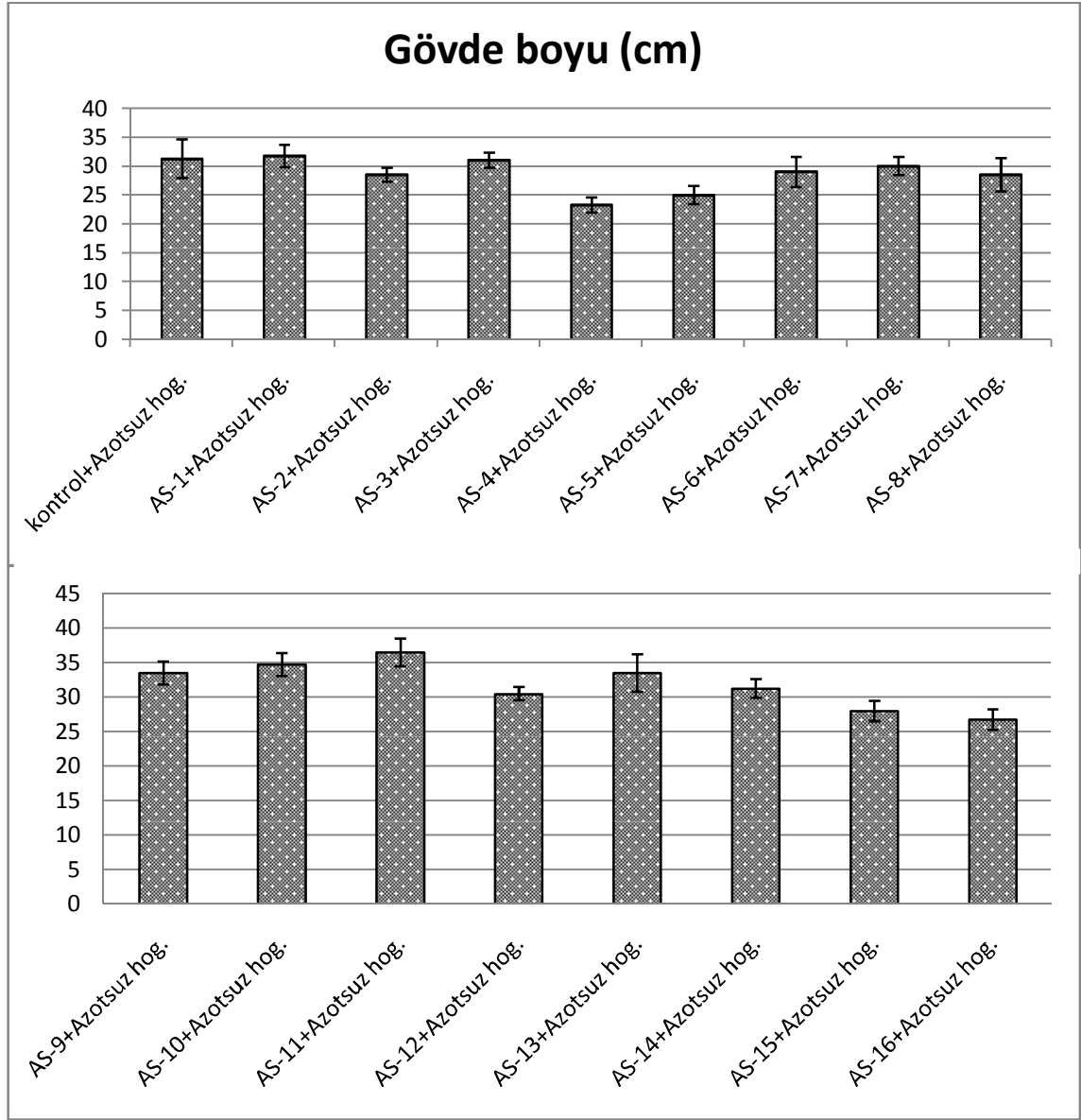
*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir (p<0,05).

4.4. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Gövde Boyu Uzunlukları

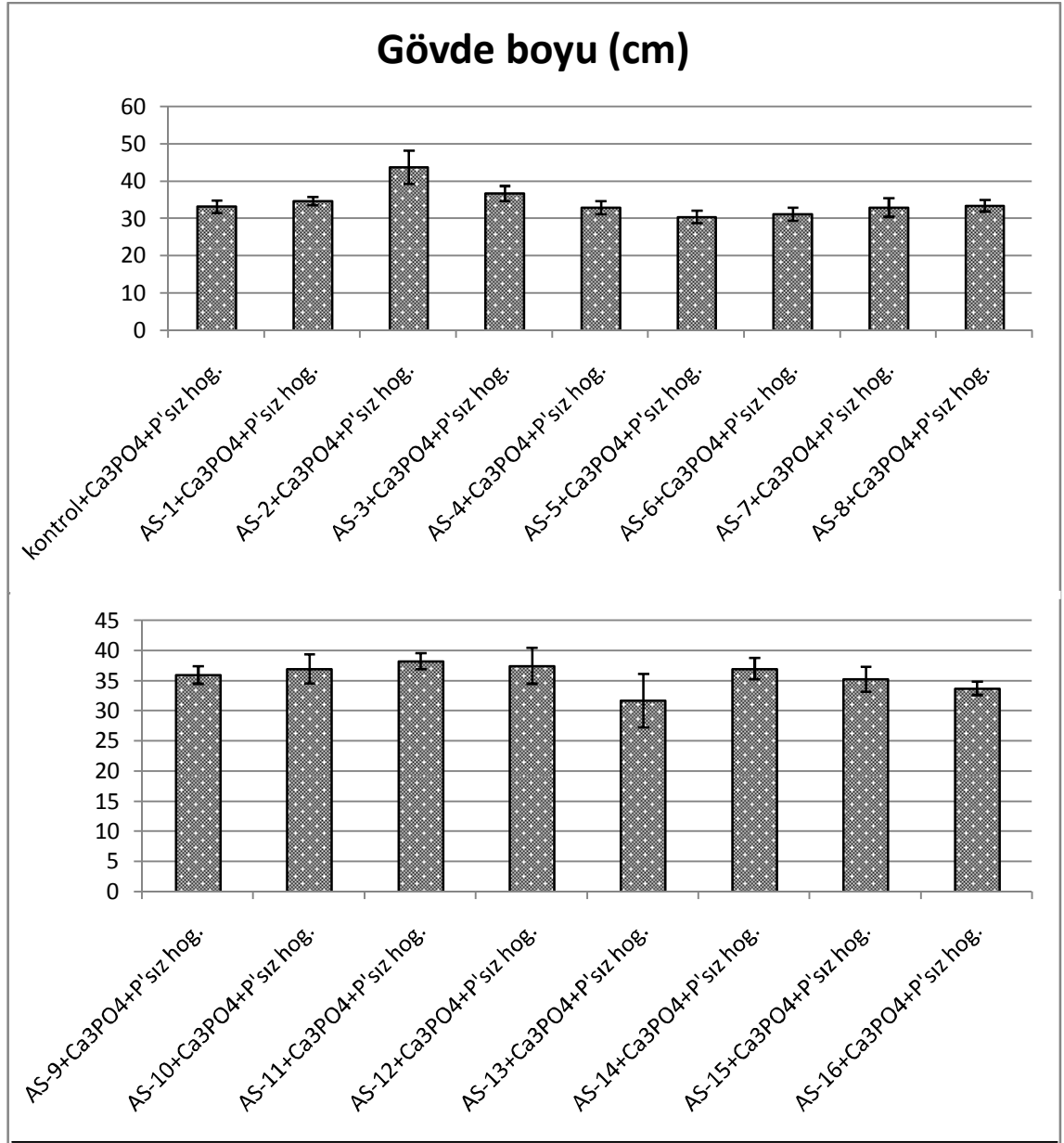
Nohut bitkisinde farklı izolatlar ile aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkileri Şekil 4.6; 4.7 ve 4.8’da özetlenmiştir. Şekil 4.6’dan da görüldüğü gibi azotsuz kontrole göre gövde boyu üzerinde maksimum olumlu etkiyi AS-11 (36,50) izolatı sağlamış, bu izolatı sırasıyla AS-10 (34,75), AS-9 (33,50) ve AS-13 (33,50) izolatları izlenmiştir.

Şekil 4.7 değerlendirildiğinde fosfatsız kontrole göre en başarılı izolatlar sırasıyla AS-2 (43,75), AS-11 (38,25) ve AS-12 (37,50) izolatlarıdır. İzolatların pozitif kontrolle (hem fosfat, hem azot kaynaklarını içeren) karşılaştırılmasını amaçlayan Şekil 4.8 incelendiğinde, hiçbir izolatin pozitif kontrolden daha yüksek değer vermediği, ancak

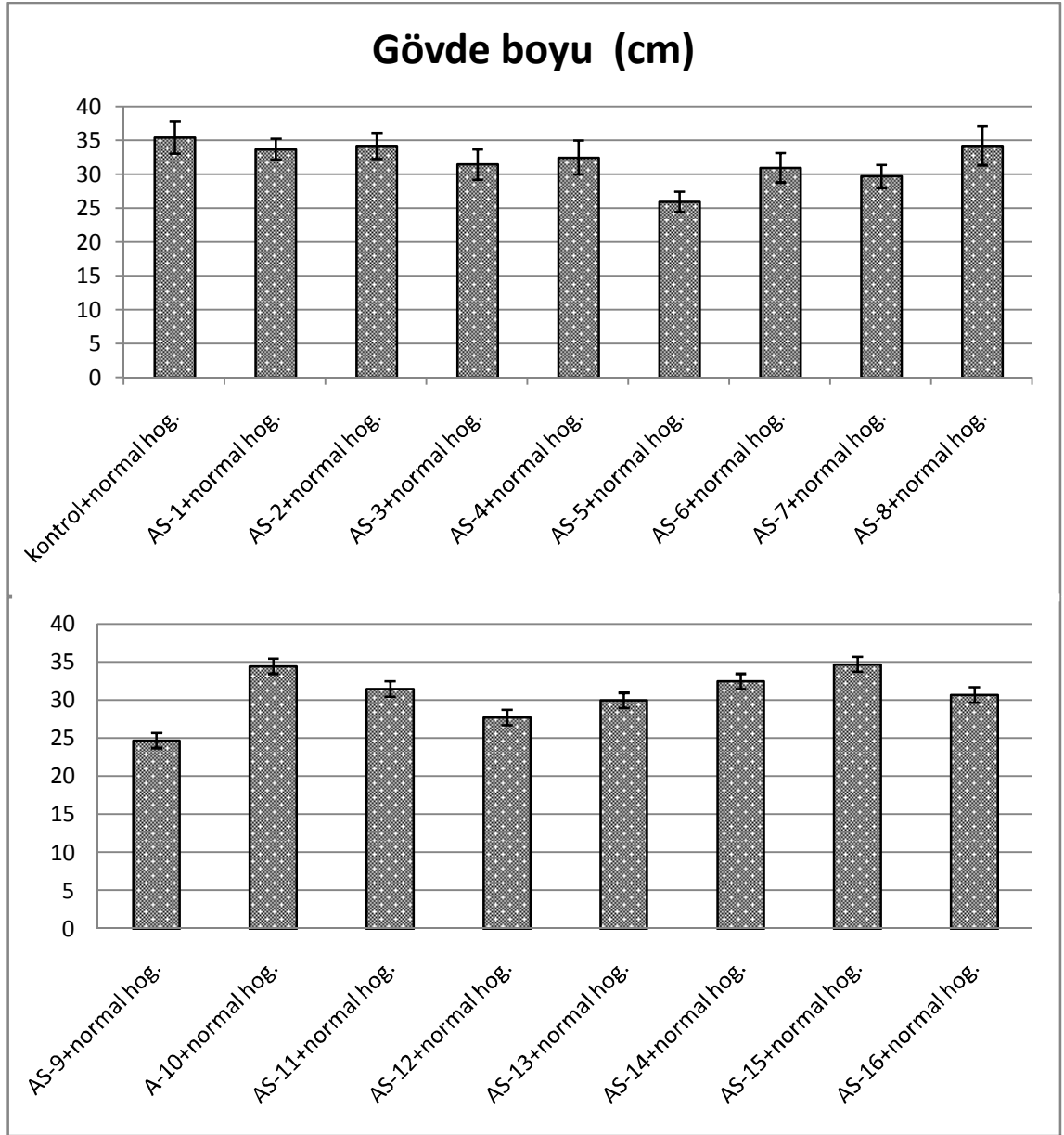
AS-15; AS-10 ve AS-2 izolatlarının kontrole çok yakın gövde boyu oluşumu sağladıkları görülmüştür.



Şekil 4.6. İzolatlarla aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.7. İzolatlarla aşılanmanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.8. İzolatlarla aşılamanın gövde boyu üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması

Gövde boyu ölçümlerinden elde edilen değerlerin istatistiki analizleri ise Çizelge 4.7’de özetlenmiştir. Bu veriler ışığında fosfatsız kontrole göre AS-2 izolatının gövde boyu üzerindeki etkisinin istatistiki bakımdan ($p < 0,05$) düzeyinde önemli olduğu, azotsuz kontrol ve pozitif kontrolle kıyaslandığında başarılı izolatlar olmakla beraber, kontrollere göre değerlerin önemsiz olduğu görülmektedir.

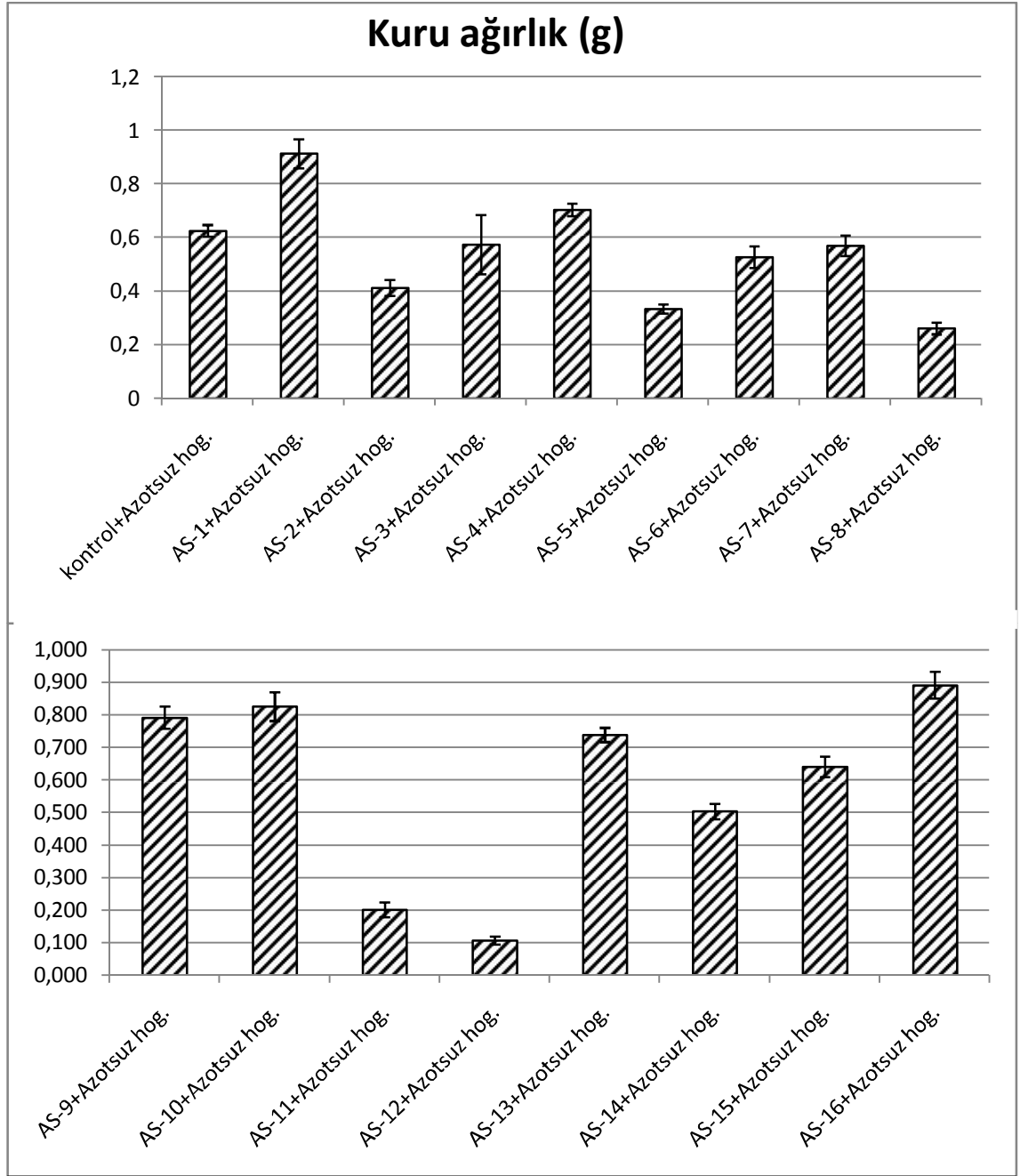
Çizelge 4.7. Gövde boyu ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistiki analizi*

GÖVDE	Azotsuz hogland	Ca ₃ (PO ₄) ₂ +fosfatsız hogland	Normal hogland
kontrol	31,25±3,35 ^{abcde}	33,25±1,65 ^b	35,50±2,39^a
AS-1	31,75±1,93 ^{abcd}	34,75±1,10 ^b	33,75±1,54 ^{ab}
AS-2	28,50±1,19 ^{bcdefg}	43,75±4,46^a	34,25±1,93 ^{ab}
AS-3	31,00±1,29 ^{abcde}	36,75±2,05 ^{ab}	31,50±2,25 ^{abcd}
AS-4	23,25±1,31 ^g	33,00±1,77 ^b	32,50±2,50 ^{abc}
AS-5	25,00±1,58 ^{efg}	30,50±1,65 ^{bc}	26,00±1,47 ^{cde}
AS-6	29,00±2,61 ^{bcdefg}	31,25±1,79 ^{bc}	31,00±2,16 ^{abcd}
AS-7	30,00±1,58 ^{abcdef}	33,00±2,48 ^b	29,75±1,70 ^{abcd}
AS-8	28,50±2,90 ^{cdefg}	33,50±1,55 ^b	34,25±2,86 ^{ab}
AS-9	33,50±1,70 ^{abc}	36,00±1,47 ^b	24,75±0,85 ^{de}
AS-10	34,75±1,65 ^{ab}	37,00±2,41 ^{ab}	34,50±3,66 ^{ab}
AS-11	36,50±2,02 ^a	38,25±1,31 ^{ab}	31,50±1,19 ^{abcd}
AS-12	30,50±0,95 ^{abcdef}	37,50±2,98 ^{ab}	27,75±1,19 ^{bcde}
AS-13	33,50±2,72 ^{abc}	31,75±4,44 ^{bc}	30,00±2,73 ^{abcd}
AS-14	31,25±1,37 ^{abcde}	37,00±1,77 ^{ab}	32,50±3,37 ^{abc}
AS-15	28,00±1,47 ^{cdefg}	35,25±2,05 ^b	34,75±0,85 ^{ab}
AS-16	26,75±1,49 ^{defg}	33,75±1,10 ^b	30,75±1,70 ^{abcd}

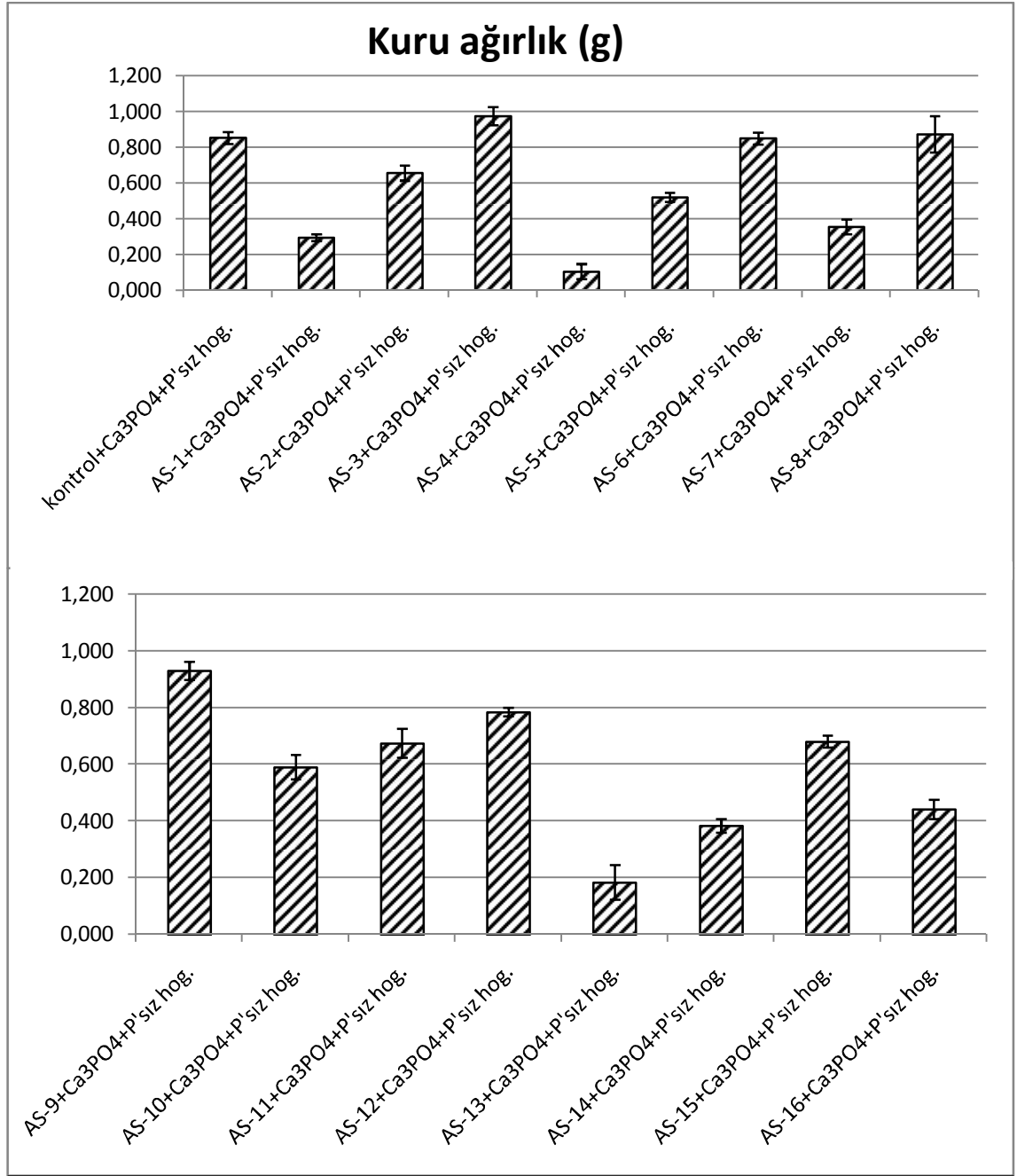
*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir (p<0,05).

4.5. Sakı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Yapraklarındaki Kuru Ağırlık Miktarları

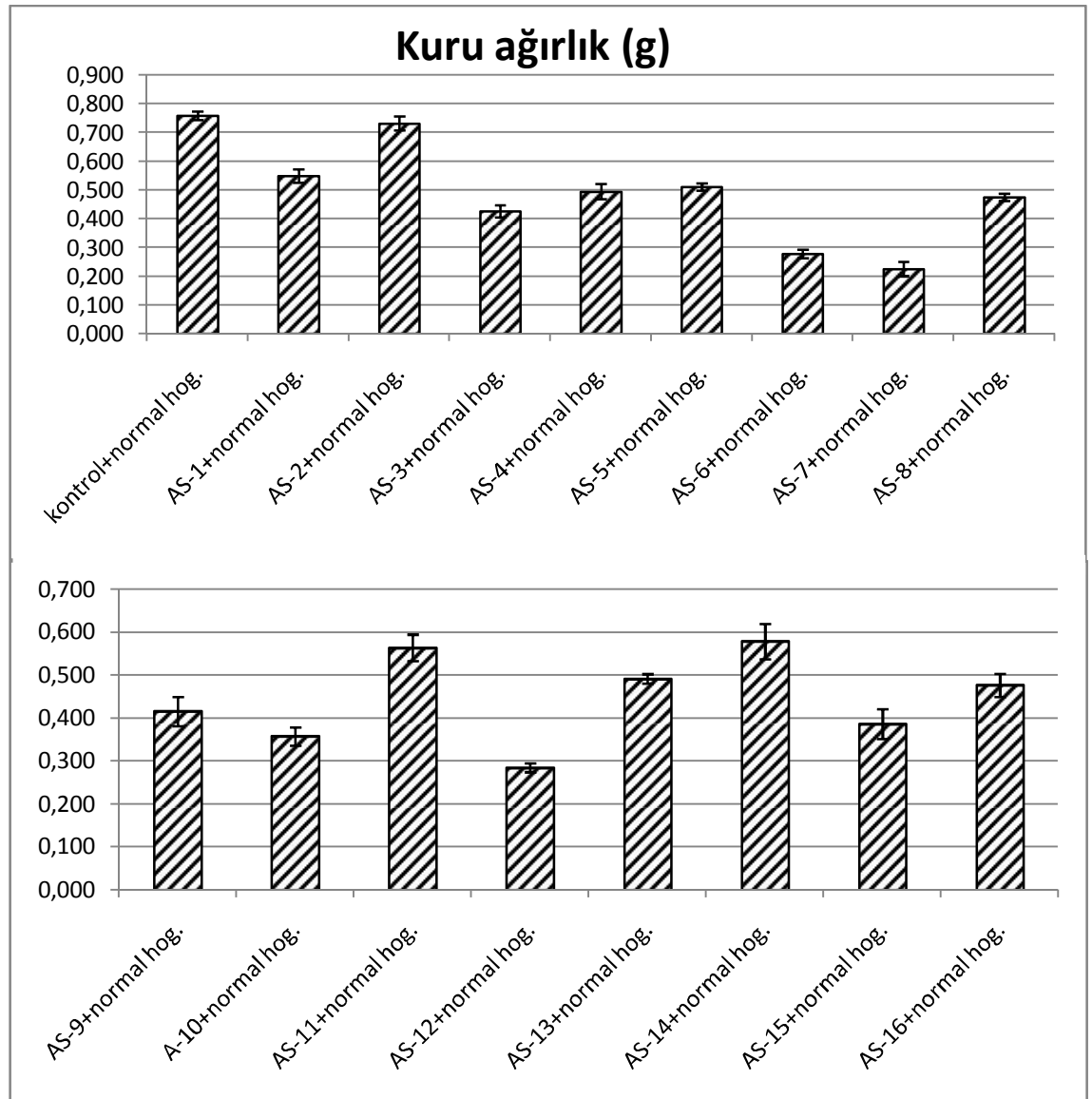
Nohut bitkisinde farklı izolatlar ile aşılamanın, bitki yaprak kuru üzerindeki etkileri Şekil 4.9; 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Şekil 4.9’dan da görüldüğü gibi azotsuz kontrole göre maksimum olumlu etkiyi AS-1 (0,914) izolatı sağlamış, bu izolatı sırasıyla AS-16 (0,891), AS-10 (0,825), AS-9 (0,791), AS-13 (0,738) ve AS-4 (0,704) izolatları izlemiştir. Şekil 4.10 değerlendirildiğinde; fosfatsız kontrole göre en başarılı izolatlar sırasıyla, AS-3 (0,976), AS-9 (0,930) ve AS-8 (0,875) izolatlarıdır. İzolatların pozitif kontrole karşılaştırılmasını amaçlayan deney sonuçlarını gösteren şekil 4.11 incelendiğinde; hiçbir izolatın pozitif kontrolden daha yüksek değer vermediği, ancak AS-2 izolatının kontrole yakın kuru ağırlık oluşumu sağladığı görülmüştür.



Şekil 4.9. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.10. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.11. İzolatlarla aşılamanın nohut yaprağı üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması

Kuru ağırlık ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistiki analizleri ise Çizelge 4.8’de özetlenmiştir. Bu veriler ışığında fosfatsız kontrole göre AS-3; AS-8; AS-9 izolatlarının; azotsuz kontrole göre AS-1; AS-4; AS-9; AS-10; AS-13 ve AS-16 izolatlarının istatistiki bakımdan önemli ($p < 0,05$) artışlar sağladığı belirlenmiştir. Pozitif kontrole göre bazı izolatlar kuru ağırlık üzerinde kontrole yakın etki yapsa da, bu etkinin istatistiki bakımdan önemli olmadığı ($p < 0,05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Kuru ağırlık bulgularının istatistiki analizi*

Kuru ağırlık	Azotsuz hogland	Ca ₃ (PO ₄) ₂ +fosfatsız hogland	Normal hogland
kontrol	0,626±0,022 ^h	0,854±0,03 ^d	0,758±0,015^a
AS-1	0,914±0,054^a	0,296±0,020 ^l	0,549±0,023 ^e
AS-2	0,413±0,030 ^k	0,657±0,042 ^g	0,732±0,024 ^b
AS-3	0,575±0,023 ^l	0,976±0,051^a	0,426±0,021 ⁱ
AS-4	0,704±0,111^f	0,106±0,042 ⁿ	0,495±0,026 ^g
AS-5	0,335±0,023 ^l	0,521±0,025 ⁱ	0,511±0,013 ^f
AS- 6	0,528±0,017 ⁱ	0,851±0,033 ^d	0,278±0,015 ^l
AS-7	0,571±0,040 ⁱ	0,356±0,041 ^k	0,226±0,025 ^m
AS-8	0,262±0,038 ^m	0,875±0,102^c	0,475±0,012 ^h
AS-9	0,791±0,022^d	0,930±0,032^b	0,415±0,016 ⁱ
AS-10	0,825±0,034^c	0,590±0,043 ^h	0,357±0,034 ^k
AS-11	0,201±0,044 ⁿ	0,674±0,051 ^f	0,563±0,021 ^d
AS-12	0,106±0,023 ^o	0,785±0,015 ^e	0,284±0,031 ^l
AS-13	0,738±0,012^c	0,184±0,061 ^m	0,491±0,010 ^g
AS-14	0,503±0,022 ⁱ	0,384±0,024 ^j	0,578±0,011 ^c
AS-15	0,640±0,024 ^g	0,680±0,021 ^f	0,386±0,041 ⁱ
AS-16	0,891±0,032^b	0,442±0,034 ⁱ	0,476±0,035 ^h

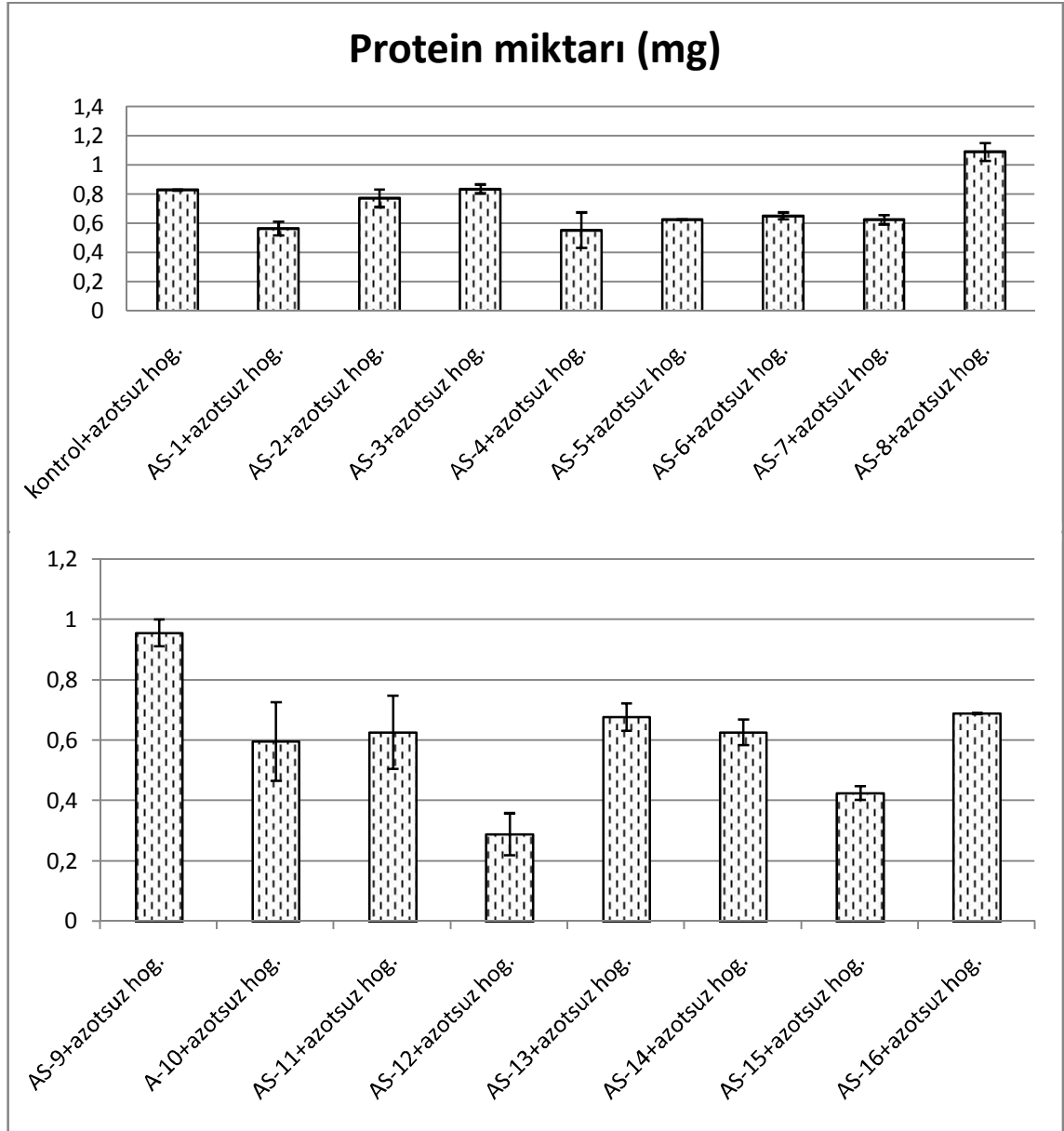
*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir (p<0,05).

4.6. Saksı Denemeleri Sonucunda Elde Edilen Bitki Yapraklarında Çözünmüş Protein miktarı

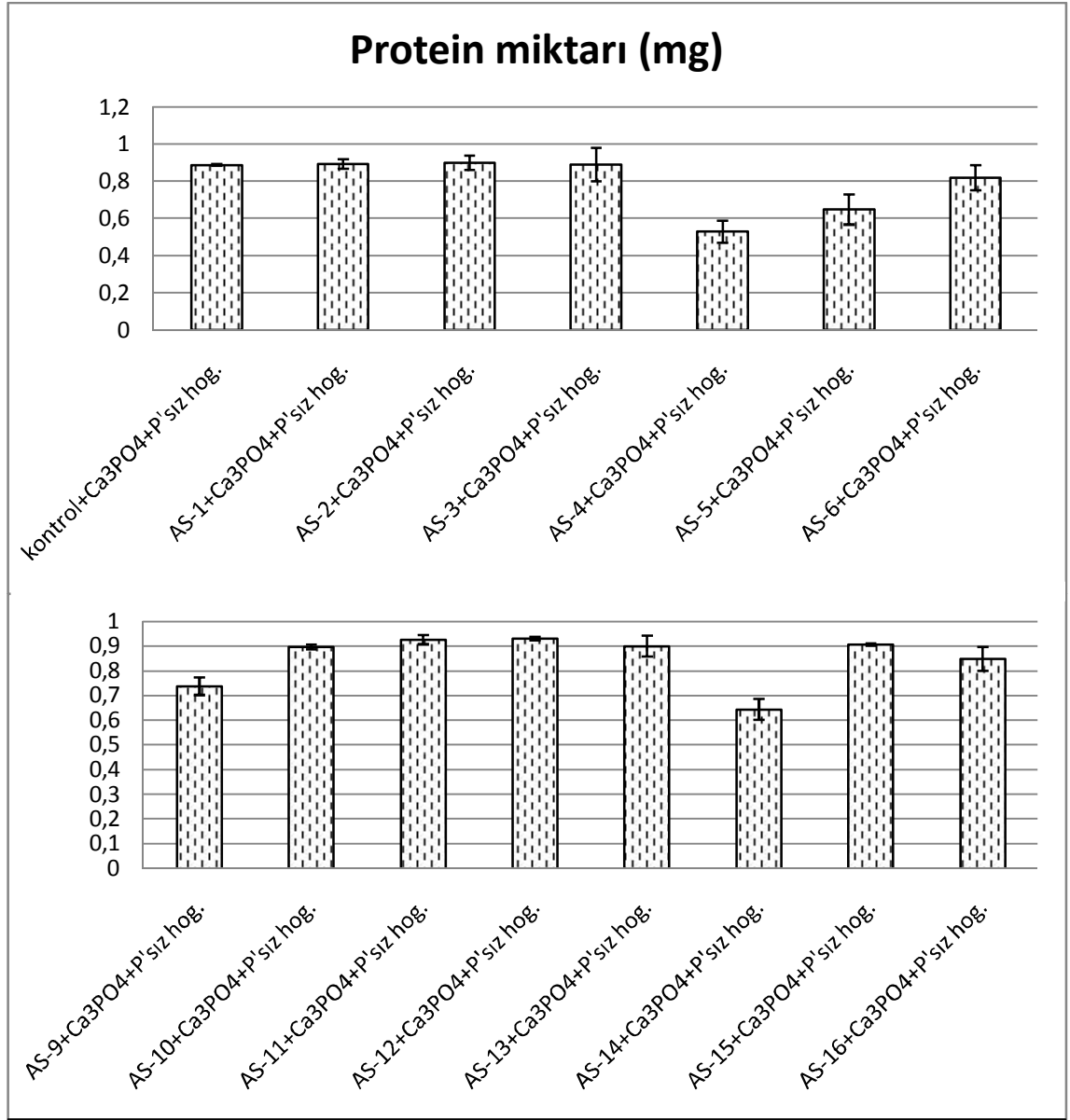
Nohut bitkisinde farklı izolatlar ile aşılamanın bitki protein miktarı üzerindeki etkileri Şekil 4.12; 4.13 ve 4.14’de verilmiştir. Şekil 4.12’den de görüldüğü gibi azotsuz kontrole göre protein miktarı üzerinde maksimum olumlu etkiyi AS-8 (1,089) izolatı sağlamış, bu izolatı AS-9 (0,956) izolatı izlemiştir.

Şekil 4.13 değerlendirildiğinde; fosfatsız kontrole göre en başarılı izolatlar sırasıyla AS-8 (1,457), AS-11 (0,926) ve AS-12 (0,930) izolatlarıdır. İzolatların pozitif kontrol ile karşılaştırılmasını amaçlayan deney sonuçlarını gösteren şekil 4.14 incelendiğinde;

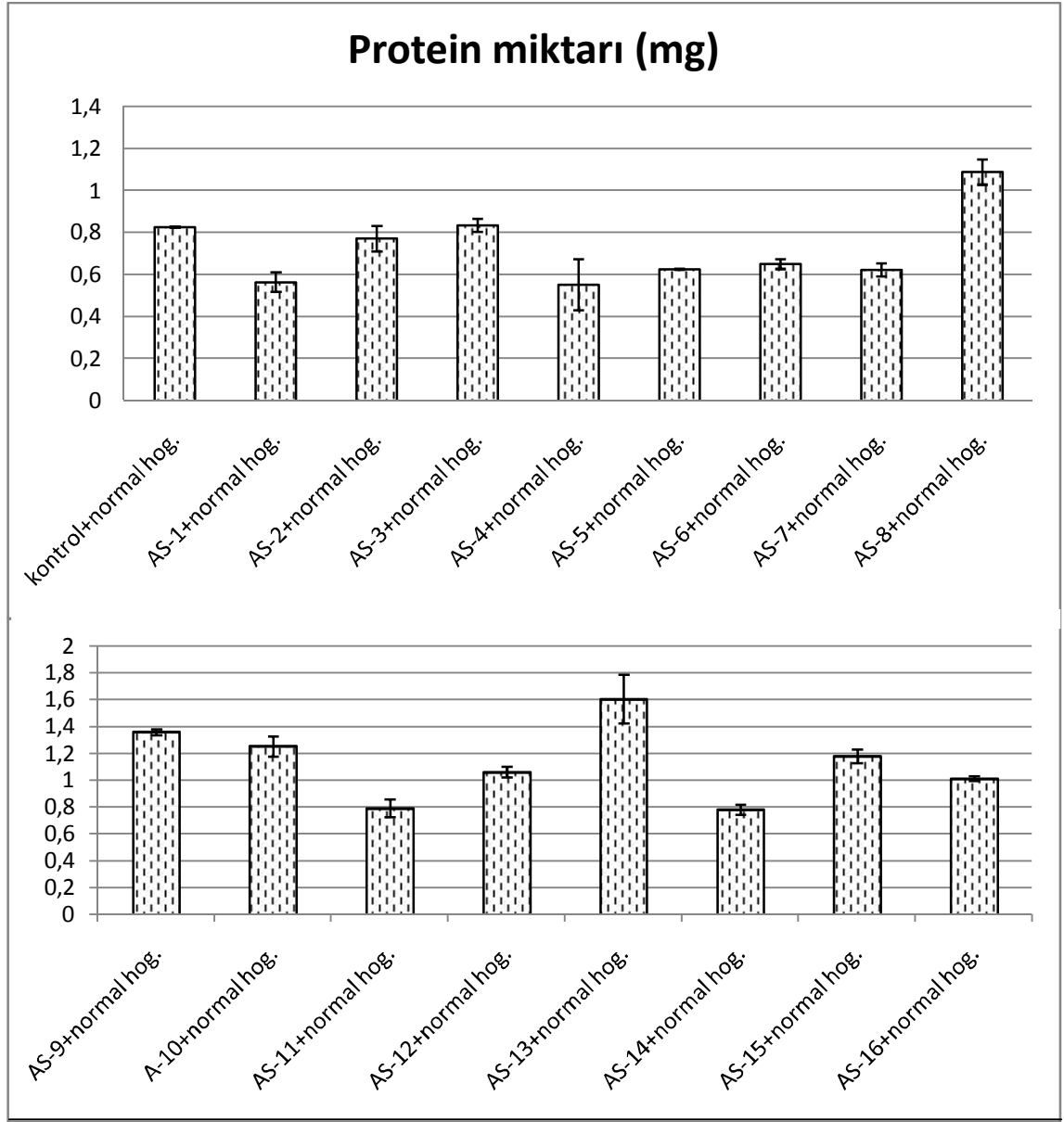
maksimum protein veriminin AS-13 (1,605) izolatından elde edilmekle beraber, diğer çoğu izolatın da kontrole göre yüksek protein oluşumu sağladıkları görülmüştür.



Şekil 4.12. İzolatlarla yapılan aşılamının nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin azot bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.13. İzolatlarla yapılan aşılamanın nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin fosfat bakımından negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 4.14. İzolatlarla yapılan aşılamanın nohut bitkisinde protein miktarı üzerindeki etkilerinin azot ve fosfat bakımından pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılması

Protein miktarı ölçümlerinden elde edilen bulguların istatistikî analizleri ise Çizelge 4.9'da özetlenmiştir. Bu veriler ışığında, fosfatsız kontrole göre AS-8 izolatının, azotsuz kontrole göre AS-8 ve AS-9 izolatlarının, pozitif kontrole göre de AS-5, AS-8, AS-9, AS-10, AS-12, AS-13 ve AS-15 izolatlarının daha yüksek miktarda ve istatistikî bakımdan önemli ($p<0,05$) düzeyde protein artışı sağladıkları görülmektedir.

Çizelge 4.9. Çözünmüş protein miktarı bulgularının istatistiki analizleri*

Protein mg/doku	Azotsuz hogland	Ca ₃ (PO ₄) ₂ +fosfatsız hogland	Normal hogland
Kontrol	0,828±0,002 ^c	0,890±0,004 ^b	0,839±0,107 ^{fghi}
AS-1	0,565 ±0,047 ^g	0,895±0,026 ^b	0,845±0,031 ^{efghi}
AS-2	0,772±0,060 ^{cd}	0,902±0,039 ^b	0,957±0,021 ^{efghi}
AS-3	0,836±0,030 ^c	0,893±0,089 ^b	0,930±0,023 ^{efghi}
AS-4	0,553±0,121 ^g	0,531±0,059 ^e	0,976±0,045 ^{defgh}
AS-5	0,626 ±0,002 ^g	0,649±0,081 ^{de}	1,280±0,047^b
AS-6	0,651±0,023 ^g	0,821±0,068 ^{bc}	0,817±0,007 ^{ghi}
AS-7	0,624 ±0,031 ^g	0,846±0,104 ^{bc}	1,050±0,037 ^{cdef}
AS-8	1,089±0,060^a	1,457±0,135^a	1,273±0,073^b
AS-9	0,956±0,044^b	0,738±0,036 ^{cd}	1,359±0,022^b
AS-10	0,596±0,129 ^g	0,896±0,009 ^b	1,252±0,073^{bcd}
AS-11	0,627±0,121 ^g	0,926±0,018 ^b	0,790±0,066 ^{hi}
AS-12	0,289±0,069 ⁱ	0,930±0,007 ^b	1,060±0,040^{cde}
AS-13	0,678±0,045 ^f	0,900±0,042 ^b	1,605±0,181^a
AS-14	0,627±0,043 ^g	0,644±0,042 ^{de}	0,781±0,038 ^{hi}
AS-15	0,426±0,022 ^h	0,906±0,004 ^b	1,178±0,051^{bcd}
AS-16	0,690±0,001 ^e	0,848±0,047 ^{bc}	1,013±0,019 ^{def}

*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir (p<0,05).

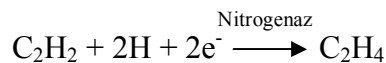
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, çeşitli bitki rizosferlerinden izole edilen bakterilerin, nohut bitkisinde biyoinokülan olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

5.1. İzolatların Azot Bağlama Potansiyelleri

Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerde, bitki büyümesinde olumlu etki sağlayan hemen her çeşit özellik dikkate alınsa da, bu konuda en çok aranan özelliklerin başında “havanın azotunu bağlayıcı özellik” gelmektedir. Bunun sebebi, tarım topraklarının en çok ihtiyacı olan elementin azot olması ve bu eksikliği gidermek için kullanılan kimyasal gübrelerin hem çok pahalı, hem de uzun vadede çevre kirleticisi bir etkiye sahip olmalarıdır. Bu nedenle, son yıllarda serbest azot bağlayıcı özelliğe sahip bakteriler ile aşılama ve biyogübre üretimi çalışmaları hız kazanmıştır. Dolayısıyla, araştırmamızda farklı bitki rizosferlerinden alınan toprak örnekleri, öncelikle azot içermeyen ortama (Subba Rao’nun (1977) mannitol agar azotsuz besiyeri ortamına) ekilerek, bu özellik bakımından dominant bir kültür oluşturulmuştur. Ancak bu yöntemin bazı yanlışlıklara yol açtığı bilindiğinden, azot bağlayıcı özelliği “nitrogenaz” enziminin aktivitesine dayalı olarak ölçme esaslı “asetilen redüksiyon testi” de uygulanmıştır.

Bilindiği gibi optimum koşullar altında indirgenen her bir molekül azot için bir molekül hidrojen serbest bırakılmaktadır. Azot bağlayıcı bakterilerde bulunan nitrogenaz enzimi, hidrojenen başka bazı substratları da indirgeyebilir. Örneğin asetilenin etilen gazına indirgendiği aşağıdaki reaksiyon nitrogenaz enzimi ile gerçekleştirilebilir:



Bu reaksiyon gereği; belirli bir süre içerisinde indirgenen asetilen miktarı (veya oluşan etilen miktarı) nitrogenaz aktivitesinin veya bir başka ifadeyle azot bağlama potansiyelinin bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır.

Bu reaksiyon ve enzimin reaksiyondaki rolü 1966 yılında Dilworth tarafından bulunmuştur (Dilworth *et al.* 1966). Böylece, azot fiksasyonu potansiyelini belirlemek için daha önceki yıllarda kullanılan ve $^{15}\text{N}_2$ ile gerçekleştirilen pahalı ve daha az hassas testler terkedilmiştir. Bu araştırmada azot bağlayıcı özelliği olan 16 izolat incelendiğinde, maksimum nitrogenaz aktivitesini 165 n mol/mg protein/ saat ile AS-2 suşu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bunu sırasıyla AS-1 (128 n mol/mg protein/ saat) ve AS-3 (77 n mol/mg protein/saat) suşları izlemektedir. En düşük aktivite ise AS-15 (7 n mol/mg protein/saat) suşunda görülmüştür.

Daha önce yapılmış araştırmalarda *Azospirillum lipoferum* türü için saatte 1 mg protein için 2,367 n mol; *Entamoeba agglomerans* türü için 90,7 n mol; *Enterobacter* sp. için 52,3 n mol ve *Klebsiella pneumonia* türü için 47,2 n mol'lük etilen gazı değerleri elde edilmiştir (Haathela *et al.* 1981). Çeşitli *Pseudomonas* türleri ile yapılan bir başka araştırmada, etilen miktarı 21,8-3624 n mol/mg protein/saat olarak ölçülmüştür (Naureen *et al.* 2005). Şeker pancarı ve çavdar rizosferlerinden izole edilen *Azospirillum* türlerinin test edildiği bir başka araştırmada ise etilen miktarları 121,3-1221 n mol/mg protein/saat olarak belirlenmiştir (Gangwar and Kaur 2009). Bu değerler ile, araştırmamızda kullanılan AS-1 ve AS-2 izolatlarından elde edilen etilen miktarları karşılaştırıldığında, bizim izolatlarımızın nitrogenaz aktivitelerinin orta düzeyde olduğunu söyleyebiliriz.

5.2. Fosfat Çözücü Özelliğin Belirlenmesi İçin Yapılan Tarama (Screening) Çalışmaları

Bilindiği gibi, bitki büyümesini teşvik edici bakterilerde en çok aranan özelliklerden biri de onların fosfat çözücü özelliğe sahip olmasıdır. Çünkü, bitkilerin büyümesini sınırlayan elementlerden biri de çözünmüş fosforlu bileşiklerdir ve ne yazık ki tarım

arazilerinin toprakları bu bileşikler bakımından fakirdir. Diğer taraftan, toprakta birçok fosfat çözücü mikroorganizma bulunsa da, bunların sayıları yeterli değildir ve rekabet güçleri zayıftır.

Dolayısıyla, bitkilerin uygun ve rekabet gücü yüksek fosfat çözücü mikroorganizmalarla inoküle edilmesi, verimde önemli artışlar sağlayacaktır. Araştırmamızda, azot bağladıkları belirlenen izolatların aynı zamanda fosfat çözücü özelliklerinin de araştırılması, ileride bu izolatlar ile gerçekleştirilebilecek biyogübre materyalinin daha etkili olmasını sağlamayı amaçlamıştır. Nitekim, daha önceki araştırmalarda da ya her iki özelliğe (azot bağlayıcı ve fosfat çözücü) sahip bakterilerden veya ayrı ayrı bu özelliklere sahip bakteri kombinasyonlarından hazırlanan inokülanlar, sinerjik etki ile verimde artışlar sağlanmışlardır (Kundu and Gaur 1984; Alagawadi and Gaur 1992). Hatta günümüzde “Phylazonit-M” ve “Kyusei-M” ticari adlarıyla satılan biyogübreler, hem fosfat çözücü, hem de azot bağlayıcı bakterilerin karıştırılmasıyla hazırlanan preparasyonlardır (Rodriguez and Fraga 1999).

Fosfat çözücü mikroorganizmaların taranması ve seçimi işlemlerinde iki farklı selektif besiyeri kullanılmaktadır. Bunlardan biri brom-fenol ve trikalsiyum fosfat içeren besiyeri olup, yöntemin esası mikroorganizmanın oluşturduğu asitin, indükatör boya olan brom-fenol ile verdiği rengin koloni etrafında oluşturduğu zonu ölçmeye dayanmaktadır. Ancak, fosfatı çözdükleri halde, asit üretmeyen mikroorganizmalar, bu besiyerinde izole edilemezler. Bu nedenle, hassasiyeti daha yüksek olan NBRIB-BPB besiyerinde üretim yöntemi önerildiğinden (Nautiyal *et al.* 2000), araştırmamızdaki tarama işlemlerinde de bu yöntemin kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca, başlangıçtaki izolat sayımızın çokluğu da, bu yöntemi tercihte etkili olmuştur.

5.3. İzolatların Tanı İşlemleri

Bu araştırma sonunda, hem fosfat çözücü hem de azot bağlayıcı özelliği tesbit edilen 16 izolat, önce klasik yöntemler kullanılarak çeşitli özellikleri belirlenmiş ve daha sonra MIS ile tanılanmıştır. Klasik yöntemlerden; cins düzeyinde tanıda yardımcı olması

düşünülen hücre morfolojisi, gram özelliği, hareket, koloni morfolojisi ve rengi, endospor oluşturma ve katalaz üretimi gibi özelliklerin incelenmesi tercih edilmiştir.

Bilindiği gibi son yıllarda klasik tanı yöntemlerine ilaveten kullanılan modern teknikler içerisinde pratik ve ucuz olması nedeniyle MIS yöntemi önerilmektedir (Paisley 1995). Yukarıda belirtilen sitolojik ve kültürel özelliklerin belirlenmesini takiben, izolatlarımızın MIS ile taranması sonucu, AS-1'in *Cellulomonas turbata*, AS-3'ün *Pseudomonas putida*, AS-4, AS-12, AS-13 ve AS-14'ün *Bacillus cereus*, AS-5'in *Neisseria mucosa*, AS-6 ve AS-10'un *Enterobacter cloacae*, AS-2, AS-8, AS-15 AS-16'nın *Bacillus megaterium*, AS-9'un *Bacillus mycoides*, AS-11'in *Vibrio furnissii* oldukları değerlendirilmiştir.

Ne yazık ki, MIS analizinde tanılanan izolatlar için tanı indeksleri oldukça düşük (0,1-0,7) bulunmuştur. MIS sistemi ile *Bacillus* cinsine ait oldukları belirlenen AS-2, AS-4, AS-8, AS-12, AS-13, AS-14, AS-15 ve AS-16 izolatlarının, klasik yöntemle belirlenen özelliklerinin bulunduğu Çizelge 4.4. incelendiğinde; bu izolatların hepsinin çubuk şeklinde, endospor oluşturan ve katalaz pozitif özellikte oldukları görülmektedir. Bu özellikler *Bacillus* cinsinin genel cins özellikleriyle örtüşmektedir. Ancak; klasik yöntemlerden elde edilen bulgularla, MIS tanıların çeliştiği durumlara da rastlanmaktadır. Örneğin MIS'in *Enterobacter cloacae* olarak tanımladığı AS-6 ve AS-10 izolatları endospor oluşturan izolatlardır. Bu mümkün değildir, çünkü *Enterobacter* türleri endospor oluşturmaz. Aynı çelişkili durum *Neisseria mucosa* olarak tanımlanan AS-5 izolatı için de söz konusudur. Gerek örnekleri verilen çelişkili durumlar, gerekse tanı indekslerinin düşük değerli olması nedenleriyle, MIS tanıların güvenilir olmadığı kanaatindeyiz. Dolayısıyla, bu izolatlar ile gerçekte yapmayı planladığımız yayınlarda daha hassas moleküler teknikler (16S rRNA vb.) kullanılarak tanılama işleminin yenilenmesi faydalı olacaktır.

5.4. İzolatlarla Aşılamanın Nohut Bitkisinde Büyüme Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Tarımsal üretimlerde verimi etkileyen ekolojik faktörlerin, veya gübre değeri belirlenmek istenen materyallerin (kimyasal gübreler veya bitki büyümesini teşvik edici bakterilerden oluşan biyogübreler) etki düzeylerini anlamayı amaçlayan çeşitli çalışmalarda, deneme çalışmasından sonra farklı büyüme parametrelerinin kriter olarak kullanıldığı görülmektedir. Örneğin alkol sanayi yan ürünü olan vinasın gübre değerinin belirlenmesini amaçlayan bir çalışmada, bezelye veya ayçiçeği bitkisinin hasat dönemi sonrası gövde boyu, kök boyu, yaprak alanı, bitki kuru ağırlığı ve primer produktivite değerleri kriter olarak kullanılmıştır (Algur and Kadioğlu 1992). *Bacillus polymyxa* ve *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* bakterilerinin biyogübre etkisini belirlemeye yönelik bir başka araştırmada, kök ve gövde yaş ağırlıkları, bitki dokusunda şeker miktarı, total biyomas miktarı ve tohum verimi parametreleri kriter olarak kullanılmıştır (Çakmakçı *et al.* 1999). Nohut bitkisi üzerinde daha önce yapılmış bir çalışmada *Rhizobium* aşılamanın verim üzerindeki etkileri incelenirken bitki kök ve gövde boyu, total azot miktarı, simbiyotik etkinlik, nodül kuru ağırlığı ve bitki başına fikse edilen azot miktarları değerlendirmeye alınmıştır (Kantar *et al.* 2003). Kaya *et al.* (2006) tarafından gerçekleştirilen ve ayçiçeği bitkilerinin yan ürünlerinin biyolojik parçalanması sonucu elde edilen materyalin gübre değerinin test edildiği araştırmada da, kriter olarak total protein ve total klorofil miktarları, çimlenme indeksleri ve bitki boyu parametreleri kullanılmıştır. Bu örnekleri çoğaltmak mümkündür. Araştırmamızda da izolatlar ile aşılamanın nohut üzerindeki etkilerini belirlerken kriter olarak bitki kök ve gövde boyu, yaprak kuru ağırlığı ve protein miktarlarının büyüme parametresi olarak kullanılması tercih edilmiştir.

İzolatlar ile aşılamanın nohut bitkisinin kök boyu üzerindeki etkilerini gösteren Şekil 4.3; 4.4 ve 4.5 ile Çizelge 4.6 incelendiğinde azotsuz kontrole göre AS-1; AS-3; AS-5; AS-10 ve AS-11 izolatları ile aşılamanın $p < 0,05$ düzeyinde önemli düzeyde artışlar sağladığı görülmektedir. İzolatlardan bazıları fosfatsız kontrol ve pozitif kontrol gruplarına göre de kısmi artışlar sağlamış, fakat bu artışlar istatistiki bakımdan önemsiz

bulunmuştur ($p<0,05$). Azotsuz kontrole göre en yüksek artışı sağlayan AS-3 izolatu ile aşılama kök boyu parametresinde %84'lük bir artışı ifade etmektedir.

Şekil 4.7; 4.8 ve 4.9 ile Çizelge 4.7 ise izolatlar ile aşılamının gövde boyu üzerindeki etkilerini göstermektedir. Çizelge 4.6'dan, bazı izolatların azotsuz kontrole göre kısmi artışlar sağlasa da bu artışların istatistiki bakımdan önemsiz olduğu ($p<0,05$); fosfatsız kontrole göre sadece AS-2 izolatının istatistiki bakımdan önemli artış sağladığı ve pozitif kontrole göre de izolatların kontrolden büyük değerler vermediği, ancak birçok izolatla aşılamının pozitif kontrole çok yakın (farkları $p<0,05$ düzeyinde önemsiz) gövde boyu oluşumu sağladığı anlaşılmaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde izolatlar ile aşılama, nohut bitkisinin kök ve gövde boyu üzerinde önemli düzeyde etkili (olumlu ve olumsuz) bulunmuştur. Bu beklenen bir durumdur. Çünkü topraktaki azot ve fosfor eksikliği veya fazlalığının bitki kök ve gövde boyu üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Avcı (2007); bitki boyu uzunluğunun genetik olmakla birlikte, geliştirme tekniği ve besin elementleri miktarından da etkilendiğini belirtmektedir. Yine azot eksikliğinin vegetatif gelişimi olumsuz etkilediği, gövdeyi zayıflattığı, bitkinin erken yaşlanmasına yol açtığı; fosfor eksikliğinin de zayıf sap ve gövde oluşumuna sebep olduğu ifade edilmektedir (www.bitkisagligi.net/Bitki_Cansiz). Özellikle de toprağın azot içeriği ile kök büyümesi arasındaki ilişki, çözünmüş NO_3 miktarının artışına bağlı olarak bitki hücrelerinin bölünmesinin uyarılması ve sonuçta kökün boyca uzaması şeklinde açıklanmaktadır (Martinez and Martinez 2007). Hatta yapılan araştırmada bazı *Azospirillum* türleri ile aşılama, köklerde solunum potansiyellerini artırıcı bir etki göstermiş ve buna bağlı olarak karbon asimilasyonu olumlu yönde etkilenmek suretiyle bitki büyümesinde %8'lik artışlar sağlamıştır (Wessey 2003). Araştırmamızda inokulant olarak kullanılan izolatların kök ve gövde boyunda meydana getirdikleri artışların, yukarıda açıklanılmaya çalışılan mekanizmaların bir veya bir kaçına bağlı olduğu söylenebilir.

İzolatlar ile aşılamının nohut bitkisinde yaprak kuru ağırlığı üzerindeki etkileri Şekil 4.10; 4.11; 4.12 ve Çizelge 4.8'de özetlenmiştir. Şekil ve çizelgelerden de görüldüğü

gibi AS-1, AS-4, AS-9, AS-10, AS-13 ve AS-16 suşları ile aşılama, azotsuz kontrole göre; AS-3, AS-8 ve AS-9 suşları ile aşılama fosfatsız kontrole göre yaprak kuru ağırlığında istatistiki bakımdan önemli ($p<0,05$) artışlar sağlamışlardır. Pozitif kontrol ise, aşıli gruplara nazaran önemli ($p<0,05$) düzeyde daha başarılı sonuç vermiştir. Birçok araştırmada genellikle bir büyüme kriteri olarak “yaprak alanı” ele alınmış ve değerlendirilmiştir. Bitkinin asimilasyon faaliyetinin en yoğun gerçekleştiği bu organın büyüklüğünün kriteri olarak değerlendirilmesi beklenen bir durumdur. Ancak çeşitli araştırmalarda organların büyüklüğünden çok, kuru ağırlığı kullanıldığından bu araştırmada da yaprak kuru ağırlığı (yaprak biyoması) bir kriter olarak kullanılmıştır.

Bitkinin çeşitli bölgelerinde; biyomas verimi ile tane verimi üzerinde yapılan araştırma sonuçları incelendiğinde; tane verimi ile biyomas verimi arasında pozitif bir kolerasyonun varlığı dikkat çekmektedir (Özalkan *et al.* 2010). Dolayısıyla, araştırmamızda gerek kök ve gövde boy uzamasına yol açan, gerekse yaprakta kuru ağırlık (biyomas) artışını sağlayan inokulantlarımızın, tane verimi üzerinde de olumlu sonuç verebileceği düşünülmüş ve bu izolatlarımızla tarla denemelerinin uygun olacağı değerlendirilmiştir.

Bitki beslenmesinin, bitkinin dokularındaki protein oranı üzerinde etkili olacağı şüphesizdir. Üstelik, inokulantlar ile toprakta artması sağlanan azot ve fosfor gibi elementler, protein metabolizmasında çok önemli rollere sahiptir ve zaten bitki dokularındaki protein miktarı, aynı dokudaki azot miktarının belli bir faktörle çarpılması sonucu hesaplanmaktadır. Çünkü, proteinler canlıdaki en önemli azot depolarıdır. Bu bilgiler ışığında, araştırmamızda kontrol grupları ile deneme gruplarının yaprak protein düzeyleri de belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.23, 4.14 ve 4.15 ile Şekil 4.9’da özetlenmiştir. Çizelge 4.9 incelendiğinde, AS-8 ve AS-9 izolatları ile aşılama azotsuz kontrollere göre, AS-8, AS-11 ve AS-12 ile aşılama fosfatsız kontrollere göre; AS-5, AS-8, AS-9, AS-10, AS-12, AS-13 ve AS-15 izolatları ile aşılama ise pozitif kontrole göre, nohut bitkisinin yaprak protein oranını önemli ($p<0,05$) miktarda artırmıştır. Bitki için gübre edeğeri olan ve azot ve fosfatça toprağı zenginleştirici materyallerin uygulandığı araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Kaya *et al.*

2006). Bir başka araştırmada, *Rhizobium*, *Bradrhizobium* ve *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* türleri tek başlarına ve kombinasyonlar halinde inokulant olarak kullanılmış ve protein düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir (Elsoni and Osman 2011). Araştırma bulgularımız, yukarıda belirtilen araştırma sonuçlarıyla paralellik arz etmektedir.

Bu araştırma bulguları dikkatle incelendiğinde bazı izolatlardan elde edilen bulguların sanki birbiriyle çeliştiği değerlendirilebilir. Örneğin kök ve gövde boyu üzerinde etkisiz bulunan AS-15 izolatı, protein oranı üzerinde pozitif kontrolden bile çok iyi performans göstermiştir. Yine Çizelge 4.1'e göre fosfat çözücü özelliği zayıf bulunan AS-8, AS-9, AS-10, AS-11, AS-12, AS-13, AS-14, AS-15 ve AS-16 izolatları ile, Çizelge 4.2'ye göre azot bağlayıcı özelliği zayıf bulunan AS-6 ve AS-7 izolatları, bu iki özellik bakımından daha etkili bulunan diğer izolatlara nazaran farklı bitki parametreleri üzerinde daha yüksek verimler sağlamışlardır. Bu örnekleri çoğaltmak mümkündür. Ancak giriş kısmında da belirtildiği gibi “Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler” sadece azot bağlayıcı ve fosfat çözücü olanlardan ibaret değildir. Toprak patojenlerini öldürerek, vitamin sentezleyerek, bitki büyüme düzenleyicilerini üreterek, mineralizasyonu hızlandırarak da bitki büyümesine katkı sağlayan bakteriler vardır. Örneğin bazı toprak kökenli bakterilerin toprak pH'sını düşürücü asitler üreterek mineralizasyonu hızlandırdığı (Orhan *et al.* 2006); fosfat çözücü bakterilerin aynı zamanda B12, riboflavin ve niasin gibi vitaminler üreterek metabolizmayı olumlu etkilediği (Rempe 1973), *Enterobacter* ve *Pseudomonas* cinslerine ait bazı bakteri türlerinin siderofor ve oksin gibi maddeler üreterek bitki büyümesini teşvik ettiği (Barea *et al.* 1976; Martinez and Martinez 2007) kaydedilmektedir. Araştırmamızda fosfat çözücü ve azot bağlayıcı özellikleri zayıf bulunduğu halde, nohut bitkisi büyüme parametrelerinde önemli artışlar sağlayan ve yukarıda belirtilen izolatlar, bu araştırmalarda belirtilen özellikleri bakımından ayrıca incelenebilir.

Bilindiği gibi, daha önce yapılan benzer birçok araştırmada, sera koşullarında başarılı bulunan birçok inokulant tarla koşullarında başarısız bulunmuştur. Bunun başlıca sebebi, inokulant olarak kullanılan bakterilerin rekabet güçlerinin zayıflığıdır.

Dolayısıyla bu konuda dirençli ve rekabet gücü yüksek türlerin seçimi önemlidir. Özellikle endospor oluşturabilen *Bacillus* türlerinin bu bakımdan avantajlı olduğu ve dolayısıyla araştırmamızda izole edilen ve kullanılan *Bacillus* cinsine ait izolatların daha ümitvar oldukları söylenebilir. Ancak yine de bu durum tarla denemleri ile teyit edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E., 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Anonymous, 2003b. Chew this: pesticides hit people, not pests. The Times of India, New Delhi, 16 April.
- Anonymous, 2003a. Pesticides in bottled water. The Times of India, New Delhi, 5 February.
- Akdağ, C. ve Şehirali, S., 1995. Bakteri (*Rhizobium* ssp) Aşılama, Azot Dozları ve Ekim Sıklığının Nohut (*Cicer arietinum* L.)'un Verim ve Verim Unsurlarına Etkileri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12, 122-134.
- Akgül, D.S. and Mirik, M., 2008. Biocontrol of *Phytophthora Capsici* on Pepper plants by *Bacillus megnaterium* strains. Journal of Plant Pathology, 90 (Suppl 1), 29-34.
- Alagawadi, A.R. and Gaur, A.C., 1992. *Azospirillum brasilense* and phosphate solubilizing bacteria on yield of sorghum in dry land. Trop. Agric., 69, 347-350.
- Alcoma, I. Edward., 1996. Fundamental of Microbiology. An Imprint of Addison Westley Longman, Inc., 15nd ed., 770-771, Newyork.
- Algur, Ö. F. and Kadioğlu, A., 1992. The effects of virrase on the growth, biomass and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annus*). Agriculture, Ecosystems and Environment, 39, 139-144.
- Anonim, 2000. Bursa Yöresi İklim Ver. Bursa Meteo. Bölğ. Müd. (Yayınlanmamış Kayıt.).
- Anonymous, 2003b. Plant Hormones- info Ethylene <http://www.plant.hormones.info/ethylene.htm> (15.12.2011).
- Antoun, H., 2003. Field and Green house Trials Performed with Phosphate Solubiling Bacteria and Fungi <http://www.webcd.usal.es/web/psm/abstracts/antoun.htm> (15.01.2012).
- Aslantas, R., Cakmakcı, R., Sahin, F., 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Sci. Hort. 111, 371-377.
- Avcı, R., 2007. Farklı azotlu gübre uygulamalarının ekmeklik buğdayda verim ve kalite üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Aydoğan, M.N., 2004. Mazıdağı fosfat kayasını çözen bakterilerin izolasyonu ve çözünme üzerine farklı fiziksel-kimyasal parametrelerin etkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Azcon R., Barea J. M., Hayman D.S., 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. Soil Biology and Biochemistry, 8, 135-138.
- Barea, J. M., Navorio, E., Montoya, E., 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate solubilizing bacteria. J. Appl. Bacteriol., 40, 129-134.

- Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Lebsky, V.K., Moreno, M. and Bashan, Y., 2000. Improved growth and water bioremediation capacity of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate beads with the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. 5th International plant growthpromoting rhizobacteria workshop. Villa Carlos Paz, Argentina.
- Bashan, Y. and Holguin, G., 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology, 43, 103-121.
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F., 1993. Practical Rhizobium- Legume Technology Manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Technical Manual no: 19. Syria.
- Beck, D.P., 1992. Yield and nitrogen fixation of chickpea cultivars in response to inoculation with selected rhizobial strains. Agron. J. 84, 510–516.
- Blaaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S., Moënne-Loccoz, Y., 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. FEMS Microbiol Ecol, 56, 455– 470.
- Burlage, R.S., Atlas R., Stahl D., Geesey G., Saylor G., 1998. Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press, America, p 8-14.
- Çakmakçı, R., Kantar, F., Algur, Ö.F., 1999. Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. J. Plant Nutr. Soil Sci., 162, 437-442.
- Çakmakçı, R., 2002. Azot Fiksasyonu ve Fosfat Çözücü Bakteri Aşılamaalarının Şeker Pancarı Verim ve Kalitesine Etkisi. II. Şeker Pancarı Üret. Semp., 257-270.
- Çakmakçı, R., 2005. Bitki Gelişiminde Fosfat Çözücü Bakterilerin Önemi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (35), 93-108.
- Çakmakci, R., Aydın, D.F., Sahin, A.F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under green house and two different field soil conditions. Soil Biol. Biochem. 38, 1482–1487.
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F., Erdoğan, Ü., 2007a. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. Turkish J. Agric. For., 31, 189-199.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., Dönmez, F., 2007b. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. J. Plant Nutr. Soil Sci, 170, 288-295.
- Çakmakçı, R., Kantar, F. and Algur, Ö. F., Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. J. Plant Nutr. Soil Sci., 162, 437-442 (1999).
- Canbolat, M., Bilen, S., Cakmakci, R., Fiahin, F., Aydın, A., 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. Biol. Fertil. Soils 42, 50–357.
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. and Kloepper, J.W., 1996. The use of Yield Increasing Bacteria (YIB) as Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Chinese Agriculture. Management of soil borne diseases, R. S. Utkhede and V. K. Gupta ed. Kalyani publishers, Ludhiada. New delhi.

- Contesto, C., Desbrosses, G., Lefoulon, C., Be'na, G., Borel, F., Galland, M., Gamet, L., Varoquaux, F., Touraine, B., 2008. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science* 175, 178–189.
- Dilworth, M.J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys., Acta* 127, 285-294
- Elsoni, E.M., Osman, A.G., 2011. Effects of Biofertilization On Yield, Physical Characteristics and Chemical Composition on Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.). *Pakistan Journal of Nutrition* 10 (10), 978-981.
- Eşitken, A., Ercisli, S., Sevik, İ., Sahin, F., 2003b. Effect of Indole-3- Butyric Acid and Different Strains of *Agrobacterium rubi* on Adventitive Root Formation from Softwood and Semi-Hardwood Wild Sour Cherry Cuttings. *Turk J Agric For* 27 (2003) 37-42 TUBİTAK.
- Gadd, G., 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance of metal specification, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol* 41, 47-92.
- Gadd, G., 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance of metal specification, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol* 41, 47-92.
- Gangwar, M., Kaur, G., 2009. Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and rygrass. *The Internet Journal of Microbiology*, Vol. 7., No:1.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., Penrose, D.M., 1999. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, London.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117. Gordon, A.S., Weber, R.D., 1950.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol*, 190, 63–68.
- Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am J Altern Agric* 1, 51–57.
- Goldstein, A.H., 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol Agric Hort* 12, 185-193.
- Gök M. And Martin P., 1993. Farklı *Rhizobium* bakterileri ile aşılamanın soya, üçgül ve fığde simbiyotik azot fiksasyonuna etkisi. *Doğa Tr.J.of Agriculture and Forestry*, 17, 753-61.
- Grupta, S.C. and Namdeo, S.L., Effect of *Rhizobium* strain on symbiotic traits and grain yield of Chickpea. *Indian Journal of Pulses Research*, 9 (1), 94-95 (1996).
- Gürbüzer, E., (1980). Orta Anadolu koşullarında en fazla azot tespit etme özelliği gösteren mercimek ve nohut nodazite bakterilerinin seçimi. *Topraksu Genel Müdürlüğü, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları. Rapor Yayın No:25, Ankara.*
- Haathela, K., Wartiovaara, T., Sundman, V., Skujins, J., 1981. Root-associated N₂ fixation (Acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 203-206.

- Hadler, A.K., Mishra, A.K. Bhattacharyya P. and Chakrabartty, P.K. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.. J Gen Appl Microbiol 36, 81–92.
- Honma, M., Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agric Biol Chem, 42: 1825–1831.
- Jacobs, H., Boswell, G.P., Ritz, K., Davidson, F.A., Gadd, G.M., 2002. Solubilization of calcium phosphate as a consequence of carbon tranlocation by *Rhizoctania solani*. FEMS Microbiology Ecology, 40, 65-71.
- Jones, D.L. and Darrah, P.R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant Soil 166, 247–257.
- Jones, D.L. and Darrah, P.R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant Soil 166, 247–257.
- Kadıoğlu, A., Bitki Fizyolojisi, Trabzon, (1998), s. 84-99.
- Kaiser, P., 1995. Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacea*. NATO ASI Ser. Ser. G, 37, 207-212.
- Kantar, F., Kızıloğlu, T. ve Algur, Ö.F., 1999. GAP için Biyo-organik tarım sistemleri. I. Tarım Kongresi, 26-28 Mayıs 1999, Şanlıurfa.
- Kantar, F., 1997. Proceeding of Traning Course on Bio-organic Farming systems for Suistainable Agriculture (Nov. 26 to Dec. 6, 1995, Cairo Egypt) Cairo-Egypt., 270-272.
- Kantar, F., Elkoca, E., Ögütçü, H., Algur, O. F., 2003. Chickpea yields in relation to *Rhizobium* inoculation from wild chickpea at high altitudes. J. Agronomy and Crop Science, 189, 291-297.
- Kaya, Y., Şengül, M., Ögütçü, H., Algur, O. F., 2006. The possibility of useful usage of biodegradation products of sunflower plants. Bioresource Technology, 97, 599-604.
- Klee, H.J., Hayford, M.B., Kretzmer, K.A., Barry, G.F., Kishore, G.M., 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants, Plant Cell 3 1187–1193.
- Khan, İ., Masood, A., Ahmad, A., 2010. Effect Of nitrogen fixing bacteria on plant growth and yield of *Brassica juncea*. Journal of Phytology 2010, 2(9): 25-27.
- Klement, Z., Rudolph K., Sands, D.C., 1990. Methods in phytopathology. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Kleoppper, J. W. and. Schroth, M. N., 1978. Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radishes. In Proceedings of the Fourth International Conference on PlantPathogenic Bacteria, Vol. 2 pp 879-882.
- Kloepffer, J. W., 1993. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents. Soil Microbial Ecology, F. Blaşne Metting, J. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 255-274.
- Kotan, R., Sahin, F., 2002. First record of bacterial cancer by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on apricot trees in Turkey. Plant Pathology 51, 798.
- Kucey, R. M. N., Janzen, H. H. and Legett, M. E. 1989. Microbially mediated increases in plant available phophorus. Adv Agron 42, 199-228.
- Kumar, V. and Narula, N. 1999. Solubilization of inoranic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chrococum*. Biol Fert Soils, 28, 301-305.

- Kundu, B.S., Gaur, A.C., 1984. Rice response to inoculation with N₂ fixing and P solubilizing microorganisms. *Plant Soil*, 79, 227-234.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., Akdağ, R., Şahin, F., Pirim, İ., Çiftçi, M., Polat, M. F., Özmen, İ., Oral, B., Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, s: 48-53, Atatürk Üniversitesi Erzurum.
- Lemanceau, P., Steinberg, C., Thomas, D. J. I., Edel, V., Raaijmakers, J. M. and Alabouvette, C., 2000. Natural Soil Suppressiveness to Soilborne Diseases. Fifth International PGPR Workshop, 29 October-3 November, 2000, Cordoba-Argentina.
- Leyval, C. and Berthelin, J., 1989. Interaction between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil* 117, 103-110.
- Lucas Garcia, J. A., A. Probanza, B. Ramos, N. Ruiz Palomino, and F. J. Gutierrez Manero., 2000. Effects of inoculation with PGPR on seedling Growth of Different tomato and Pepper Varieties in Axenic Conditions. Fifth International PGPR Workshop, 29 October - 3 November, 2000, Cordoba-Argentina.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Application of Free Living Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25, Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands.
- Martnez, M., Martnez, M., 2007. Effects of phosphate solubilizing bacteria during the rooting period of sugar cane (*Saccharum officinarum*) venezuela. 51-54 variety, on the growers oasis substrate. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 317-323.
- Matos, I. and Schröder, E.C., 1989. Strain selection for pigeon pea *Rhizobium* under greenhouse conditions. *Plant and Soil*, 116, 19-22.
- Mehta, S., Nautiyel, C.S., 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate- solubilizing bacteria., *Current Microbiology*, 43, 51-56.
- Mehta, S., Nautiyel, C.S., 2000. An efficient method for qualitative screening of phosphate- solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43; 51-56.
- Mertens, D., 2005a. AOAC Official Method 922.02. Plants Preparation of Laboratory Sample. *Official Methods of Analysis*, 18th edn. Horwitz, W., and G.W. Latimer, (Eds). Chapter 3, pp1-2, AOAC-International Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.
- Minaxi, Nain, L., Yadav, R.C., Saxena, J., 2011. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. *Applied Soil Ecology*.
- Naureen, Z., Yasmin, S., Hameed, S., Malik, K.A., Hafeez, Y., 2005. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of maize grown in Indonesian and Pakistani Soils. *J. Basic Microbiol.*, 45 (6); 447-459.
- Nautiyel, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett* 182: 291-296.
- Orhan, E., Eşitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteri (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in originally growing raspberry, *Scientia Horticulturae*, 11, 38-43.

- Ögütçü H., Kasımoğlu C., Elkoca E., 2010. Effects of rhizobium strains isolated from wild chickpeas on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. Turk J Agric For 34 (2010) 361-371.
- Ögütçü, H., Algur, O. F., Elkoca, E., Kantar, F. 2008. The determination of symbiotic effectiveness of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum. Turk J. Agric. Res. For. 32, 241-248.
- Paisley, R., 1995. MIS whole cell fatty acid analysis by chromatography. MIDI, Inc., Newark, DE.
- Parmar, N., and Dadarwal, K. R., 2000. Pathogenic Suppressive Abilities of Rhizosphere Bacteria From Healthy Chickpea Plants. Fifth International PGPR Workshop, 29 October - 3 November, 2000, Cordoba-Argentina.
- Patten, C.L., and Glick, B.R., 2000. Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid Biosynthesis Genes from Plant Growth Promoting Bacteria. Fifth International PGPR Workshop, 29 October - 3 November, 2000, Cordoba-Argentina.
- Peix, A., Rivas-boyero, A.A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina E., Velazquez, E., 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biology and Biochemistry, 33 (1), 103-110.
- Piromyong, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teamroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. European Journal of Soil Biology, 47 (1), 44-54.
- Prevost, D., Bordeleau, L.M. and Antoun, H., Symbiotic effectiveness of arctic rhizobia on a temperate forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Plant and Soil., 104, 63-69 (1989).
- Rajeshkumar S., Chandran M.N., Chidambaramprabu P., Lakew Wondimu L., Selvaraj T., 2009. Interaction between *Glomus geosporum*, *Azotobacter chroococcum*, and *Bacillus coagulans* and their Influence on Growth and Nutrition of *Melia azedarach* L. Turk J Biol 33 (2009) 109-114.
- Rajeshkumar, S., Mathan Chandran, M.N., Chidambaram, P.P., Wondimu, L., Selvaraj, T., Interaction between *Glomus geosporum*, *Azotobacter chroococcum*, and *Bacillus coagulans* and their Influence on Growth and Nutrition of *Melia azedarach* L. Turk J Biol 33 (2009) 109-114 TUBİTAK doi:10.3906/biy-0804-4 (2009).
- Rempe, E.K., 1973. The role of vitamins synthesized by the root microflora for the plants. Fiziologiya i biokhimiya, 19, 663-668.
- Rennie, R.J. and Dubet, S., Nitrogen- 15. Determined nitrogen fixation in field-grown chickpea, lentil, faba bean and field pea Agronomy J., 78 (4), 654-660 (1986).
- Rice, W.A, Olsen, P.E., Leggett, M.E., 1995. Co-culture of *Rhizobium meliloti* and a phosphorus solubilizing fungus (*Penicillium bilalii*) in steril peat. Soil Biology and Chemistry, 27, 703-705.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promoting. Biotechnol Adv. 17: 319-339.
- Romerio, R. S., 2000. Preliminary results on PGPR research at the Universidade federal de viçosa, Brazil. Fifth International PGPR Workshop, 29 October - 3 November, 2000, Cordoba-Argentina.

- Romerio, R. S., 2000. Preliminary results on PGPR research at the Universidade
- Roy, M.A., 1988. Use of fatty acids for the identification of phytopathogenic bacteria. *Plant Dis.*, 72, 460.
- Salih, H.M., Yahya, A.Y., Abdul-Rahem, A.M. and Munam, B.H., 1989. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate dissolving fungi. *Plant Soil* 120, 181–185.
- Salisbury, B.F., W.C. Ross. *Plant Physiology*, Wadsworth Publ. Co. (Bölüm 14. Assimilation of Nitrogen and Sulfur). 1992.
- Saygılı, H., 1995. *Fitobakteriyoloji*. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- Schlegel, H.G., 1986. *General Microbiology*. Cambridge University Press. Cambridge. UK., p 399-404.
- Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C., Lgnacimuthu, S., 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current science*. 79 (5): 565-567.
- Srinivasan, M., Petersen, D.J., Holl, F.B., 1996. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions *Can. J. Microbiol.* 42,1006-1014.
- Stead, D.E., 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* sp. By using cellular fatty acid profiles, *Int. J. Systematic Bacteriology*, 42, 281.
- Subba, R., 1977. *Soil Microorganisms and Plant Growth*, Oxford and IBH Publishing Co, India.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G.N., Gangwar, S.K., Ghosh, J.K., 2000. Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). *J. Agric. Sci., Camb.*, 134, 227-234.
- Şahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*.
- Şehirali, S., 1988. *Yemeklik Tane Baklagiller*. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 1089, Ders Kitabı: 314, 435 s.
- Taiz, L., and Zeiger, E., 1991. *Plant Physiology*, The Benjamin / Cumming Pub. Co. Inc. California, p. 405-421.
- Temiz, A., 1996. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Uçar F. ve Öner M., 1988. Nohut kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal karakterleri. *Doğa Tu Biyol (Genetik, Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Sitoloji)*, 12 (2), 135-141.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M. and Vassilev, N., 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Proc Bioch*, 35 693-697.
- Vauterin L., Yang P., Swing J., 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*, 298-304.
- Vessey, J. K., 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Yıldız, N. ve Bircan, H., 1991. *Araştırma ve deneme metotları*. Atatürk Üniversitesi Yay No: 697, Ziraat Fak. Yay. No: 305, Ders Kitapları Serisi No: 57, Erzurum.

- Wayne Moss C., Samuels S.B., Liddle J., McKinney R.M., 1973. Occurence of branched-chain hdroxy fatty acid in *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology*, 12, 1018-1024.
- Whitelaw, M.A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69, 99-151.
- www.bitkisagligi.net/Bitki_Cansiz (11.10.2011).

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kırşehir’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Kırşehir’de tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2008’de Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı.