

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**VERMİKOMPOST UYGULANMIŞ TOPRAKTA NİTRİFİKASYON VE
DENİTRİFİKASYON BAKTERİ TOPLULUK YAPISININ KÜLTÜRDEN
BAĞIMSIZ MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE İNCELENMESİ**

Raziye YILDIZ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MAYIS 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**VERMİKOMPOST UYGULANMIŞ TOPRAKTA NİTRİFİKASYON VE
DENİTRİFİKASYON BAKTERİ TOPLULUK YAPISININ KÜLTÜRDEN
BAĞIMSIZ MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE İNCELENMESİ**

Raziye YILDIZ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MAYIS 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VERMİKOMPOST UYGULANMIŞ TOPRAKTA NİTRİFİKASYON VE
DENİTRİFİKASYON BAKTERİ TOPLULUK YAPISININ KÜLTÜRDEN
BAĞIMSIZ MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE İNCELENMESİ**

Raziye YILDIZ

TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
117O036 nolu proje ile desteklenmiştir.**

MAYIS 2023

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VERMİKOMPOST UYGULANMIŞ TOPRAKTA NİTRİFİKASYON VE
DENİTRİFİKASYON BAKTERİ TOPLULUK YAPISININ KÜLTÜRDEN
BAĞIMSIZ MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE İNCELENMESİ**

Raziye YILDIZ

TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 26/05/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İlker UZ (Danışman)

Prof. Dr. Ali COŞKAN

Doç. Dr. İsmail Emrah TAVALI

ÖZET

VERMİKOMPOST UYGULANMIŞ TOPRAKTA NİTRİFİKASYON VE DENİTRİFİKASYON BAKTERİ TOPLULUK YAPISININ KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE İNCELENMESİ

Raziye YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker UZ

Mayıs 2023; 100 sayfa

Toprak verimliliğinin korunması ve geliştirilmesi toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesi ve istenen seviyelerde tutulmasına bağlıdır. Bu amaçla kullanılan geleneksel organik gübrelerin yanı sıra son yıllarda vermikompost da önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Vermikompostun toprak mikroorganizmaları üzerine etkilerini araştıran çalışmalar genelde topraktaki biyolojik aktiviteyi temsil eden belli parametreler ile sınırlı kalmıştır. Bu parametrelerin toprağın biyolojik durumunun iyi bir göstergesi olduğu kabul ediliyor ise de aslında bu tek başına yeterli olmayabilir. Özellikle önemli besin döngülerinde görev alan mikroorganizma gruplarının topluluk yapı ve çeşitlilik durumlarının DNA temelli “kültürden bağımsız” moleküler teknikler ile detaylı incelenmesi topraktaki biyolojik dinamikleri anlayabilmemiz açısından çok önemlidir. Araştırılması gereken mikrobiyal grupların başında da azot döngüsünde görev alan nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterileri gelmektedir. Ancak, vermikompost uygulanan topraklarda nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakteri topluluklarının yapısı ve çeşitliliği hakkında yapılmış detaylı bir moleküler ekolojik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma topraktaki (rizosfer toprağı ve normal toprak) nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakteri topluluk yapı ve çeşitliliğinin ne yönde etkilendiği sorusuna kültürden bağımsız moleküler teknikler yardımıyla cevap aramayı ve topluluk yapısı ve çeşitliliği ile topraktaki diğer biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkileri belirlemeyi amaçlamıştır. Bu amaca yönelik olarak, çakılı deneme şeklinde iki dönem arka arkaya yürütülen çalışmada kıvırcık marul yetiştirilen bir tarla toprağında vermikompost uygulamasının normal toprak ve rizosfer toprağına etkileri çiftlik gübresi ve kimyasal gübre uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonunda elde edilen filogenetik veriler, *amoA* ve *nirK* genleri bağlamında, amonyum okside eden bakteri ve denitrifikasyon bakteri topluluk yapısında zaman ve uygulamalara bağlı olarak değişimler olduğunu göstermiştir. Özellikle amonyum okside eden bakterilere ait değişimler filogenetik ağaç üzerinde daha rahatlıkla izlenebilmiştir. Bu çalışmaya ait topraklarda *Nitrosospira* alt grup 3’ün baskın olduğu ve uygulamalar sonunda görülen değişimlerin de genel olarak bu grup içinde olduğu görülmüştür. Ayrıca, aerobik denitrifikasyon yapabilen bakterilere ve denitrifikasyon yapabilen amonyum okside eden bakterilere benzer klonların tespit edilip bunların

değişimlerinin izlenebilmesi de önemlidir. Vermikompost gübresinden elde edilen klonların farklı grupları içermesi, bu gübrenin toprakta bakteri çeşitliliğine önemli katkılar sağlayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, tesbit edilen değişimlerin, çalışma kapsamında takip edilen diğer biyolojik ve kimyasal parametrelerle ilişkisi tam açık olmamıştır. Ancak, dönemlere göre farklılık göstermekle birlikte amonyum okside eden bakteri popülasyonunun nitrifikasyon bakteri sayısı ve toplam N ile ve denitrifikasyon bakteri popülasyonunun ise nitrifikasyon aktivitesi, amonyum ve toplam N ile olumlu etkileşim içinde olduğu söylenebilir. Elde edilen sonuçlar, vermikompost başta olmak üzere toprağa uygulanan organik gübrelerin nitrifikasyon ve denitrifikasyon topluluk yapı ve çeşitliliğini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebildiklerini göstermiştir. Ancak, bu etki ve etkileşimlerin daha iyi anlaşılabilmesi için daha uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: *AmoA*, Bakteri, Çeşitlilik, Denitrifikasyon, Dizi Analizi, Filogenetik Analiz, Moleküler Ekoloji, *NirK*, Nitrifikasyon, Toprak Mikrobiyolojisi, Vermikompost

JÜRİ: Doç. Dr. İlker UZ

Prof. Dr. Ali COŞKAN

Dr. Öğr. Üyesi İsmail Emrah TAVALI

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NITRIFICATION AND DENITRIFICATION BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN VERMICOMPOST APPLIED SOIL BY CULTURE-INDEPENDENT MOLECULAR TECHNIQUES

Raziye YILDIZ

MSc Thesis in Soil Science and Plant Nutrient

Supervisor: Associate Professor İlker UZ

May 2023; 100 pages

The improving and maintaining soil fertility depends on improving the physical, chemical and biological properties of the soil and keeping them at the desired levels. In addition to the traditional organic fertilizers used for this purpose, vermicompost has emerged as an important alternative in recent years. Studies investigating the effects of vermicompost on soil microorganisms have generally been limited to certain parameters representing the biological activity in the soil. Although these parameters are considered to be good indicators of the biological status of the soil, they alone may not be sufficient. In particular, detailed examination of community structure and diversity of microorganism groups that take part in important nutrient cycles by DNA-based “culture-independent” molecular techniques is very important to understand the biological dynamics in the soil. Nitrifying and denitrifying bacteria, which take part in the nitrogen cycle, are at the forefront of the microbial groups that need to be investigated. However, there is no detailed molecular ecological study on the effect of vermicompost on community structure and diversity of nitrification and denitrification bacteria in soil. In this study, the aim was to find an answer to the question of how nitrification and denitrification bacterial community structure and diversity in soil (rhizosphere soil and bulk soil) is affected to find out the relationships between community structure and other biochemical parameters in the soil. For this purpose, the effects of vermicompost application on bulk soil and rhizosphere soil were investigated in a field experiment carried out in two consecutive growth seasons and compared with animal manure and chemical fertilizer. The phylogenetic data from molecular analysis showed that the community structure of ammonia oxidizing bacteria and denitrifying bacteria changed depending on time and applications. Especially, changes in ammonia oxidizing bacterial community were more visible in the phylogenetic tree. It was observed that *Nitrosospira* cluster 3 was dominant in the experiment soils and the changes that occurred were generally within this group. In addition, it was possible to identify and monitor clones similar to aerobic denitrifying bacteria and denitrifying ammonia oxidizing bacteria. The observation that the clones obtained from vermicompost contain different groups shows that this fertilizer can make significant contributions to the bacterial diversity in the soil. Even though, the relationship of these changes with other biological and chemical parameters was not clear, it can still be said that the ammonium oxidizing bacteria population interacts positively with the nitrifying bacterial number and total N, and the denitrifying bacteria population with the nitrification activity, ammonium and total N. The results showed that organic fertilizers applied to the soil, especially vermicompost, can directly or indirectly affect the nitrification and denitrification community structure

and diversity. However, longer-term studies are needed to better understand these effects and interactions.

KEYWORDS: *AmoA*, Bacteria, Denitrification, Diversity, Molecular Ecology, *NirK*, Nitrification, Phylogenetic Analysis, Sequence Analysis, Soil Microbiology, Vermicompost

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. İlker UZ

Prof. Dr. Ali COŞKAN

Assoc. Prof. Dr. İsmail Emrah TAVALI



ÖNSÖZ

Yaşadığımız gezegende yaşamın sürdürülebilmesi açısından azotun önemi büyüktür. Tarımsal açıdan bakıldığında toprakta azot canlı yaşamı açısından önemli yer tutmakta ve birçok biyokimyasal süreçten geçmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tarımsal üretimde kaliteli ve sağlıklı ürün yetiştirmeyi hedefleyen sürdürülebilir tarım sistemleri öne çıkmaktadır. Toprak verimliliğinin devamlılığı ve gelişimi için toprağın fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesi ve istenilen seviyelerde tutulması gerekmektedir. Bunun için organik gübre uygulamaları tavsiye edilmektedir. Bu gübrelerin toprak ekolojisine yararlarını ve mikroorganizmalara etkisini görmek açısından bazı moleküler teknikler geliştirilmiştir. Dünyada ve ülkemizde tarımsal açıdan toprak ekolojisi alanında yapılmış çalışmalara bakıldığında moleküler tekniklerle yapılmış çok fazla çalışma yer almamaktadır. Bu bağlamda bu eksikliğin giderilmesi ve dünya literatürüne katkı sağlanması amacıyla organik gübre uygulanmış toprakta nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterileri kültürden bağımsız tekniklerle incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana katkı sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. İlker UZ'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi) yürekten teşekkürlerimi sunarım. Her anlamda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi İsmail Emrah TAVALI'ya (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi), Öğr. Gör. Bayram Çağdaş DEMİREL'e (Akdeniz Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu), Arş. Gör. Buşra ÇALIK'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi), Zir. Yük. Müh. Aylin ZAMBAK ÖZGÜR'e (Akdeniz Üniversitesi), Zir. Yük. Müh. Elif YANIK'a (Antbio Tarım), Zir. Müh. Cemil YILMAZ'a (YSL Tarım) teşekkürlerimi sunarım. Sıcak aile ortamında çalışmamı sağlayan bölümümüzün kıymetli öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman en büyük destekçim olmuş ve her durumda yanımda olan, beni ben yapan sevgilimi aileme, sevgili babam Hüseyin YILDIZ'a, sevgili abim Davut YILDIZ'a ve hayatta olamasa da her daim kalbimde olan canım anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Azot Döngüsü	4
2.2. Nitrifikasyon	5
2.3. Denitrifikasyon	10
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Deneme alanı ve süresi	15
3.1.2. Araştırmada kullanılan gübreleme materyali	15
3.1.3. Araştırmada kullanılan bitki	16
3.1.4. Deneme grupları ve deseni.....	16
3.1.5. Analizler için örnekleme şekli	17
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Moleküler analizler	19
3.2.2 Biyokimyasal analizler.....	20
4. BULGULAR	25
4.1. Toprak Örneklerinin Lejantları.....	25
4.2. Amonyum Okside Edici (AOB) Topluluk Yapısı	28
4.2.1. Amonyum okside ediciler için dizi analiz sonuçları ve filogenetik dağılımları	29
4.3. Denitrifikasyon Bakteri Topluluk Yapısı.....	42
4.3.1. Denitrifikasyon bakterileri için dizi analiz sonuçları ve filogenetik dağılımları	42
4.4. RFLP Desenleri İle Toprağın Bazı Kimyasal Ve Biyolojik Özellikleri Arasındaki	

İlişkiler	56
5. TARTIŞMA.....	63
5.1. Amonyum Okside Edici Bakteri Topluluk Yapısı	63
5.2. Denitrifikasyon Bakteri Topluluk Yapısı.....	66
6. SONUÇLAR	70
7. KAYNAKLAR.....	71
8. EKLER	82
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Vermikompost Uygulanmış Toprakta Nitrifikasyon ve Denitrifikasyon Bakteri Topluluk Yapısının Kültürden Bağımsız Moleküler Teknikler İle İncelenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../2023

Raziye YILDIZ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbon dioksit
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
EC	: İletkenlik
g	: Gram
K	: Potasyum
kg ha ⁻¹	: Kilogram/hektar
kg	: Kilogram
L	: Litre
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
N	: Azot
N ₂	: Azot
N ₂ O	: Nitroz oksit
NH ₂ OH	: Hidroksilamin
NH ₃	: Amonyak
NH ₄	: Amonyum
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrit

NO₃ : Nitrat

P : Fosfor

Kısaltmalar

AMO : Amonyak monooksijenaz

amoA : Amonyak monooksijenazın A alt birimini kodlayan gen

AOB : Amonyum okside eden bakteri

DGGE : Denatüre edici veya sıcaklık gradient jel elektroforez

DNA : Deoksiribonükleik asit

Nap : Nitrat redüktaz

Nar : Nitrat redüktaz

Nir : Nitrit redüktaz

nirK : Nitrit redüktazın bakır içeren alt birimini kodlayan gen

nirS : Nitrit redüktazın sitokrom cd1 içeren alt birimini kodlayan gen

Nor : Nitrit oksit redüktaz

Nos : Nitroz oksit redüktaz

nosZ : Çoklu bakır homodimerik nitroz oksit redüktazı kodlayan gen

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

rDNA : Ribozomal deoksiribonükleik asit

T-RFLP: Terminal restriksiyon parça uzunluğu polimorfizm

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyolojik azot döngüsünde rol alan anahtar genler.....	5
Şekil 4.1. Toprak örneklerine ait DNA agaroz jel görüntüsü.....	26
Şekil 4.2. Toprak DNAsı kullanılarak elde edilen PZR ürününü (amoA) gösteren bir jel görüntüsü	27
Şekil 4.3. Klonlarda RFLP analizine ait bir örnek	28
Şekil 4.4. Birinci yetiştiricilik dönemi normal topraklardan elde edilen amoA gen klonlarına ait filogenetik ağaç	30
Şekil 4.5. İkinci yetiştiricilik dönemi normal topraklardan elde edilen amoA gen klonlarına ait filogenetik ağaç	32
Şekil 4.6. Birinci yetiştiricilik dönemi rizosfer topraklarından elde edilen amoA gen klonlarına ait filogenetik ağaç	34
Şekil 4.7. İkinci yetiştiricilik dönemi rizosfer topraklarından elde edilen amoA gen klonlarına ait filogenetik ağaç	36
Şekil 4.8. Birinci dönem normal topraklardan elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç	44
Şekil 4.9. İkinci dönem normal topraklardan elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç	46
Şekil 4.10. Birinci dönem rizosfer topraklarından elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç	48
Şekil 4.11. İkinci dönem rizosfer topraklarından elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneme alanı toprağının bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri ..	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan organik gübrelerin bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri	16
Çizelge 3.3. Toprak lejantları ve deneme grupları	18
Çizelge 4.1. Moleküler analizler kapsamında klonlar için kullanılan isimlendirme sistemi.....	25
Çizelge 4.2. Birinci dönem normal toprak <i>amoA</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	37
Çizelge 4.3. İkinci dönem normal toprak <i>amoA</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları	38
Çizelge 4.4. Birinci dönem rizosfer toprağı <i>amoA</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	39
Çizelge 4.5. İkinci dönem rizosfer toprağı <i>amoA</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	40
Çizelge 4.6. Organik gübrelerin <i>amoA</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları	41
Çizelge 4.7. Birinci dönem normal toprak <i>nirK</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	51
Çizelge 4.8. İkinci dönem normal toprak <i>nirK</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	52
Çizelge 4.9. Birinci dönem rizosfer toprağı <i>nirK</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	53
Çizelge 4.10. İkinci dönem rizosfer toprağı <i>nirK</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları.....	54
Çizelge 4.11. Organik gübrelerin <i>nirK</i> klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları	55
Çizelge 4.12. Birinci dönem normal toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu	59
Çizelge 4.13. İkinci dönem normal toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu	60
Çizelge 4.14. Birinci dönem rizosfer toprağında ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu	61
Çizelge 4.15. İkinci dönem rizosfer toprağında ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu	62

1. GİRİŞ

Azot tüm yaşamın temel yapı taşı oluşturarak elementlerden birisidir. Yaşayan tüm organizmaların içerisinde bir miktar azot bulunması gerekmektedir. Canlı türüne bağlı olarak azot mikrobiyal hücre ağırlığının %14'ünü oluşturur. Bu element yerkürenin toplam azotunun %97,8'i oranında organizmaya ulaşamayan haliyle litosfer ve ana kayada da bulunur (Meire ve Altman 1998; Perotti ve Pidello 2012). Fakat canlıların yararlanabileceği azot formu toprakta en çok organik formda ve organik maddede bulunur. Canlıların bu kaynaklardaki azottan yararlanabilmesi için azot döngüsünde yer alan biyolojik azot fiksasyonu, amonifikasyon, immobilizasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon gibi biyokimyasal olayların gerçekleşmesi gerekmektedir (Kızıloğlu 1999). Biyolojik azot fiksasyonu, N_2 gazını bitkinin yararlanabileceği form olan amonyağa (NH_3) dönüştürür. Mineralizasyon ise toprakta bolca bulunan organik formdaki azotun inorganik forma (NH_4) dönüştürülmesidir. Immobilizasyon, mineralizasyonun tersidir. Immobilizasyonda inorganik formdaki azot, amonyum ve nitrat formundan bitkiler ve toprak organizmaları tarafından organik forma dönüştürülür (White ve Scott 2006; Viers vd. 2012). Nitrifikasyonda ise NH_4 önce nitrite (NO_2^-) daha sonra nitrat iyonlarına (NO_3^-) okside edilir. Denitrifikasyon nitrat (NO_3^-) ve nitritin (NO_2^-) azotun gaz hali nitrik oksit (NO), nitroz oksit (N_2O) ve azot gazına (N_2) indirgenmesiyle oluşan mikrobiyal süreçtir. Bu biyokimyasal olayların gerçekleşmesinden mikroorganizmaların sorumlu olduğu bilinmektedir (Sağlam vd. 1993). Bu mikroorganizmalar bitki besin döngüsü ile toprak verimliliği arasında önemli rol oynarlar. Görev alan mikroorganizmalar içerisinde bakteri ve arkea grubunu kapsayan prokaryotlar başlıca rol oynayan gruptur. Bazı prokaryotlar, nitrifikasyon ve denitrifikasyon yoluyla metabolik enerji elde edebilirler (Cabello vd. 2004). Ayrıca bu organizmalar bitki besin döngüsü ile toprak verimliliği arasında önemli rol oynar. Bunlar arasında azot döngüsünde toprakta en önemli ve aktif rol alan canlıların başında bakteriler gelmektedir.

Nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterileri toprakta azotun bitkiye yararlılığı ve toprak sistemi içerisindeki kaderini belirlemede önemli rol oynadığı için tarımsal ve çevresel olarak önemlidir. Nitrifikasyonla üretilen fazla nitrat, yer altı suyunun kirlenmesine neden olurken denitrifikasyonun gaz halindeki yan ürünleri (NO ve N_2O) sera etkisi oluşturur (Prosser 1989). Yakın zamana kadar, yavaş büyüme ve laboratuvarında izole etmenin zorluğu amonyumu okside eden bakteriler (AOB) ile nitriti okside eden bakteriler (NOB)'in fizyolojik ve ekolojik olarak çalışılmalarını kısıtlamıştır. Moleküler tekniklerin geliştirilmesi, toprakta bakteri dağılımı, çeşitliliği ve popülasyon dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Kowalchuk ve Stephen 2001). Bundan ötürü son yıllarda yapılan çalışmalar nitrifikasyon ve denitrifikasyon süreçlerinden sorumlu mikroorganizmaların tanımlanması ve tespiti üzerine yoğunlaşmıştır (Hayatsu vd. 2008).

Toprağa en çok azot ilavesi organik gübreler ve kimyasal gübrelerle yapılmaktadır. Fakat hem toprak sağlığının iyileştirilmesi, korunması ve hem de besin elementlerinin ortama sunulması sadece organik gübrelerle sağlanmaktadır. Azot elementi organik maddenin yapı taşı oluşturduğundan, mineralizasyonu sonucunda ortama azot ilave edilmiş olur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tarımsal üretimde kaliteli ve sağlıklı ürün yetiştirmeyi hedefleyen sürdürülebilir tarım sistemleri öne çıkmaktadır. Toprak verimliliğinin devamlılığı ve gelişimi için toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik

özelliklerinin iyileştirilmesi ve istenilen seviyelerde tutulması gerekmektedir. Bunun için organik gübre uygulamaları tavsiye edilmektedir. Bu bağlamda geleneksel olarak en sık kullanılan organik gübreler arasında kompost ve çiftlik gübresi ilk sıralarda yer almaktadır. Çiftlik gübresi, bir hayvan tarafından alınan besinlerin büyük bir bölümünü içerdiğinden, geri dönüştürüldüğünde ve organik gübre olarak kullanıldığında bitkiler için değerli bir besin kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Hayvansal üretimin yüksek olduğu bölgelerde atık olarak görülse de değerli bir kaynak olarak doğrudan ya da işlendikten sonra kullanılabilir. Son yıllarda geleneksel organik gübrelere alternatif olarak karşımıza vermikompost çıkmaktadır. Vermikompost, solucanların sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmaların ortak çalışması sonucu organik atıkların termofilik safha olmadan parçalanması sonucu elde edilen bir organik gübre çeşitidir. Besin elementleri açısından zengin olması ve toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra iki önemli özelliği ile vermikompost, diğer organik gübrelere ayrılır. Bunlar bitki gelişimini destekleyen bileşikler içermesi ve bitki patojenlerini baskılama özelliğine sahip olmasıdır (Longsdon 1994; Şimsek-Erşahin 2009).

Vermikompost ile ilgili dünyada birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat bu çalışmaların birçoğu bitki gelişimi ve verim üzerine etkileri, patojen baskılama özelliği ve vermikompost üretim mekanizmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar genel olarak topraktaki biyolojik aktiviteyi temsil eden bazı parametreler ile sınırlı kalmıştır. Bu parametreler her ne kadar toprağın biyolojik durumunun iyi bir göstergesi olarak kabul ediliyor olsa da topraktaki mikrobiyal durumu bir bütün olarak ifade etmemektedir. Toprağa yapılan her uygulama toprağın mikrobiyal topluluk yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana getirmektedir. Bundan dolayı topraktaki mikrobiyal çalışmalarda özellikle önemli besin döngülerinde görev alan mikroorganizma gruplarının topluluk yapısı ve çeşitliliklerinin gözlenmesi topraktaki biyolojik dinamikleri ve bitkiler de dahil olmak üzere diğer canlı gruplarına etkilerini anlamak açısından çok önemlidir. Bu tür ekolojik çalışmalarda en çok kullanılan yöntemler DNA teknolojilerine dayalı “kültürden bağımsız” moleküler tekniklerdir. Ancak ilginçtir ki uluslararası literatürde özellikle vermikompost ile ilgili topluluk yapısı analizini kapsayan az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Son dönemlerde genom ve dizileme teknolojisinde gerçekleşen gelişmelerde mikrobiyal komünite analizinde kültürden bağımsız tekniklerin kullanılmasıyla mikrobiyal ekoloji devri başlamıştır. Bugün için moleküler mikrobiyal ekoloji çalışmalarında en fazla kullanılan hızlı izleme yöntemlerinin başında DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) ve T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) gelmektedir. Bu yöntemler genel olarak parmak izi yöntemleri olarak da bilinmektedir. DGGE yöntemi, DNA zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlayan özel bir jel içerisinde PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ürününün yürütülmesi ve dizi farklılıkları nedeniyle farklı bakteri türlerinden gelen PZR ürünlerinin birbirinden ayrılarak jelde gözle görülebilir farklı bantlar oluşması temeline dayanır. Ancak toprak gibi kompleks toplulukların bulunduğu ortamların analizinde sonuçların yorumlanması ve tekrar edilebilir sonuçların alınmasında zorluklar yaşanabilmektedir (Muyzer ve Smalla 1998). Diğer bir yöntem olan T-RFLP, toprak ortamında kullanıma daha uygundur ve en önemlisi doğrudan taksonomik düzeyde veri sağlamaktadır. DGGE’ye göre diğer bir üstünlüğü de otomasyona bağlanabilmesidir. Bu yöntem, flüoresan boya ile etiketlenmiş PZR primerleri ile toprak DNA’sı içinde ilgilenilen genin çoğaltılması ve enzimler ile kesilmesi ile oluşan DNA parçalarının boyut farklılıklarının flüoresan etiket

yardımıyla belirlenmesi temeline dayanır. Fakat bu yöntem kullanılmadan önce ilgilenilen bakteriyel grubun toprakta detaylı moleküler ekolojik analizlerinin yapılmış olması ve o toprak ile ilgili kapsamlı bir dizi veri tabanına sahip olunması gerekmektedir (Castro vd. 2005; Uz ve Ogram 2006). Ülkemizde bu amaca yönelik detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Uluslararası literatürde özellikle vermikompost uygulanmış topraklarda mikrobiyal topluluk yapısı ve çeşitlilik üzerine yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Aynı şekilde ülkemizde de toprakta bakteri topluluk yapısını inceleyen benzer bir çalışma mevcut değildir. Bunun bir sonucu olarak, bu çalışmanın amacı vermikompostun nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterileri özelinde topraktaki bakteriyel topluluk yapısındaki etkilerini çiftlik gübresi ile karşılaştırmalı olarak ve kültürden bağımsız moleküler teknikler kullanılarak incelemektir.

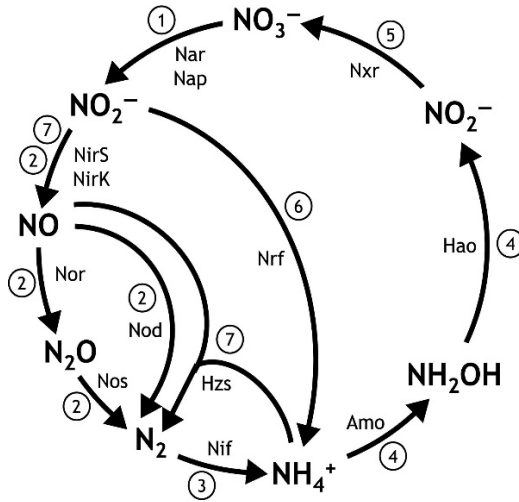


2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Azot Döngüsü

Azot elementi atmosferde gaz formunda %78 oranında bulunmakla birlikte atmosferin haricinde birçok farklı formda litosferde ve hidrosferde de bulunur ve bu ortamlar arasında devamlı bir döngü halindedir. Hücrelerin yapı taşlarından biri olan azot, DNA, RNA, protein gibi birçok temel biyomolekölün yapısında yer alır (Denk vd. 2017). Bu yüzden canlılığın devamı için önemli elementlerden biridir. Azotun topraktaki davranışı bir dizi reaksiyon tarafından yönlendirilir. Bunlar: Amonifikasyon (mineralizasyon), fiksasyon, nitrifikasyon, denitrifikasyon ve immobilizasyon reaksiyonlarıdır.

Amonifikasyon, toprakta organik formdaki azotun çeşitli fungus ve prokaryotlar aracılığıyla inorganik form olan amonyak (NH_3) formuna dönüştürülmesidir. Bulunduğu çevreye göre asidik ya da nötral koşullarda amonyak (NH_3) veya amonyum (NH_4^+) formunda olabilir fakat aerobik şartlar altında önce nitrit (NO_2^-)'e sonra nitrat (NO_3^-)'a dönüştürülebilir. Bitkilerin çoğu tercih ettikleri azot kaynağına göre NO_3^- ya da NH_4^+ kullanabilirler. Atmosferde bulunan ve normalde canlılar tarafından kullanılamayan azotun kullanılabilir forma dönüştürülmesi olayı azot fiksasyonu olarak adlandırılır ve döngünün devamı açısından önemlidir. Toprakta bazı serbest ya da simbiyotik bakteriler bu kabiliyete sahiptir (Bernhard 2010; Denk vd. 2017). Nitrifikasyonda ise amonyum iyonları önce amonyum okside eden bakteriler tarafından nitrit (NO_2^-)'e ve sonra nitrit okside eden bakteriler tarafından nitrat (NO_3^-)'a dönüştürülür. Nitrifikasyon ototrofik bir işlem olup görev alan bakteriler oksidasyon sonucunda doğrudan enerji elde ederler. Biyolojik olarak kullanılabilen nitratın (NO_3^-) nitrojen (N_2) formuna dönüştürülmesi ve atmosfere salınması ise denitrifikasyon olarak adlandırılır. Denitrifikasyon bir anaerobik solunum olayıdır ve genelde oksijenin kısıtlı olduğu aerobik/anaerobik geçiş bölgelerinde görülür (Stein ve Klotz 2016). Immobilizasyon ise amonifikasyonun (mineralizasyon) tersi bir olaydır ve topraktaki amonyum ve nitratın toprak organizmaları ve bitkiler tarafından bünyelerine katılarak organik azot formuna dönüştürülmesini kapsar.



Şekil 2.1. Biyolojik azot döngüsünde rol alan anahtar genler; 1-nitrat redüksiyonu; 2-denitrifikasyon; 3- azot fiksasyonu; 4- aerobik amonyak oksidasyonu; 5- aerobik nitrit oksidasyonu; 6- amonyuma indirgeyici nitrit redüksiyonu (DNRA); 7- anaerobik amonyak oksidasyonu. **Genler:** Nar/Nap, dissimilatory nitrat redüktaz; NirK/NirS, NO-oluşturan nitrit redüktaz; Nor, Nitrit oksit redüktaz; nod; nitrik oksit dismutaz; Nos, azot oksit redüktaz; Nif, nitrojenaz; Amo, amonyak monooksijenaz; Hao, hidroksilamin oksiredüktaz; Nxr, nitrit-nitrat oksidoredüktaz; Nrf, assimilatory amonyak oluşturan nitrit redüktaz; Hzs, hidrazin sentaz. (Şekil Rasigraf vd. (2017)’den alınmıştır).

2.2. Nitrifikasyon

Nitrifikasyon olayı NH_4 ’ün NO_3^- ’e biyolojik oksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. İki grup bakteri tarafından gerçekleştirilmektedir bunlar; kemolitotrofik amonyum-okside edici bakteriler (AOB) ve nitrit okside edici bakteri grupları (NOB) bu proseste görev almaktadırlar. Nitrifikasyon, bakteriler tarafından NH_4 hidroksilamine (NH_2OH)’e okside edilince başlar (Richarson 2000; Bergmann vd. 2005). Daha sonra hidroksilamin nitrite oksitlenmiş olur. Toprakta amonyum okside edici bakterilerin yavaş gelişimi, azot döngüsüne fizyolojik sınırlama getirdiği için son derece dikkat çekicidir (Levy- Booth 2014).

Nitrifikasyon küresel azot döngüsünde merkezi bir prosestir çünkü organik bileşiklerin parçalanması sonunda amonyumun oluşum aşaması ile denitrifikasyon aşaması arasında yer alır ve bu süreçleri birbirine bağlar. Mineralizasyon ve denitrifikasyon ile karşılaştırılınca nitrifikasyon daha sınırlı bir organizma grubu tarafından yürütülür. Önceleri nitrifikasyondan sorumlu bakterilerin sadece proteobacteria grubunda yer aldığı düşünülmekte iken sonraki çalışmalar amonyumu okside eden organizmaların 4 farklı taksonomik grupta yer aldığını göstermiştir. Bu gruplar betaproteobacteria (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*), gammaproteobacteria (*Nitrosococcus*), plantomyces ve archaea’dır (Purkhold vd. 2000; Kuenen 2008). Nitriti okside eden bakteriler de alphaproteobacteria (*Nitrobacter*), gammaproteobacteria (*Nitrococcus*), deltaproteobacteria (*Nitrospina*) ve Nitrospirae (*Nitrospira*) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır (Teske vd. 1994; Lebedeva vd. 2008).

Nitrifikasyon sürecinde genel olarak amonyum oksidasyonunun sınırlayıcı aşama olduğunun düşülmesi nedeni ile yapılan çalışmaların çoğunluğu proteobacteria grubunda yer alan amonyumu okside eden bakteriler (AOB)'nin karakterize edilmesi ve çeşitliliği üzerine yoğunlaşmıştır. Bazı farklı ortamlardan izole edilen bakterilerden elde edilen rDNA dizileri ve bunların filogenetik analiz sonuçlarına göre betaproteobacteria grubundaki *Nitrosomonas* ve *Nitrospira* başta 7 alt gruba ayrılmış [*Nitrospira*, alt grup 1-4; *Nitrosomonas*, alt grup 5-7] ve 2., 3. ve 4. alt grupta bulunan *Nitrospira* türlerinin toprakta baskın olduğu görülmüştür (Stephen vd. 1996; Prosser ve Embley 2002; Hayatsu vd. 2008). Daha sonraları saf kültürlerde yapılan dizi analizleri de bu gruplamayı destekleyen sonuçlar vermiştir (Purkhold vd. 2000). Bu gruplaşmadan yola çıkarak klonlama, dizi analizi ya da DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) ve T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) gibi parmak izi (finger print) metotları yardımı ile bakterilerin doğal ortamdaki çeşitliliğini araştırmak üzere 16S rDNA'yı hedefleyen PZR primerleri dizayn edilmiş ve kullanılmıştır (McCaig vd. 1994; Voytek ve Ward 1995; Ward vd. 1997).

Amonyumun ototrofik AOB tarafından oksidasyonunda iki temel enzim görev almaktadır. Bunlar amonyumun hidroksilamine dönüşümünü katalizleyen amonyum monooksijenaz (Amo) ve hidroksilamini nitrite çeviren hidroksilamin oksiredüktaz (Hao) enzimleridir. Ototrofik AOB'de bulunan AMO, 3 alt ünite içerir ve bu alt üniteler *amoC*, *amoA* ve *amoB* genleri tarafından kodlanır. AMO enziminin α -gen bölgesinin kodladığı *amoA* marker geni varlığı tespit edilmeye çalışılarak moleküler olarak kullanılır. *AmoA* geni enzimin aktif olan alt ünitesini kodlayan ve çevresel örneklerde AOB çeşitliliğini incelemek üzere moleküler marker olarak en çok kullanılan genidir (Rotthauwe vd. 1997; Stephen vd. 1999; Bothe vd. 2000; Nicolaisen ve Ramsing 2002). Bu genin moleküler marker olarak tercih edilmesinin en büyük sebebi bu genin enerji üretim aşamasında görev alması ve gen dizisinin ekolojik çalışmalarda kullanılabilecek ölçüde korunmuş olmasıdır (Norton vd. 2002; Calvo ve Garcia-Gil 2004; Schmid vd. 2008).

AOB topluluğunu saptamak için farklı şartlarda ve ortamlarda 16S rDNA ve AMO genlerini hedefleyen primerler oluşturulmuş filogenetik analizlerde kullanılmıştır (Ndour vd. 2008; Whang vd. 2009). AOB topluluk yapısı ve varlığının *amoA* geni temelinde yapılan çalışmalarda *N. europaea* (L080050) primerleri olan *amoA1F* ve *amoA2R* kullanılmaktadır (Levy- Booth 2014). AOB topluluklarının *amoA* fonksiyonel geni ile çalışılması neticesinde;

1. Toprağın biyokimyasal özelliklerinin nitrifikasyon bakterileri üzerine etkisi,
2. N₂O salınımı ve nitrifikasyon oranı üzerine *amoA* geni topluluk varlığı ve yapısının etkisi,
3. Hem doğal (yangın) hem de antropojenik (gübreleme, birikme) faktörlerdeki değişimlerin amonyum okside edicilerin gelişimi ve aktivitesi üzerine etkileri belirlenebilir.

AOB *amoA* geni methan monooksidaz (*pmoA*) geni ile yakın ilişkili olduğundan (Holmes vd. 1995; Purkhold vd. 2000), metan okside eden bakterilerin (MOB) aynı zamanda NH₄ oksidasyonu yapabileceği de bildirilmektedir (Bedard ve Knowles 1989). Bunların haricinde bitki veya ağaç çeşitleri, sıcaklık, yarayışlı su miktarı, C:N oranı ve

toplam N miktarı da AOB topluluk yapısındaki değişimlerle yakından ilişkilidir (Levy-Booth vd. 2014). Amonyum oksidasyonunu kısıtlayan faktörlerden birisi de toprak pH'ıdır. Yapılan saf kültür çalışmalarında AOB'nin pH 6'nın altındaki değerlerde gelişemediği görülmüştür (Allison ve Prosser 1991; Allison ve Prosser 1993). Fakat yine de bu tür topraklarda amonyum oksidasyonunun olduğu gözlenmiştir (Nicol vd. 2008). Bunun muhtemel nedeni düşük pH ortamlarına adapte olmuş AOB suşlarının var olduğu ama bunların kültüre dayalı teknikler vasıtasıyla tespit edilememiş olmasıdır. Ancak, asidik topraklarda kireç ilavesi ile AOB etkinliğinin daha fazla arttığı da bilinmektedir (Levy-Booth 2014).

Toprakta nitrifikasyon sürecinde görev alan mikrobiyal toplulukların değişimini ve aktivitelerini moleküler metodlar ile inceleyen çok farklı çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmalara yakından bakıldığında topraklardaki nitrifikasyon bakterilerinin değişimlerinin gübreleme materyalleri (organik, inorganik), ekstrem şartlar (coğrafya, iklim, maden yatağı, düşük-yüksek pH) ve bitki yetiştiriciliğinin nitrifikasyona etkisi şeklinde farklı başlıklar altında incelendiği görülmüştür.

Organik gübre uygulamasıyla yapılan çalışmalara baktığımızda Richard vd. 1997 tarafından yapılan, domuz gübresi uygulanan toprakta amonyum okside edicilerin tespiti ve tanımlanması için moleküler teknikler kullanılmıştır. 16S rDNA-PZR analizi sonucu gübre uygulanan ve uygulanmayan toprakta *Nitrosospira* tespit edilmiş iken *Nitrosomonas*'a ise sadece yüksek miktarda gübre uygulanan toprakta rastlanmıştır. Bununla alakalı başka bir çalışmada Harter vd. (2014), toprağa farklı dozlarda ve yüksek sıcaklıkta biochar uygulaması sonrası azot fiksasyonu, nitrifikasyon ve denitrifikasyonla alakalı mikrobiyal fonksiyonel genlerin (sırasıyla *nifH*, *amoA*, *nirK*, *nirS* ve *nosZ*) değişimini izlemişlerdir. Sonuç olarak; biochar uygulamasının *nosZ* geni sentezini önemli ölçüde arttırarak toprakta nitroz oksit salınımının artmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Organik gübre uygulaması ile topraktaki amonyum dönüştüren mikroorganizmaların varlığı ve çeşitliliğinin izlendiği başka bir çalışmada; Sher vd. (2012) toprak yüzeyindeki AOB'nin oldukça fazla olduğu, derinlere gidildikçe sayılarının azaldığı, bu bakterilerin varlığının toprağın gözeneklilik, su miktarı, amonyum konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçlar göstermiştir ki organik gübre uygulanan üst topraktaki nitrat akümüasyonu aerobik nitrifikasyon neticesinde meydana gelmektedir. Wang vd. (2013) tarafından yürütülen başka bir çalışmada, hayvan gübresi uygulamasının toprakta amonyum okside edici topluluğa ve potansiyel nitrifikasyona olan etkileri moleküler ve biyokimyasal tekniklerle izlenmiştir. Sonuçta; gübre uygulanmış toprağın AOB popülasyonunun arttığı ve *amoA* sentezinin de buna bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, potansiyel nitrifikasyonun da gübrelenen toprakta artış gösterdiği tespit edilmiştir. Liu vd. (2014) yaptıkları bir çalışmada ise biochar uygulaması yapılan toprakta N₂O (nitroz oksit) salınım durumunu incelenmişler ve toprağa %4 oranında biochar uygulaması ile *amoA* ve *nirS* genleri vasıtasıyla toprakta N₂O salınımının düştüğü tespit edilmiştir. Alkali reaksiyonlu toprağa anız biocharı farklı oranlarda ilave edilerek topraktaki AOB ve AOA gelişimini izleyen Song vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada AOA kaynaklı *amoA* geninin topraktaki amonyum oksidasyonundan daha fazla sorumlu olduğu belirlenmişlerdir. Ancak, biochar uygulamasının genel olarak topraktaki amonyum okside edicilerin varlık ve kompozisyonunu önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür.

Yine farklı organik gübre uygulamalarına baktığımızda, Aparna vd. (2014)

tarafından organik gübreleme altındaki narenciye bahçesi toprağındaki mikrobiyal topluluk ve fonksiyonel genler ile enzim aktivite değişimlerinin izlendiğı bir çalışma yürütülmüştür. Sonuç olarak; azot fiks edici, amonyum okside edici, nitrit okside edici ve kükürt okside edici toplulukların gübreleme neticesinde önemli bir değişikliğe uğramadığı, ancak enzim aktivitelerinin (dehidrogenaz, β -glikosidaz, fosfataz) artış gösterdiği tespit edilmiştir. Paranychianakis vd. (2013) tarafından yürütülen arıtma çamuru kompostunun toprakta azot döngüsünden sorumlu mikrobiyal fonksiyonel genler ve nitrifikasyon üzerine etkisinin incelendiğı bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre arıtma çamuru uygulanan topraktaki *amoA*, *nirS*, *nirK*, *nosZ* gibi nitrifikasyon-denitrifikasyondan sorumlu genlerin farklılık göstermediğı tespit edilmiştir. Bu duruma, kompost kaynaklı aerobik heterotrofik mikroorganizma rekabeti sonrası çamurdaki organik C yarıyışlılığın düşük olması sebep gösterilmiştir. Büyükbaş hayvan gübresinin kompostlanması esnasında yapılan başka bir çalışmada ise AOB ve AOA'nın varlık ve çeşitliliğini moleküler tekniklerle inceleyen Yamamoto vd. (2010) AOB topluluğı yapısının 60°C'nin üzerinde değiştiğı bu aşamada *Nitrosomonas europaea*'nın baskın hale geldiğini belirlemiştir. Ancak, bu aşamada arkeal *amoA* geni kopyalarının bakteriyel genlerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, AOB ve AOA'nın kompostlama sistemlerinde nitrifikasyondan sorumlu olduğunu göstermiştir. Oishi vd. (2012) büyükbaş hayvan gübresi kompostlanması esnasında AOB ve AOA'nın varlık ve aktivitelerini incelemiştir. Sonuçlara göre bakteri topluluğı içinde *Nitrosomonas halophila* ve arkea topluluğı içinde ise *Nitrososphaera gargensis*'in dominant olduğu belirlemiştir. Toprağı organik ve inorganik gübre uygulaması sonrası 3 farklı sezonda münavebeli ürün yetiştiriciliğı ile topraktaki arkea varlığının izlendiğı bir çalışmada ise Chan vd. (2013) organik gübre uygulanan vejetasyon altındaki toprakta bakteriyel amonyum okside edicilere göre arkeal amonyum okside edicilerin *amoA* geninin baskın olduğu tespit etmişlerdir.

İnorganik gübrelemeyle alakalı çalışmalara baktığımızda ise; Song ve Lin (2014) tarafından yapılan çalışmada azotlu gübrelemeye AOA'nın AOB'ye göre daha etkili cevap verdiği görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada Li vd. (2014) çeltik toprağındaki AOA ve AOB'nin mineral N karşısındaki aktivitelerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlara rizosfer bölgesinde AOB'nin gelişimi istatistiksel olarak önemli ölçüde teşvik edilmiş ve *Nitrosospora spp.*'nin varlığının arttığı görülmüştür. Wang vd. (2009)'nin yaptıkları bir çalışmada ise çeltik tarlasında azotlu gübrelemenin topraktaki AOB ve AOA topluluk yapısına etkisi *amoA* geni ile incelenmiş ve AOB topluluğunun baskın olarak *Nitrosomonas spp.* alt grup 3'den oluştuğı tespit edilmiştir. Kong vd. (2010) yüksek azotlu gübreleme uygulanan koşullarda topraktaki mikro agregatlarda stabil C içeriğı sayesinde nitrifikasyon ve denitrifikasyondan sorumlu mikrobiyal toplulukların gelişiminin teşvik edildiğı görülmüştür. Farklı azot kaynaklarının toprağı uygulanarak topraktaki amonyum okside edicilerin durumunun moleküler metotlarla izlenmesini hedefleyen bir çalışmada Habteselassie vd. (2013) AOB'nin amonyum sülfat ve sıvı çöp gübresi uygulaması ile artış gösterdiği belirlemiştir. Ayrıca AOB'nin *Nitrosospora multiformis* ile ilişkili olduğu tespit etmişlerdir. Akiyama vd. (2014)'nin farklı toprak tiplerinde yaptıkları bir çalışmada toprağı üre uygulamasından sonra nitroz oksit ve metan gibi sera gazlarının salınımları izlenmiş, bakteriyel ve arkeal *amoA* geni sentezi ile metan oksidasyonu arasında yakın bir ilişki olduğu ve azotlu gübrelemenin bunda oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Andisol toprağına azotlu ve fosforlu gübre uygulamasının mikrobiyal topluluk kompozisyonu ve amonyum oksidasyon geni (*amoA*)

üzerine etkisini inceleyen çalışmada Jorquera vd. (2014), 6. yılın sonunda N-P uygulamasının topraktaki bakteri topluluğu ve çeşitliliği ile nitrifikasyon üzerine olumlu etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Norman ve Barrett (2014)'in laboratuvar inkübasyon denemesi şeklinde yürüttüğü çalışmada, toprağa sınırlı düzeyde amonyum, P ve K içeren uygulama yapılmış daha sonra bu toprakta AOB ve AOA topluluklarının gelişimleri gözlemlenmiştir. Sonuçta, substrat yarayışlılığı AOB kaynaklı nitrifikasyona doğrudan etkili olurken yüksek konsantrasyonda substrat ilavesinin AOA topluluğunun gelişimini engellediği belirlenmiştir. Farklı tarım topraklarına N uygulaması yapılan bir çalışmada amonyum okside edicilerin varlığı ile nitrifikasyon potansiyelini karşılaştırmalı olarak inceleyen Shen vd. (2014), amonyumlu gübreleme sonrası, *amoA* geni varlığında, alkali ve nötr reaksiyonlu toprağın amonyum oksidasyon kapasitesinin asit reaksiyonlu topraktan daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Cavagnaro vd. (2008) işlenmiş ve amonyumlu gübre ilave edilmiş toprakta AOB popülasyonunun çok hızlı bir artış gösterdiğini ve nitrifikasyonun hızlandığını belirlemişler ve topraktaki doğal amonyum miktarının düşük olmasının bu durumu teşvik ettiğini bildirilmişlerdir.

Sun vd. (2014) tarafından yapılan 20 yıllık bir çalışmadaki filogenetik analizler azot döngüsüne ait fonksiyonel genlerin toprak tipinden daha ziyade coğrafik lokasyondan etkilendiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada (Chu vd. 2007) uzun süreli organik ve kimyasal gübreleme altındaki toprakta AOB topluluk yapısındaki değişimler incelemiş ve AOB topluluk yapısının PK'lı gübrelemeye göre N'lu gübrelemeden daha fazla etkilendiği ve N'lu gübreleme sonucunda *Nitrosospora* küme 3'ün toprakta baskın duruma geldiği görülmüştür. Bu sonuçlar göstermiştir ki uzun süreli N'lu gübreleme topraktaki AOB topluluğunu ve nitrifikasyon potansiyelini arttırmaktadır. Uzun süreli organik ve inorganik gübrelemenin topraktaki bakteriyel topluluğa ve toprak biyokimyasal proseslerine olan etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada Chinnadurai vd. (2014) organik gübrelemenin 16S rRNA ve *nifH* genleri sentezini, inorganik gübrelemenin ise *amoA* geni sentezini arttırdığını belirlemişlerdir. Zhang vd. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada uzun süreli gübreleme altındaki toprakta amonyum oksidasyonundaki değişimler incelenmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlara göre NPK gübrelemesi ile toprağın AOB topluluğunun baskın hale geldiği ve toprağın nitrifikasyon aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, gübrelemenin AOA topluluğuna önemli bir etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir. Uzun süreli gübrelemeye karşı toprakta AOB ve AOA'nın verdiği tepkileri izlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada Xiao vd. (2014) AOA kaynaklı *amoA* geni kopyasının AOB kaynaklı *amoA*'dan önemli ölçüde fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Bitki bazlı çalışmaları incelediğimizde ise; çeltik toprağına farklı organik ve kimyasal gübre uygulamalarının topraktaki potansiyel nitrifikasyon oranı ve AOB ile AOA kaynaklı *amoA* gen varlığı durumunun incelendiği bir çalışmada Wang vd. (2014) AOA'nın besince fakir alt toprak katmanına adaptasyonunun AOB'den daha iyi olduğu tespit etmişlerdir. Çeltik tarlasında kısıtlı sulamanın toprak prokaryotik toplulukları ve sera gazı emisyonları üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada Ahn vd. (2014) su kısıntısı uygulandığında amonyum oksidasyonundan sorumlu bakteriyel *amoA* geninin sentezinin azaldığı ve buna bağlı metan (CH₄) salınımının da bir miktar azaldığı tespit etmişlerdir. Çeltik vejetasyonu altındaki toprağın mineralizasyon, nitrifikasyon ve AOB-AOA topluluklarındaki değişimlerin incelendiği bir çalışmada Jiang vd. (2013) AOB topluluğuna ait *amoA* geninin amonyumlu gübreleme ile artış gösterdiğini, ancak

AOA'nın buna yanıt vermediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, arkea topluluğunun nitrifikasyondan ziyade mineralizasyona pozitif etkisinin olduğu da belirlenmiştir. Huang vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada AOA ve AOB topluluk yapısının toprağın kil minerali tipi, amonyum kapsamı, toplam organik karbon miktarı ve pH'ı gibi birçok faktörden etkilenerek değiştiği tespit edilmiştir. Nie vd. (2014) çeltik bitkisi rizosfer toprağındaki 16S rRNA, bakteriyel-arkeal *amoA*, *nosZ* genlerinin normal toprağına göre daha düşük miktarda olduğunu ve bu ilginç durumun sınırlı azot ortamında çeltik kökleri ile mikrobiyal topluluk arasındaki rekabetin bir sonucu olduğunu bildirilmişlerdir. Nemeth vd. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada ise iki farklı mısır tarlasında oluşan nitroz oksit ile azot döngüsü fonksiyonel genleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve her iki tarlada *amoA* ve *nirS* genlerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür. Junier vd. (2009) tarafından fasulye yetiştirilen ve yetiştirilmeyen iki farklı alanda yapılan bir çalışmada fasulye bitkisinin dominant AOB topluluğu olan *Nitrosospora* alt grup 3'ü etkilemediğini ancak *Nitrosomonas* alt grup 8'in her dönemde tespit edilebilir hale geldiğini bildirmişlerdir. Dias vd. (2012), patates yetiştirilen bir alanda AOA populasyonunun AOB'den genel olarak fazla olduğunu ve patates varyete farklılığının hem AOB hem de AOA topluluk yapısını önemli ölçüde etkilediğini rapor etmişlerdir. Li vd. (2013) serada sulama dönemlerinde rizosferde *amoA* geni sentezinin ve nitrifikasyonun arttığını rapor etmişlerdir. Rachid vd. (2012)'nin yaptığı bir çalışmada, şeker kamışı vejetasyonu altındaki toprakta bakteriyal topluluktaki değişimler *amoA* ve *nirK* fonksiyonel genleri temelinde izlenmiş ve toprağın bakteriyal *amoA* ve *nirK* genlerinin, bitki yetiştirilmeyen toprağına göre önemli ölçüde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Wang vd. (2014) yükselen sıcaklığın toprakta *amoA* geninin varlığını ve mikrobiyal çeşitliliği arttırdığını tespit edilmişlerdir. Arazi kullanım rejiminin amonyum okside edici bakterilerin varlık ve çeşitliliği üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada Zhao vd. (2015), bakteriyal *amoA* gen kopyalarının arkeal *amoA*'ya göre neredeyse iki katı olduğunu, çim ve yabancı ot bulunan topraklardaki bakteriyal-arkeal *amoA*'nın diğer arazi tiplerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3. Denitrifikasyon

Nitrati (NO_3^-) ve nitriti (NO_2^-), nitrik oksit (NO), nitroz oksit (N_2O) ve dinitrojene (N_2) indirgeyen süreç denitrifikasyon olarak tanımlanır ve bu işlem bir anaerobik solunum şeklidir. Toprakta denitrifikasyon yeteneğine sahip olan bakteri sayısı oldukça fazladır. Denitrifikasyon bakterileri topraktaki toplam bakteri popülasyonunun %0.5-5'lik kısmını oluşturmaktadır (Henry vd. 2006; Demaneche vd. 2009; Bru vd. 2011). Toprakta oldukça fazla olmalarına rağmen bu bakteriler, dominant bakteriler arasında yer almamaktadırlar. Denitrifikasyon bakterilerinin çoğu genel olarak *Paracoccus*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* grupları içerisinde yer almakla birlikte *Thiobacillus* ve nadiren *Hyphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium* veya *Serratia* türleri de denitrifikasyonu gerçekleştirebilir (Cavigelli ve Robertson 2000; Jha 2015).

Denitrifikasyon bir oksijensiz solunum olayı olmasına karşın aerobik ortamlarda da görülmektedir. Özellikle toprak ortamında biyolojik aktivite ile oksijen seviyesinin düşmesi sonucu oluşan mikro çevrelerde (rizosfer bölgesi, agregatlar vb.) denitrifikasyon olayı görülür. Denitrifikasyon enzim aktivitesi oksijen (O_2) tarafından inhibe edilir ve ayrıca bu enzimlere ait genlerin ekspresyonu baskılanır. Fakat birçok bakterinin doğrudan oksijenli ortamda denitrifikasyon olayını gerçekleştirdiği de tespit edilmiştir. Toprak da dahil birçok farklı ortamdan izole edilen aerobik türler *Enterobacter*, *Sphingomonas*,

Mesorhizobium, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Agrobacter* ve *Burcholderia* gibi farklı türlerdir. Saf kültürde en çok çalışılan aerobik denitrifikasyon türlerinden biri *Paracoccus denitrificans*'ın denitrifikasyon enzimlerini sürekli ürettiği ve aktif olduğu (constitutive enzyme) görülmüştür. Yine birçok farklı ortamdan izole edilen *Comamonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacter*, *Thiobacillus*, *Burcholderia*, *Enterobacter* ve *Bacillus* cinslerine ait birçok bakterinin, oksijenin varlığında denitrifikasyonu gerçekleştirme yeteneğine sahip oldukları rapor edilmiştir. Oksijene maruz kalma süresince nor enzimleri inaktif olur fakat bu bakterilerin denitrifikasyon prosesini yöneten diğer enzimlerinin oksijenli şartlarda fonksiyonlarını sürdürebilme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür (Morley vd. 2008). Başka bir deyişle, oksijenli ortamda oksijenli solunum ve oksijensiz solunum (nitratlı solunum) aynı anda oluşmaktadır. Oksijenin bu bakterilerin denitrifikasyon aktiviteleri üzerine etkileri bakteriden bakteriye farklılık göstermektedir (Patureau vd. 2000; Hayatsu vd. 2008).

Denitrifikasyon, nar, nos ve nap operonlarının kodladığı Mo içeren bir enzim olan nitrat redüktaz aktivitesi (Nar) ile başlamaktadır. NO_3^- redüksiyonunda sıklıkla çalışılan genler *narG* ve *napA*'dır. Nitratin nitroz oksit ve azot gazına indirgenmesi sürecinde nitrat redüktaz (Nar) enzimi vasıtasıyla nitrat nitrite indirgenir. Bunun ardından sırasıyla nitrit redüktaz (Nir), nitrit oksit redüktaz (Nor) ve nitroz oksit redüktaz (Nos) enzimleri nitrik oksit, nitroz oksit ve azot gazı oluşumunu katalizler. Nitriti, NO veya N_2O 'e dönüştüren biri bakır diğeri sitokrom cd1 içeren iki farklı nitrit redüktaz enzimini ise sırasıyla *nirK* veya *nirS* genleri tarafından kodlanır ve bu genler moleküler marker olarak kullanılır (Murugapiran vd. 2013).

AOB'nin tersine denitrifikasyon bakterileri çok sayıda farklı filogenetik gruba dağılmış durumdadır. Denitrifikasyon spesifik bir taksonomik grubun tekeline değildir (Zumft 1997). Dolayısı ile bu bakteri gruplarının 16S rDNA dizileri arasında çok büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle 16S rDNA'nın denitrifikasyon bakterilerinin farklı ortamlardaki çeşitliliğini araştırmak üzere kullanılması uygun değildir. Bunun bir sonucu olarak, denitrifikasyon bakterilerine yönelik yapılan moleküler ekolojik çalışmalar moleküler marker olarak fonksiyonel genlerin kullanılması temelinde yürütülmüştür. Denitrifikasyonda görev alan *nirK*, *nirS*, *nosZ*, *narG* ve *norB* gibi genleri hedefleyen primerler dizayn edilmiş ve PZR-RFLP, DGGE ve T-RFLP gibi moleküler tekniklerin yer aldığı birçok çalışmada kullanılmıştır. Denitrifikasyondan sorumlu fonksiyonel genler toprak ekosistemi ile yakın ilişki içerisindedir. Ancak genler ve toprak ekosistemi arasındaki etkileşimin boyutu henüz çok iyi bilinmemektedir. Bununla birlikte, *narG* ve *napA* genlerinin toprak karbonu ile pozitif ilişkide olduğu (Kandeler vd. 2009; Bru vd. 2011), ayrıca *napA* geninin değişebilir Mn ile de pozitif ilişkide olduğu (Bru vd. 2011) bilinmektedir. *NirS* ve *nirK* genleri ve genel olarak denitrifikasyon genleri ise O_2 , toprak nemi, sıcaklığı, toplam N konsantrasyonu, amonyum ve nitrat konsantrasyonu, alınabilir P konsantrasyonu, toprak organik maddesi, organik karbon ve pH değişimlerinden önemli ölçüde etkilenmektedir (Levy-Booth 2014). Tarım topraklarında *nirS* geni *nosZ* genine göre daha fazla sentezlenmektedir (Morales vd. 2010). Ayrıca, NO emisyonları *nirK* geni ile pozitif korelasyon gösterirken (Szukics vd. 2009), N_2O emisyonları *nirS* geni ile yakın ilişki göstermektedir (Morales vd. 2010; Rasche vd. 2011).

Organik gübre uygulamalarının denitrifikasyon üzerine nasıl etki ettiğine bakılacak olursa, Shi vd. (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada biyokömür ve organik gübre uygulanmış toprakta AOB ve *nirK* geni bulunduran denitrifikasyon bakterilerinin

N₂O emisyonuna katkıda bulunduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada Wang vd. (2020) biyokömür ilavesi yapılan çeltik topraklarında *nirS* ve *nirK* gen çeşitliliği ve denitrifikasyon bakteri topluluğunu incelemişlerdir. *NirS* ve *nirK* içeren denitrifikasyon bakterilerinin her ikisi de nitrit redüktazı kontrol etmesine rağmen, biyokömür uygulamasına verdikleri yanıtların çeşitlilik ve N₂'a katkı açısından önemli farklılıklar göstermiştir. Biyokömür uygulaması, *nirK* içeren denitrifikasyon bakterilerinin topluluk yapısını güçlü bir şekilde şekillendirirken, *nirS* içeren denitrifikasyon bakterilerinin topluluk yapısı nispeten sabit kalmıştır. Wolsing vd. (2004)'nin yaptığı bir çalışmada kimyasal gübre ve sığır gübresi uygulanan arazilerdeki denitrifikasyon bakteri topluluklarının zamansal ve mekansal varyasyonları incelenmiştir. PZR ile çoğaltılmış nitrit redüktaz (*nirK* ve *nirS*) gen fragmanları T-RFLP analizi kullanılarak araştırılmış ve *nirK* içeren bakterilerin topluluk yapısında önemli bir mevsimsel değişim ortaya çıkmıştır. Ayrıca, mineral gübre veya sığır gübresi ile muamele edilen alanlarda, farklı *nirK* içeren denitrifikasyon bakteri topluluklarının bulunduğu görülmüştür. Chen vd. (2022) biyogaz üretim atığının çeltik toprağındaki nitrit redüktaz aktivitesini mineral gübre uygulamasına kıyasla artırdığını bildirmişlerdir. *Sulfurifustis*, *Thiobacillus*, *Microvirgula* ve *Duganella*, çalışılan çeltik tarlalarında nitrit redüktaz aktivitesini yöneten ana cinsler olarak ortaya çıkmıştır. Artan dozlardaki biyogaz atığı uygulaması *nirS* ve *nirK* tipi denitrifikasyon bakteri bolluğunu ve yapısını büyük ölçüde değiştirmiştir.

İnorganik gübreleme ile ilgili çalışmalara bakıldığında ise, Wang vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada 30 yıl boyunca kimyasal gübre uygulanan toprakta nitrifikasyonun arttığını gözlemişlerdir. Artan nitrifikasyona karşılık alt toprakta denitrifikasyonun ve *nirS*, *nirK* tipi denitrifikasyon bakterilerinin arttığı rapor edilmiştir. Kimyasal gübre ilavesi sonucunda yikanan nitratin denitrifikasyon grupları aracılığıyla toprak altı N döngüsünü değiştirebileceği anlaşılmıştır. Çeltik yetiştirilen toprakta denitrifikasyon bakteri topluluklarının farklı fosfor düzeylerine tepkilerini inceleyen Zhan vd. (2019), P eksikliği olan çeltik toprağına fosfatlı gübre uygulamasının topluluk yapılarını değiştirerek *nirK* ve *nirS* içeren denitrifikasyon bakterileri bolluğunu önemli ölçüde artırdığını gözlemlemişlerdir. *nirS* tipi denitrifikasyon bakterilerinin bu değişime daha fazla hassasiyet gösterdiği rapor edilmiştir. Fu vd. (2021) aynı N uygulaması ve farklı uygulama zamanları ile yapılan mısır saksı denemesinde, verim ve toprak N₂O emisyonundaki değişimleri ve azot döngüsü ile ilgili fonksiyonel genlerin bolluğu ile N₂O emisyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve N₂O emisyonu ile AOB ve *nirK* genlerinin bolluğu arasında pozitif ilişki olduğunu, azot uygulama zamanlarının fonksiyonel genleri etkilediğini görmüşlerdir. Zeng vd. (2014) *nirK* tipi denitrifikasyon bakteri topluluk yapısının özellikle sera toprağında gübreleme rejimlerinden önemli ölçüde etkilendiğini göstermişlerdir. Toprak pH'ı, toprak organik madde kapsamı ve nitrat içeriğinin, bakteri topluluğu üzerinde büyük etkiye sahip olduğu saptanmış. Filogenetik analizler sera toprağında sadece anaerobik *nirK* tipi denitrifikasyon bakterilerinin değil, aynı zamanda *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Agrobacterium* gibi aerobik denitrifikasyon bakterilerinin de bulunduğunu göstermiştir.

Kuzeybatı Çin'in kurak bir bölgesinde damlama sulama ile sulanan üre ilave edilmiş pamuk tarlasında denitrifiye edicilerin artışına bakılan bir çalışmada Yin vd. (2019), denitrifikasyon yapan fonksiyonel genlerin (*narG*, *nirK* ve *nosZ*) bolluğu ile denitrifikasyon potansiyeli arasında pozitif bir ilişki olduğunu görmüşlerdir. Bunun bir

sonucu olarak gübre uygulamasının denitrifikasyonu ve bu sürece aracılık eden bakteri popülasyonunu artırarak N₂O emisyonunu arttırdığını bulmuşlardır. Zhou vd. (2021)'nin yaptığı bir çalışmada İç Moğolistan'ın Hetao Sulama Bölgesinde tipik hafif tuzlu toprak ve orta derecede tuzlu toprak, nitrifikasyon ve denitrifikasyon sürecinin tuzlanma derecesine kadar organik ve inorganik azot uygulama oranları incelenmiştir. Sonuçlar, artan tuzluluğun toprak nitrifikasyon potansiyelini azalttığını ve toprak denitrifikasyon kapasitesini arttırdığını göstermiştir. Tuzluluktaki artışla birlikte AOB bolluğu ve nitrifikasyon katkı oranı azalmış, ancak AOA bolluğu ve nitrifikasyon oranının arttığı görülmüştür. Hafif tuzlu toprakların ve orta derecede tuzlu toprakların, inorganik azotun tek başına uygulandığı topraklara kıyasla nitrifikasyonu ve denitrifikasyon süreçlerine daha elverişli olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada ise çeltik topraklarında uzun süreli pestisit ve kimyasal gübre uygulamasının mikrobiyal topluluklar, özellikle anammox ve denitrifikasyon bakterileri üzerindeki etkisini araştıran Rahman vd. (2021); nitrat, SOC (amonyak, toprak organik karbonu), N ve C içeriğinin, yayla topraklarına kıyasla pirinç tarlası topraklarında önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır. 16S rDNA, *hszB*, *narG*, *nirK*, *nirS* ve *nosZ* genlerinin bolluğu önemli ölçüde pirinç tarlası topraklarında azaldığını ve toprakların kimyasal özellikleri ile pozitif korelasyon olduğu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada çim alanda gübrelenen ve gübrelenmeyen kısımlarındaki farklı arazi kullanımlarının toprak amonyum okside edici ve denitrifiye edici mikroorganizmalar üzerine etkisinin incelenmiş ve çalışma sonucunda; Keil vd. (2011) *nirK*, *nirS* geninin yüksek gübreleme ile artış gösterdiği tespit etmişlerdir. Patriquin vd. (1993)'nin yaptıkları bir çalışmada toprak örnekleri incelenmiş ve bazı kimyasal değerler arasındaki ilişkide nitrat konsantrasyonu ve EC değerleri arasında pozitif korelasyon ve yine nitrat ile pH arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Chen vd. (2021) yaptıkları çalışmada toprağa N ve S uygulanmış ve *nirK* ve *nirS* gen çeşitliliği, bolluğu ve topluluk yapısına bakmışlar. Sonuçlar, toplam N/S'nin daha yüksek tuza, toplam azota, toplam organik karbona, nitrat azotuna, amonyum azotuna ve daha düşük pH'a yol açtığını göstermektedir. Ayrıca *nirK* tipi denitrifikasyon topluluğunun N ve S ilavelerine karşı daha yüksek bir hassasiyet gösterdiğini de gözlemlenmiştir. Tarımsal ekosistemlerde 47 saha çalışmasından oluşan bir meta-analiz gerçekleştiren Yang vd. (2018) N döngüsü için önemli olan beş işaret genini (*nifH*, *amoA*, *nirK* ve *nirS*, *nosZ*) izlemişlerdir. N gübrelenmesinin *nifH* bolluğu üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını, ancak sırasıyla arkeal *amoA*, bakteriyel *amoA*, *nirK*, *nirS* ve *nosZ*'yi önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır. Toprak pH'ı, N gübreleme zamanı ve ürün rotasyonunun da çoğu N döngüsü genlerinin N gübrelenmesine tepkisini düzenleyen önemli faktörlerden olduğu bulunmuştur.

Uzun süreli gübre uygulamaları ile ilgili çalışmalara baktığımızda ise; Xuesong Luo vd. (2021) bir çalışmada, uzun süreli gübrelenmenin çeşitli boyutlardaki toprak agregatlarında yaşayan denitrifiye ediciler topluluğunu nasıl şekillendirdiğini göstermek için denitrifikasyondan sorumlu edici gen bolluklarına denitrifikasyon enzim aktiviteleri ile birlikte bakmışlardır. Brüt N₂O üretiminin baskın olarak nitrit indirgeyiciler ve toplam azot tarafından sağlandığını, net N₂O üretiminin ise fosfor, *nosZ* ve N₂O indirgeyicilerin toplamı tarafından sağlandığını görmüşlerdir. 160 yıllık bir tarla denemesinde farklı uzun vadeli gübreleme ve yetiştirme uygulamalarının etkisini değerlendirildiği bir çalışmada Clark vd. (2012) denitrifikasyon topluluklarının büyüklüğü ve çeşitliliği ile toprak örnekleriyle denitrifikasyon potansiyelini karşılaştırmışlardır. Denitrifikasyon potansiyelinin, ekilebilir alandan ormanlık alana doğru gelişmeye bırakılan bir alandan

elde edilen toprakta, çiftlik gübresiyle gübrelenmiş alana göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. *NirK* ile ters bir ilişki gösteren, tüm topraklarda test edilen genlerin *nirS* ile değil, *nirK* bolluğu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çoğu genetik varyasyonun, toprak işleme durumuna göre ayrı gruplara ayrıldığı *nirK* geninde görülmüştür. Sonuç olarak topraktaki azot ve organik karbon ile ilişkili artan denitrifikasyon potansiyelinden büyük olasılıkla *nirK* içeren bakterilerin sorumlu olduğu bulunmuştur. Yang vd. (2022)'nin yaptığı çalışmada asidik çay plantasyon toprağına uzun vadeli (12 yıllık) N ilavesi yapılmış ve denitrifikasyon potansiyeli ve denitrifiyer mikrobiyal toplulukların fonksiyonel genleri arasındaki değişime bakılmıştır. Çalışmada, toprağına N uygulamasının denitrifikasyon potansiyelini *narG*, *nirK*, *norB* ve *nosZ* gibi denitrifikasyon genlerinin mutlak bolluğunu önemli ölçüde arttırdığını bulunmuştur. Denitrifikasyon topluluklarının çeşitliliği, artan N oranları ile önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, denitrifikasyon topluluklarının bileşimi, farklı N gübreleme oranlarına sahip topraklar arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Zhang vd. (2021)'nin yaptığı çalışmada ise uzun süreli gübreleme koşulları altında kırmızı çeltik toprağındaki diazotrofların ve denitrifikasyonların çeşitliliğini anlamak için *nifH*, *nirK* ve *nosZ* kütüphaneleri PZR-RFLP ile oluşturulmuştur. *NirK* gen çeşitliliğinin *nosZ* ve *nifH*'den daha düşük olduğu ve *nirK* ve *nosZ* genlerinin farklı gübrelemelere karşı *nifH* geninden daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Toprakta proteobacteria grubunun, alpha, beta, gamma ve delta alt sınıfları da dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların hakim olduğu görülmüştür. Bu genleri etkileyen ana kimyasal faktörler belirlenmiş: pH, *nifH* topluluğunun en önemli faktörü olarak tespit edilmiş; *nirK* geni ise pH ve organik maddeden daha çok etkilenmiş; mevcut potasyum ve karbon-azot oranının ise *nosZ* geninin topluluk yapısını önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. Uzun süreli azotlu gübre uygulamasının toprak denitrifikasyon toplulukları üzerindeki etkilerini araştırmak üzere, *nirK* ve *nirS* çeşitliliğini inceleyen bir çalışmada Luo vd. (2010) azotlu gübrelemenin, *nirK* denitrifikasyon bakteri topluluk yapısı üzerinde bariz bir etkiye sahip olduğunu, ancak *nirS* içeren topluluğun etkilenmediğini bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme alanı ve süresi

Araştırmada kapsamında yapılan tarla denemesi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi çiftlik arazisinde bulunan ve daha öncesinde açık tarla olarak kullanılan, araştırma kapsamında plastik sera şekline dönüştürülen alandan alınmıştır. Bu alanda, deneme başlangıcı itibarıyla en az son 5 senedir herhangi bir tarımsal faaliyet yapılmamıştır. Deneme toprağına ait fiziksel, kimyasal ve biyolojik analiz sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Özellikle fiziksel ve kimyasal analiz sonuçlarına göre seçilen alanın bölgemizdeki çiftçi koşullarını yansıttığına karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme alanı toprağının bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri

Parametre	Sonuç
Bünye	Killi Tın
pH	7.32
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	296
Kireç (%)	14.1
Organik Madde (%)	2.43
Toplam N (%)	0.142
Alınabilir P (ppm)	94.7
Değişebilir K (ppm)	382
Değişebilir Ca (ppm)	4224
Değişebilir Mg (ppm)	267
Alınabilir Fe (ppm)	3.9
Alınabilir Mn (ppm)	18.8
Alınabilir Zn (ppm)	3.40
Alınabilir Cu (ppm)	1.81
Alkali fosfataz ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$ kuru toprak saat ⁻¹)	55.2
β -glikosidaz ($\mu\text{g PNG g}^{-1}$ kuru toprak saat ⁻¹)	11.8
Üreaz ($\mu\text{g NH}_4^+-\text{N g}^{-1}$ kuru toprak saat ⁻¹)	50
Dehidrogenaz ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$ kuru toprak)	4.62
Denitrifikasyon ($\mu\text{g NO}_2 \text{ g}^{-1}$ kuru toprak saat ⁻¹)	5.31
Nitrifikasyon ($\mu\text{g NO}_2 \text{ g}^{-1}$ kuru toprak saat ⁻¹)	0.69
Mezofilik bakteri sayısı (kob g^{-1} kuru toprak)	1×10^5

3.1.2. Araştırmada kullanılan gübreleme materyali

Denemede, bölgede ticari olarak üretimi yapılan vermikompost kullanılmıştır. Bu vermikompost windrow (yığın sıraları) metodu ile ve ham madde olarak yanmış çiftlik

gübre kullanılarak elde edilmiştir. Yine denemede kullanılan çiftlik gübresi Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesine ait süt üretim tesisinden alınmıştır. Denemeye başlamadan önce her iki gübrenin kimyasal ve biyolojik analizleri yapılmıştır (Çizelge 3.2). Ayrıca alınan her iki gübre örneği, alınan toprak örnekleriyle birlikte moleküler analizler için - 80 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan organik gübrelerin bazı kimyasal ve biyolojik özellikleri

Parametre	Vermikompost	Çiftlik gübresi
pH	6.67	7.67
EC (µs/cm)	2590	2990
Organik madde (%)	51.3	76.9
Organik karbon (%)	29.7	35.4
C/N	12.4	13.6
Toplam N (%)	2.4	2.6
Toplam P (ppm)	13100	6550
Toplam K (ppm)	9120	20833
Toplam Ca (ppm)	70714	50071
Toplam Mg (ppm)	17365	8982
Toplam Fe (ppm)	19000	350
Toplam Mn (ppm)	390	240
Toplam Zn (ppm)	260	260
Toplam Cu (ppm)	88	85
Alkali fosfataz (µg PNP g ⁻¹ kuru ağırlık saat ⁻¹)	246	244
β-glikosidaz (µg PNG g ⁻¹ kuru ağırlık saat ⁻¹)	26.2	29.5
Üreaz (µg NH ₄ ⁺ -N g ⁻¹ kuru ağırlık saat ⁻¹)	146	146
Dehidrogenaz (µg TPF g ⁻¹ kuru ağırlık)	4.15	16.7
Denitrifikasyon (µg NO ₂ g ⁻¹ kuru ağırlık saat ⁻¹)	14.3	6.41
Nitrifikasyon (µg NO ₂ g ⁻¹ kuru ağırlık saat ⁻¹)	14.4	5.10
Mezofilik bakteri (kob g ⁻¹ kuru ağırlık)	1×10 ⁵	12×10 ⁵

3.1.3. Araştırmada kullanılan bitki

Denemede kullanılan bitki kıvrıkcık marul (*Lactuca sativa* L.) bitkisinin Caipira çeşididir. Bölgede yoğun olarak yetiştirilmesi, hem güz hem bahar dönemi için uygun olması ve bakım işlemlerinin kolaylığı bu bitkiyi tercih etmede etkili olmuştur.

3.1.4. Deneme grupları ve deseni

Bu çalışmanın temel amacı verim veya doz belirleme çalışması olmadığından

dolayı tek gübreleme dozu kullanılmıştır. Ayrıca çalışma iki dönem şeklinde yapılmıştır. Bunun sebebi gübre uygulamalarının mikrobiyal topluluk yapısı ve çeşitliliği üzerine orta vadeli ve olası kümülatif etkilerini belirlemektir.

Deneme 4 uygulama konusu içermiştir. Bunlar: Kontrol, vermikompost, çiftlik gübresi ve kimyasal gübre konularıdır. Kontrol uygulamasında bitki yetiştirilmiş ama herhangi bir gübreleme yapılmamıştır. Vermikompost ve çiftlik gübresi içeren parsellere tek doz şeklinde ve fide dikiminden yaklaşık 1 hafta önce kuru ağırlık üzerinden 1 ton da⁻¹ düzeyinde uygulama yapılmış ve başka herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Bu gübreler parsellere homojen bir şekilde yayılıp karıştırıldıktan sonra hafif bir sulama işleminin ardından dikime kadar yaklaşık 1 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kimyasal gübre içeren parsellere ise yine bu aşamada 40 kg da⁻¹ 15-15-15 gübresi taban gübresi olarak verilmiştir. Yetiştiricilik sırasında da 1. dönem için toplamda 4 kg da⁻¹ 18-18-18, 2.5 kg da⁻¹ 16-8-24, 3 kg da⁻¹ kalsiyum nitrat ve 330 g da⁻¹ kombine mikro element gübresi (%0.5 B, %1 Cu, %5 Fe, %5 Mn ve %7 Zn) belirli aralıklarla damla sulama ile uygulanmıştır. 2. dönemde ise taban gübresi olarak 40 kg da⁻¹ 15-15-15, yetiştiricilik sırasında da 4 kg da⁻¹ 18-18-18, 4.5 kg da⁻¹ 16-8-24, 2 kg da⁻¹ kalsiyum nitrat ve 330 g da⁻¹ kombine mikro element gübresi uygulanmıştır.

Deneme kuzey-güney doğrultusunda tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuş olup 4 tekerrürlü olarak toplamda 16 parselden oluşmuştur. Deneme konularının bloklardaki yeri kura yöntemiyle belirlenmiştir. Her bir parsel 12 m² büyüklüğünde oluşturulmuştur. Fideler parsellere 40cm × 20cm (sıra arası x sıra üzeri) şeklinde dikilmiştir. Dikim öncesi ve sonrasında gerekli olan tüm kültürel işlemler (sulama, çapalama, yabancı ot mücadelesi vb) yapılmıştır. Sulama damla sulama sistemi ile yapılmıştır. Damla sulama sistemi kurulurken kimyasal gübre uygulanacak parsellere yetiştiricilik sırasında belirli aralıklarla sulama suyu ile gübre uygulanacağı için diğer parsellerden ayrı bir sulama hattı çekilmiştir. Deneme boyunca herhangi bir bitki koruma ilacı kullanılmamıştır.

Deneme, Güz-2018 (1. dönem) ve Bahar-2019 (2. dönem) olmak üzere art arda iki dönem yapılmıştır. Her iki dönemde de tüm uygulamalar aynı düzende ve aynı parsellerde yapılmıştır. Her bir dönemde yetiştiricilik süresi 8 hafta olmuştur.

3.1.5. Analizler için örnekleme şekli

Denemeye başlamadan evvel denemenin yapılacağı alandan toprak örneği alınarak rutin fiziksel ve kimyasal toprak analizlerinin yanı sıra biyolojik analizler de yapılmıştır. Normal ve rizosfer toprak örnekleri 8. haftada (hasat) enzim analizleri ve moleküler analizler için alınmıştır. Rizosfer toprağı örnekleri bitkilerin topraktan kökleri ile sökülmesi suretiyle alınmıştır. Topraktan sökülen bitkiler hafifçe silkelenip gevşek tutunan topraklardan arındırıldıktan sonra örnek poşetlerine konulup laboratuvara getirilmiş ve burada köklerden olabildiğince ayrıldıktan sonra yapılacak analizlere göre farklı şekillerde saklanmıştır. Sökülen bitkiler parsellerden rastgele seçilmiş olup her parselden eşit sayıda bitki alınmıştır.

Enzim aktivite analizleri, bakteriyel sayım analizleri ile değişebilir amonyum, nitrat ve nitrit analizleri için kullanılacak toprak örnekleri örnekleme sonrasında analize kadar buzdolabında +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Moleküler analizler için ise standart

bir uygulama olan kompozit örnek oluşturma yoluna gidilmiştir. Her bir uygulamaya ait tekrarlardan elde edilen toprak örneklerinden eşit miktarlarda alınarak iyice karıştırılmış ve böylece her bir uygulama için tek bir kompozit rizosfer toprak örneği ve tek bir kompozit normal toprak örneği elde edilmiştir. (Szukics vd. 2009; Chen vd. 2015). Elde edilen kompozit örnekler analize kadar -80 °C de saklanmıştır. Denemenin sonunda toprakta besin maddesi kapsamalarını belirlemek üzere ayrılan topraklar ise hava kurusu hale getirildikten sonra elekten geçirilerek analize kadar saklanmıştır.

Deneme başlangıcından itibaren 8. haftada (hasat sırasında) alınan örneklerde pH ölçümleri, dehidrogenaz, üreaz, β -glikosidaz ve fosfotaz enzim aktivite analizleri, nitrifikasyon ve denitrifikasyon enzim aktivite analizleri, heterotrofik mezofilik bakteri sayımları, nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakteri sayımları ile toprakta değişebilir amonyum, nitrat ve nitrit analizleri yapılmıştır. Ayrıca hesaplamalarda kullanılmak üzere her bir örnekten bir miktar nem tayini için ayrılmıştır. AOB (Amonyum okside elden bakteriler) ve denitrifikasyon bakterilerine yönelik moleküler analizler ise 8. haftada (hasat sırasında) alınan toprak örneklerinde yapılmıştır. Toprak örnekleri aşağıda verilen Çizelge 3.3' de ki gibi isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.3. Toprak lejantları ve deneme grupları

İsimlendirme	Yetiştiricilik dönemi	Uygulama	Örnek tipi
C1	1. Dönem	Kontrol	Normal
C2	1. Dönem	Vermikompost	Normal
C3	1. Dönem	Çiftlik gübresi	Normal
C4	1. Dönem	Kimyasal gübre	Normal
C5	1. Dönem	Kontrol	Rizosfer
C6	1. Dönem	Vermikompost	Rizosfer
C7	1. Dönem	Çiftlik gübresi	Rizosfer
C8	1. Dönem	Kimyasal gübre	Rizosfer
C9	2. Dönem	Kontrol	Normal
C10	2. Dönem	Vermikompost	Normal
C11	2. Dönem	Çiftlik gübresi	Normal
C12	2. Dönem	Kimyasal gübre	Normal
C13	2. Dönem	Kontrol	Rizosfer
C14	2. Dönem	Vermikompost	Rizosfer
C15	2. Dönem	Çiftlik gübresi	Rizosfer
C16	2. Dönem	Kimyasal gübre	Rizosfer
C17		Çiftlik gübresi	
C18		Vermikompost	

3.2. Metot

3.2.1. Moleküler analizler

3.2.1.1. Toprakta DNA izolasyonu

Toprakta DNA izolasyonu “DNeasy PowerSoil Kit (Germany 12888-100)” DNA izolasyon kiti kullanılarak kit ile sağlanan prosedür takip edilerek 0.025 gr. normal ve rizosfer kompozit toprak örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA TE tampon çözeltisi (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde -20 °C’de bir sonraki aşamaya kadar saklanmıştır.

3.2.1.2. PZR analizi

Toprakta AOB grubunu incelemek üzere *amoA* genini hedefleyen *amoA1F* (5’-GGGGTTTCTACTGGT-3’) ve *amoA2R* (5’-CCCCTCKSAAAGCCTTCTTC-3’) primer seti kullanılmıştır (Rotthauwe vd. 1997). Her bir PZR reaksiyonu içerisinde 10 µl PZR süper mix (Invitrogen, Platinum II Hot-Start PZR Master Mix, Vilnius, Lithuania), (22 U/ml Taq DNA Polimeraz, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dNTP) her primerden 0,5 µl ve 1 µl toprak DNA’sı konulmuş ve reaksiyon toplam 20 µl’den oluşmuştur. PZR işlemi ilk döngüye başlamadan önce 94 °C ‘de 5 dakika bekletilmiş ve sırasıyla 94 °C’de 45 saniye denaturasyon, 55 °C’de 30 saniye bağlanma ve 72 °C’de 1 dakika uzatma (elongasyon) 35 döngü ile devam edip final uzatma (elongasyon) aşaması için 72 °C’de 10 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir (Chen vd. 2015). Elde edilen PZR ürünleri %0.7’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Denitrifikasyon bakterileri için kullanılan primer seti ise *nirK* geni için *nirKC1F* (5’-ATGGCGCCATCATGGTNYTNCC-3’) ve *nirKC1R* (5’-TCGAAGGCCTCGATNARRTTTGTG-3’) primer setidir. PZR içeriği AOB grubunun ki ile aynı şekilde oluşturulmuş. PZR işlemi ise ilk başta 95 °C’ de ve 5 dakikalık bir denaturasyon aşamasından sonra “touchdown” PZR tekniği ile yapılmıştır. İşlemler sırasıyla 30 döngü boyunca 95 °C’de 30 saniye denaturasyon, 40 saniye bağlanma ve 72 °C’de 40 saniye uzatma adımlarının ardından final uzatma için 7 dakika boyunca 72 °C’de bekletilerek yapılmıştır. İşlemin ilk 10 döngüsü bağlanma sıcaklığı 45 °C’den başlayarak her döngüde 0.5 °C düşürülerek ve 40 °C’ye ulaşıldıktan sonra geriye kalan 20 döngüde bağlanma sıcaklığı 43 °C’ye ayarlanarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir (Wei vd. 2015). Elde edilen PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.2)

Jelde yürütülen PZR ürünleri görüntülenmeden, düşük UV (ultra viyole) ışığı altında jelden bantlar kesilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır. Elde edilen bantlar Monarch DNA Gel Extraction Kit (BioLabs, New England) kullanılıp jelden DNA saflaştırılmış ve tekrardan % 0.7’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

3.2.1.3. Klonlama ve *E. coli*’ye aktarma

Elde edilen PZR ürünlerinin klonlanması amacıyla TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, California, USA) kullanılmış ve bu kite ait prosedür izlenerek klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından, PZR ürününü taşıyan klonlar competent *Escherichia coli* hücrelerine transfer edilmiştir.

Klonlama kiti ile birlikte gelen competent hücrelerin bu özelliklerini kaybettikleri gözlemlendiğinden dolayı transformasyon işlemi için gerekli competent hücreler laboratuvarında hazırlanmıştır. Bunun için *Escherichia coli* DH5 α suşu Chan vd. (2013) tarafından tarif edildiği şekilde CaCl₂ metodu kullanılarak competent hale getirilmiştir. Klonlama ve transformasyon işlemi sonunda kanamicin antibiyotigi içeren katı LB (Luria-Bertani) besi ortamında gelişen koloniler pozitif olarak değerlendirilerek RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analizine tabi tutulmuşlardır

3.2.1.4. RFLP analizi ve klonların seçilmesi

Hangi klonların dizi analizine tabi tutulacağını belirlemek için RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile klonlar FastDigest HhaI (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. RFLP analizinde hangi restriksiyon enziminin kullanılacağını belirlemek üzere NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında önceden tanımlanmış *amoA* ve *nirK* gen dizilerinden temsilen seçilenler bilgisayar ortamında CLONEMAP programı (version 2.11, CGC Scientific Inc, Ballwin, MO, USA) kullanılarak çok bilinen restriksiyon enzimleri ile karşılaştırılmıştır (Castro vd. 2004). RFLP yönteminin temeli klonların farklı dizilere sahip olması nedeni ile enzimlerin DNA'yı farklı noktalardan kesmesi ve dolayısıyla farklı büyüklükteki parçalara ayırması ve bu farklılıkların agaroz jelde tespit edilmesine dayanır. Her bir toprak örneği ve bakteri grubu için en az 15 klon bu şekilde taranmış ve yöntemin sonucunda her bir RFLP grubunu temsil edecek sayıda klon dizi analizi için seçilmiştir. RFLP gruplarından klon kütüphanesini temsil edecek sayıda klon seçildiğini teyit etmek için ARAREFACTWIN programı (version 1.3, S Holland, Stratigraphy Lab. University of Georgia, Athens (<http://www.uga.edu/~strata/software>)) kullanılarak rarefaksiyon analizi yapılmıştır.

3.2.1.5. Dizileme

Seçilen klonlar ilgili primerler ile tekrar PZR işlemine tabi tutulmuştur. Nitrifikasyon bakterileri için touchdown PZR, AOB bakterileri için normal prosedür tekrarlanarak 50 μ l'lik PZR ürünü hazırlanmış ve bu ürünlerde üzerinde dizileme analizi hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır.

3.2.1.6. Filogenetik analizler

Dizileme sonucu elde edilen diziler tek tek NCBI veri tabanı kapsamında bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritması kullanılarak önceden tanımlanmış dizilerle karşılaştırarak ve en yakın benzerlik gösteren belirlenmiştir (Altschul vd. 1990). Ardından elde edilen diziler ile veri tabanlarından elde edilen tanımlanmış diziler bilgisayar ortamında MEGA (7. sürüm) programı içerisindeki CLUSTALW programı kullanılarak yakınlık derecelerine göre hizalanmıştır (Kumar vd. 1997). Filogenetik ağaç, MEGA programında neighbor-joining metodu ve Jukes-Cantor modeli kullanılarak oluşturulmuştur. Ağaç topolojisinin güvenilirliğini tahmin etmek amacıyla 1000 tekrerrür üzerinden bootstrap analizi de yapılmıştır.

3.2.2 Biyokimyasal analizler

3.2.2.1. Toprakta AOB sayısı

MPN (Most Probable Number-En Muhtemel Sayı) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan besin çözeltisi sadece mineral madde (makro ve mikro), indikatör olarak bromothymol blue ve amonyum kaynağı olarak da amonyum sülfat içermiştir. Besin çözeltisinin hazırlanması aşamasında kullanılan kimyasallar ve miktarları 1 L için şu şekildedir: 10 ml %5 (NH₄)₂SO₄, 1 ml %1.34 CaCl₂.2H₂O, 1 ml %4 MgSO₄.7H₂O, 5 ml %0.04 bromothymol blue, 7.5 ml %2.72 KH₂PO₄, 1 ml şelatlı demir (%0.246 FeSO₄.7H₂O ve %0.331 EDTA disodium), 1 ml iz element çözeltisi (10 ppm Na₂MoO₄.2H₂O, 200 ppm MnCl₂, 2 ppm CaCl₂.6H₂O, 100 ppm ZnSO₄.7H₂O ve 20 ppm CuSO₄.5H₂O). Bu yöntem, inkübasyon sonunda oluşacak renk değişiminin ve nitrit oluşumunun AOB tarafından yönetildiği varsayımına dayanmaktadır. On gram nemli toprak 95 ml steril tampon çözeltiye eklenerek iyice karıştırılmış ve 10⁻⁸'e kadar seri seyreltme yapılmıştır. Her bir seyreltme 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Seyreltmeler tamamlandıktan sonra tüpler 25-30 °C derecede ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. En az 8 hafta beklendikten sonra sarı renk veren tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir ve MPN tablosu yardımıyla AOB sayısı belirlenmiştir (Schmidt ve Belser 1994).

3.2.2.2. Toprakta denitrifikasyon bakterisi sayısı

Toprakta AOB sayımında belirtildiği şekilde MPN yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan besin çözeltisi 5 g pepton, 3 g beef extract ve 0.5 g KNO₃ içermiştir. Seyreltme yapıp inkübasyona hazır hale geldikten sonra seyreltme tüplerinin içerisine Durham tüpleri ağızları aşağı gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Seyreltme tüpleri ağızları sıkı bir şekilde kapalı olarak en az 30 gün 25-30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu analiz, tüplerdeki mikrobiyal aktivite sonunda çıkan gazın denitrifikasyon bakterileri tarafından üretilmiş azot gazı olduğunun var sayılması ve ters çevrilmiş Durham tüpünde birikerek izlenmesi prensibine dayanır. Analiz sonunda denitrifikasyon bakterisi sayısı MPN tablosu yardımıyla tahmin edilmiştir (Tiedje 1994).

3.2.2.3. Toprakta toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı

Toplam bakteri sayımında, kültürel bir sayım yöntemi olan seyreltme- plak sayım yöntemi kullanılmıştır. Seyreltme işlemi MPN metodunda oldu gibidir. Ancak seyreltme tüpleri besin çözeltisi değil tampon çözelti içermiştir. Seyreltme işleminden sonra her bir seyreltme tüpünden yaklaşık 100 µL alınarak nutrient agar bulunan petri kaplarına aktarılıp yayılmıştır. Bu petri kapları 28 °C'de 3 gün inkübe edilmiş ve 30-300 koloni bulunan petrilerde koloni sayımları yapılarak bakteri sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Parkinson vd. 1971).

Bakteri sayısı (kob g⁻¹ kuru toprak) = koloni sayısı × seyreltme oranı × petriye aktarılan miktar

3.2.2.4. Toprakta nitrifikasyon aktivitesi

5 gram nemli toprak örneği erlene konularak üzerine 0.1 ml sodyum klorat çözeltisi (1.5 M NaClO₃) ve 20 ml amonyum sülfat çözeltisi (1 mM) eklenmiştir. Ardından erlenin ağzı kapatılıp 25 °C de 5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 ml KCl çözeltisi (149.12 g/L) eklenerek iyice karıştırılmış ve süzölmüştür. Süzükten 5 ml alınmış ve üzerine 3 ml tampon çözelti (0.19 M NH₄Cl, pH 8.5) ve 2 ml nitrit belirleme çözeltisi (2 g sülfanilamid ve 0.1 g naftil dietilen diamonyum klorür/200 ml) eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek ve renk yoğunluğu 520 dalga boyunda ölçölmüştür. Aynı işlemler topraklı olarak kör için de yapılmış ancak inkübasyon yerine bu süre boyunca -20 °C’de bekletilmiştir. Örneklerde ölçölen değerler kör değerlerine göre düzeltildikten sonra ve standart çözelti değerleri de göz önüne alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Berg ve Rosswall 1985; Schinner vd. 1995).

$$\text{NO}_2\text{-N } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ kuru ağırlık})/t = \frac{\text{Nitrat-N } (\mu\text{g ml}^{-1}) \text{ süzük} \times V}{5 \times tka}$$

Bu formülde tka, 1 g nemli toprağın kuru ağırlığı; t, saat olarak inkübasyon süresi; V, analizde toprak örneğine eklenen çözeltilerin toplam hacmidir (25.1 ml).

3.2.2.5. Toprakta nitrat redüktaz (denitrifikasyon) enzim aktivitesi

5 gr. nemli toprak test tüpüne konularak üstüne 4 ml DNP çözeltisi (0.9 mM 2,4-Dinitrofenol), 1 ml nitrat çözeltisi (25 mM KNO₃) ve 5 ml saf su ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak 25 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 10 ml KCl çözeltisi (2 M) eklenip iyice karıştırıldıktan hemen sonra süzölmüştür. Süzükten 5 ml alınarak cam tüpe aktırılmış ve üzerine 3 ml tampon çözelti (0.19 M NH₄Cl, pH 8.5) ve 2 ml nitrit belirleme çözeltisi (2 g sülfanilamid ve 0.1 g naftil dietilen diamonyum klorür/200 ml) konulmuştur. İyice çalkalayıp 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra oluşan renk yoğunluğu 520 dalga boyunda ölçölmüştür. Aynı işlemler topraklı olarak kör içinde yapılmış ancak inkübasyon yerine bu süre boyunca -20 °C’de bekletilmiştir. Standart çözelti okumaları da dikkate alınarak hesaplamalar yukarıdaki formüle göre yapılmıştır (Abdelmagid ve Tabatabai 1987; Schinner vd. 1991).

3.2.2.6. Toprak üreaz aktivitesi

On gram toprak örneği üzerine 0.2 ml tolüen ilave edildikten sonra üzerine 7.5 ml sitrat tampon çözeltisi (368 g sitrik asit ve 295 g potasyum hidroksit / 1 L, pH 6.7) ve 10 ml üre çözeltisi (%10) ilave edilerek çalkalanmıştır. Daha sonra bu karışım 3 saat süreyle 37 °C’de inkübe edilerek son hacim 37 °C’de distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır. Sonrasında bu süspansiyon Whatman no 42 filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüş ve elde edilen süzükten 1 ml alınarak üzerine sırasıyla 10 ml saf su, 4 ml sodyum fenolat (62.5 g fenol / 100 ml) ve 3 ml sodyum hipoklorit (%0.9) ilave edilmiştir. Açığa çıkan amonyum 578 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede okunarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Hoffman ve Teicher 1961).

$$\text{Üreaz aktivitesi } (\mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1} \text{ kuru toprak saat}^{-1}) = \frac{C (\text{NH}_4^+\text{-N}) \times V \times S}{\text{dwt} \times \text{SW} \times T}$$

Formuldeki kısaltmaların anlamları şu şekildedir: C, hesaplanan $\text{NH}_4^+\text{-N}$ konsantrasyonu; dwt, 1 g nemli toprağın kuru ağırlığı, V, toprak çözeltisinin son hacmi; SW, tartılan toprak ağırlığı (g); T, inkübasyon süresi (saat); S, seyreltme faktörü.

3.2.2.7. Toprakta alkali fosfotaz aktivitesi

Fosfataz aktivitesinin belirlenmesi için 1 g toprak örneğine 0.2 ml toluen, 4 ml MUB (12.1 g Tris, 11.6 g maleik asit, 14.0 g sitrik asit ve 6.3 g borik asit / 1 L, pH 11) ve substrat olarak aynı tamponla hazırlanmış 1 ml p-nitrofenil fosfat (0.835 g PNP Fosfat/50 ml MUB) eklenmiştir. Bu karışım 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiş, 1 ml 0.5M CaCl_2 ve 4 ml 0.5 M NaOH eklenerek aktivite durdurulmuş ve süzölmüştür. Oluşan sarı renk yoğunluğu 410 nm’ye ayarlı spektrofotometrede ölçülmüştür. Süzüğün p-nitrofenol (PNP) içeriği saf p-nitrofenol (1 g p-nitrofenol / 1 L) ile hazırlanan kalibrasyon serisiyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Fosfotaz enzim aktivitesi yukarıda üreaz için verilen formül yardımıyla ama “ $\mu\text{g PNP g}^{-1}$ kuru toprak saat⁻¹” olarak hesaplanmıştır (Tabatabai ve Bremner 1969).

3.2.2.8. Toprakta β -glükosidaz aktivitesi

β -glükosidaz aktivitesini belirlemek üzere 1 g toprak üzerine 0.2 ml toluen, 4 ml MUB (12.1 g Tris, 11.6 g maleik asit, 14.0 g sitrik asit ve 6.3 g borik asit / 1 L, pH 6) ve 1 ml PNG (p-nitrofenil- β -D-glukozit: 0.654 g β -D Glukozit / 50 ml MUB) çözeltisi eklenmiştir. 37 °C’de 1 saat inkübe edildikten sonra örnekler üzerine 1 ml 0.5 M CaCl_2 ve 4 ml 0.1 M THAM tampon çözeltisi eklenmiştir. Katlı filtreden süzülen toprak süspansiyonundaki sarı renk yoğunluğu 410 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Filtratın p-nitrofenol (PNP) içeriği saf p-nitrofenolle (1 g p-nitrofenol / 1 L) hazırlanan kalibrasyon serisiyle karşılaştırılarak tespit belirlenmiştir. β -glükosidaz aktivitesi yukarıda verilen formül yardımıyla hesaplanarak “ $\mu\text{g PNP g}^{-1}$ kuru toprak saat⁻¹” olarak ifade edilmiştir (Eivazi ve Tabatabai 1988).

3.2.2.9. Toprakta dehidrogenaz aktivitesi

Dehidrogenaz aktivitesini belirlemek üzere kapaklı erlenlere 5 g nemli toprak tartılarak ve üzerine 5 ml TTC (0.8 g 2,3,5–Trifeniltetrazolyum klorid / 100 ml) çözeltisi eklenmiştir. Erlenlerin ağzı kapatılarak 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından karışıma 40 ml aseton eklenip 2 saat karanlıkta bekletilmiştir. Elde edilen süspansiyonun mavi bantlı filtreden süzülmesinin ardından elde edilen kırmızı renk yoğunluğu spektrometrede 546 nm’de ölçülmüştür. Süzüğün TPF içeriği TPF standart çözeltisinden (50 mg Trifenil formazan / 100 ml aseton) hazırlanan kalibrasyon serisiyle karşılaştırılarak tespit belirlenmiştir. Dehidrogenaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanarak “ $\mu\text{g TPF g}^{-1}$ kuru toprak” olarak ifade edilmiştir (Thalman 1968).

$$\text{Dehidrogenaz aktivitesi } (\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ kuru toprak}) = \frac{C(\text{TPF}) \times V}{\text{dwt} \times \text{SW}}$$

Burada C (TPF), Hesaplanan TPF konsantrasyonu; V, toprak çözeltisinin son hacmi; dwt: 1 g nemli toprağın kuru ağırlığı; SW, tartılan nemli toprak ağırlığı.

3.2.2.10. Toprakta değişebilir amonyum, nitrat ve nitrit analizleri

Toprak örneklerinde değişebilir amonyum, nitrat ve nitrit analizleri toprak ekstraktında yapılmıştır. Bu amaçla, standart bir ekstraksiyon metodu olarak, 10 gram kuru toprağa eşdeğer miktarda yaş toprak üzerine 100 ml 2 M KCl çözeltisi ilave edilerek çalkalayıcıda 1 saat boyunca 120 devir/dk hızda çalkalamaya bırakılmış ve elde edilen süzük analizlerde kullanılmıştır (Forster 1995).

Toprak ekstraktındaki amonyum kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Bu analizde, 0.1 ml süzük üzerine 5 ml renklendirme çözeltisi (34 g sodyum salisilat+25 g sodyum sitrat+25 g sodyum tartarat+0.12 g sodyum prusid L⁻¹) eklenip karıştırılarak 15 dk beklendikten sonra 5 ml alkali hipoklorid çözeltisi ilave edilmiştir. Renk oluşumu için 1 saat beklendikten sonra spektrofotometrede 660 nm de okuma yapılmıştır. Amonyum standartları ve kör de aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon sırasında kullanılan toprak miktarı ve seyreltme faktörü dikkate alınarak toprak örneğinin değişebilir amonyum kapsamı hesaplanmıştır (Forster 1995).

Nitrat belirlemesi için 0.5 ml süzük üzerine 1 ml %5'lik salisilik asit çözeltisi (konsantre sülfirik asit ile hazırlanmış) eklenip iyice karıştırıldıktan sonra 30 dk beklenmiş ve sonrasında 10 ml 4 M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Bir saat içerisinde oluşan renk yoğunluğu spektrometrede 410 nm'de okunmuştur. Standart kurve ve kör değerleri, kullanılan toprak miktarı ve seyreltme faktörüne göre hesaplama yapılarak toprağın nitrat kapsamı belirlenmiştir (Anderson ve Ingram 1989).

Toprakta nitrit tayini için 2 ml ekstrata 45 ml saf su ve 1 ml sülfanilamid çözeltisi (100 ml 2.4 M HCl içerisinde çözünmüş 0.5 gr sülfanilamid) ilave edilmiş, iyice karıştırılıp 5 dk beklendikten sonra 1 ml [N-(1-naftil)-etilindiamin] hidroklorid çözeltisi (0.12 M HCl içerisinde %3'lük) eklenerek ve 20 dk beklenmiştir. Son hacim 50 ml'ye tamamlandıktan sonra spektrometrede 540 nm de okuma yapılmıştır. Kör ve standart çözelti de aynı işlemlere tabi tutulmuş ve hesaplamalar sonunda toprakların nitrit kapsamı belirlenmiştir (Keeney ve Nelson 1982).

3.2.2.11. Toprakta makro ve mikro besin elementi analizleri

Deneme sonunda deneme alanından alınan toprak örneklerinde makro ve mikro besin analizleri yapılmıştır. Toplam azot modifiye Kjeldahl yöntemine göre (Kacar 2012), alınabilir fosfor analizi ise Olsen metoduna göre (Olsen ve Sommers 1982) değişebilir K, Ca, Mg 1N Amonyum asetat (pH 7) metoduna göre (Kacar 2012), alınabilir Fe, Zn, Cu ve Mn ise DTPA ekstraksiyon metodu (Lindsay and Norvell 1978) ile belirlenmiştir.

3.2.3. İstatistiksel analizler

Çalışmadan elde edilen veriler üzerinde Pearson korelasyon testleri ve RFLP gruplarından klon kütüphanesini temsil edecek sayıda klon seçildiğini teyit etmek için ARAREFACTWIN programı (version 1.3, S Holland, Stratigraphy Lab. University of

Georgia, Athens (<http://www.uga.edu/~strata/software>)) kullanılarak rarefaksiyon analizi yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Toprak Örneklerinin Lejantları

Moleküler analizler sonucunda elde edilen klonların isimlendirmeleri Çizelge 4.1. ' de verilen sisteme göre yapılmıştır. Her bir toprak örneğinden elde edilen klon kütüphanelerine ait rarefaksiyon analiz sonuçları Ek.1 ve Ek.2'de verilmiştir.

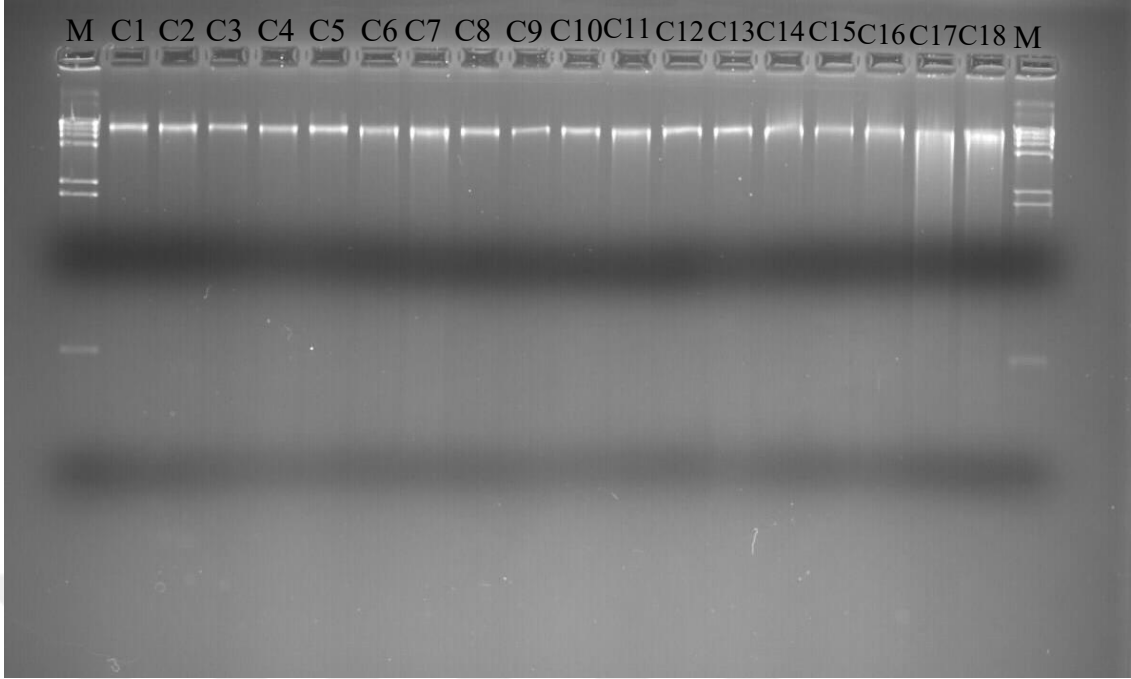
Çizelge 4.1. Moleküler analizler kapsamında klonlar için kullanılan isimlendirme sistemi

İsimlendirme	Yetiştiricilik dönemi	Uygulama	Örnek tipi
(A)* veya (N)** C1	1. Dönem	Kontrol	Normal
(A) veya (N) C2	1. Dönem	Vermikompost	Normal
(A) veya (N) C3	1. Dönem	Çiftlik gübresi	Normal
(A) veya (N) C4	1. Dönem	Kimyasal gübre	Normal
(A) veya (N) C5	1. Dönem	Kontrol	Rizosfer
(A) veya (N) C6	1. Dönem	Vermikompost	Rizosfer
(A) veya (N) C7	1. Dönem	Çiftlik gübresi	Rizosfer
(A) veya (N) C8	1. Dönem	Kimyasal gübre	Rizosfer
(A) veya (N) C9	2. Dönem	Kontrol	Normal
(A) veya (N) C10	2. Dönem	Vermikompost	Normal
(A) veya (N) C11	2. Dönem	Çiftlik gübresi	Normal
(A) veya (N) C12	2. Dönem	Kimyasal gübre	Normal
(A) veya (N) C13	2. Dönem	Kontrol	Rizosfer
(A) veya (N) C14	2. Dönem	Vermikompost	Rizosfer
(A) veya (N) C15	2. Dönem	Çiftlik gübresi	Rizosfer
(A) veya (N) C16	2.Dönem	Kimyasal gübre	Rizosfer
(A) veya (N) C17		Çiftlik gübresi	
(A) veya (N) C18		Vermikompost	

*“A” ön eki *amoA* geni (Amonyum okside eden bakteriler) taşıyan klonlar için kullanılmıştır.

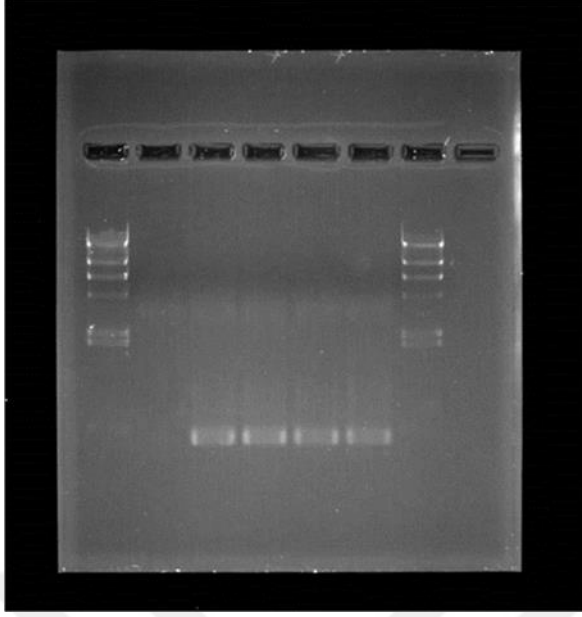
**“N” ön eki *nirK* geni (denitrifikasyon bakterileri) taşıyan klonlar için kullanılmıştır.

Birinci ve ikinci dönem alınan normal toprak ve rizosfer topraklarından elde edilen gen klon dizileri toprak ve dönem bazında ayrı ayrı filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Bu analizler NCBI veri tabanında bu dizilere en yakın tanımlanmış diziler ve bazı tanımlanmamış diziler ve ayrıca vermikompost ve çiftlik gübrelerinden elde edilen klon dizileri de içermiştir. Dolayısıyla, her bir dönem ve toprak (normal toprak ve rizosfer toprağı) için oluşturulan filogenetik ağaçlara bu tanımlanmış diziler ve organik gübre klon dizileri standart olarak dahil edilmiştir.



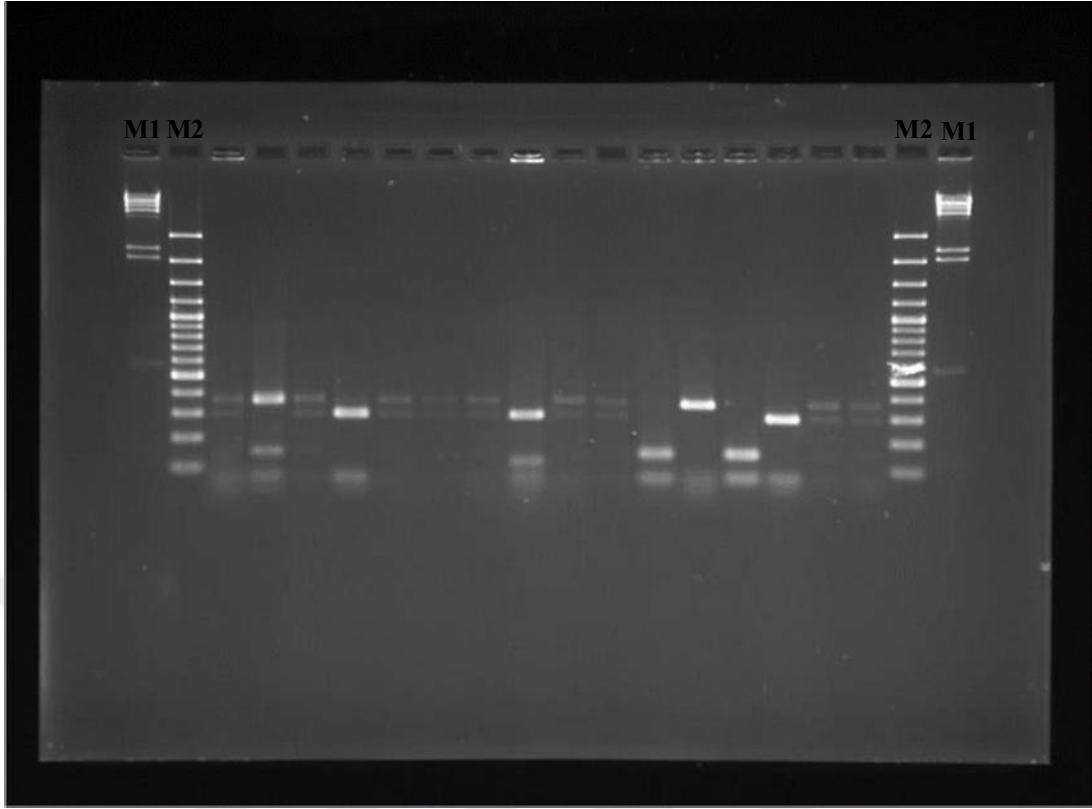
Şekil 4.1. Toprak örneklerine ait DNA agaroz jel görüntüsü (M: Marker, C1-C16: Toprak ve rizosfer örnekleri, C17: Çiftlik gübresi C18: Vermikompost) (%0.7 agarose jel, 1xTAE)

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere tüm toprak örneklerinden elde edilen toprak DNA’ları agaroz jelde 45 dk. 65 V’ta yürülmüştür. Marker DNA başa ve sona konulmuş ve Lambda/HindIII marker DNA’sı kullanılmıştır. C17 çiftlik gübresi ve C18 vermikompost gübresinden elde edilen DNA’lar görüldüğü üzere arkasında sürüntülü (smear) bir görüntü oluşturmuşlardır. Bunun temel nedeni DNA bolluğundan kaynaklı fazla ürünün bulunmasıdır.



Şekil 4.2. Toprak DNAsı kullanılarak elde edilen PZR ürününü (*amoA*) gösteren bir jel görüntüsü (*amo* primer seti, %0.7 agorose jel, 1xTAE)

Şekil 4.2’de ise *amoA* geninden elde edilen PZR ürünlerini görülmektedir. Kenarlara konulan markerlarla yakın seviyelerde 564 baz büyüklüğünde parçalar net bir şekilde bant vermişlerdir.



Şekil 4.3. Klonlarda RFLP analizine ait bir örnek (%1.5 agorose jel, 1xTAE)

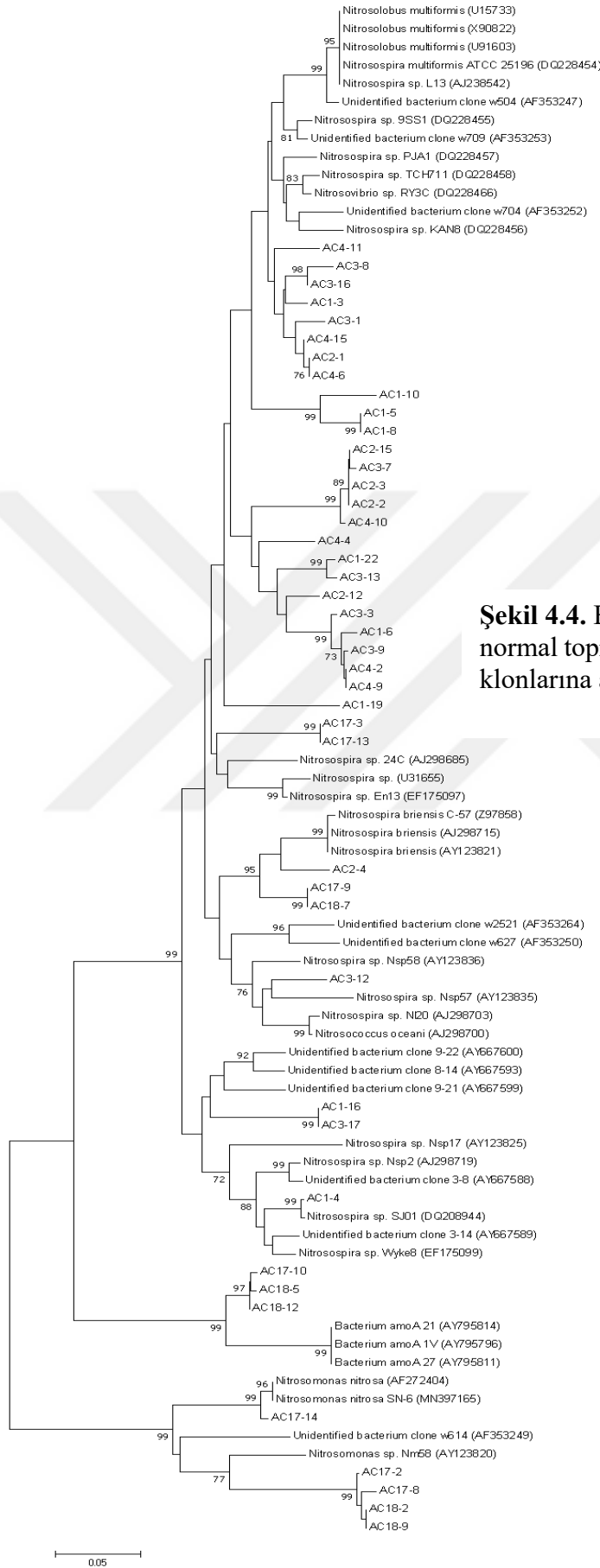
Şekil 4.3’de görüldüğü üzere baştan iki ve sondan iki kuyucuğa konulmak üzere markerlar bant vermiştir. M1 olarak isimlendirilen marker Lambda DNA/HindIII, M2 olarak isimlendirilen marker ise DNA Ladder hazır marker kiti kullanılmıştır. Klonlar enzimler aracılığı ile belirli yerlerinden kesilerek farklı boyutlarda bantlar elde edilmiştir. Böylece farklı paternler oluşmuş ve RFLP analizi ile dizilemeye gönderilecek klonlar seçilmiştir.

4.2. Amonyum Okside Edici (AOB) Topluluk Yapısı

Ek-1’de RFLP analizi ile belirlenen patern sayılarına göre rarefaksiyon analizleri verilmiştir. AC-1 klonu için RFLP grup sayısı eğrisi plato yapmış ve seçilen klon miktarının yeterli olduğu görülmüştür. AC2, AC3, AC4, AC5 klonları için eğrinin sabitlendiği görülmüştür ve yeterince klon elde edildiği tespit edilmiştir. Fakat AC-6 klonununa ait eğri sabitlenmemiştir ve yeterli sayıda RFLP grubu elde edilemediği sonucu ortaya çıkmıştır. AC7 klonları için eğri sabitlenmiş ve yeterli sayıda RFLP grubu elde edildiği görülmüştür. AC8 klonları için eğri bsabitlenmemiş ve yeterli sayıda grup elde edilemediği gözlemlenmiştir. AC9 klonu için elde edilen klon grubu sayısının yeterli fakat AC10 klonu için elde edilen klon grubu sayısının yeterli olmadığı tespit edilmiştir. AC11, AC12, AC13, AC14, AC15, AC16, AC17, AC18 gruplarının rarefaksiyon analiz sonuçlarına baktığımızda ise eğri plato yapmıştır ve yeterli sayıda RFLP klon grubu elde edildiği görülmüştür.

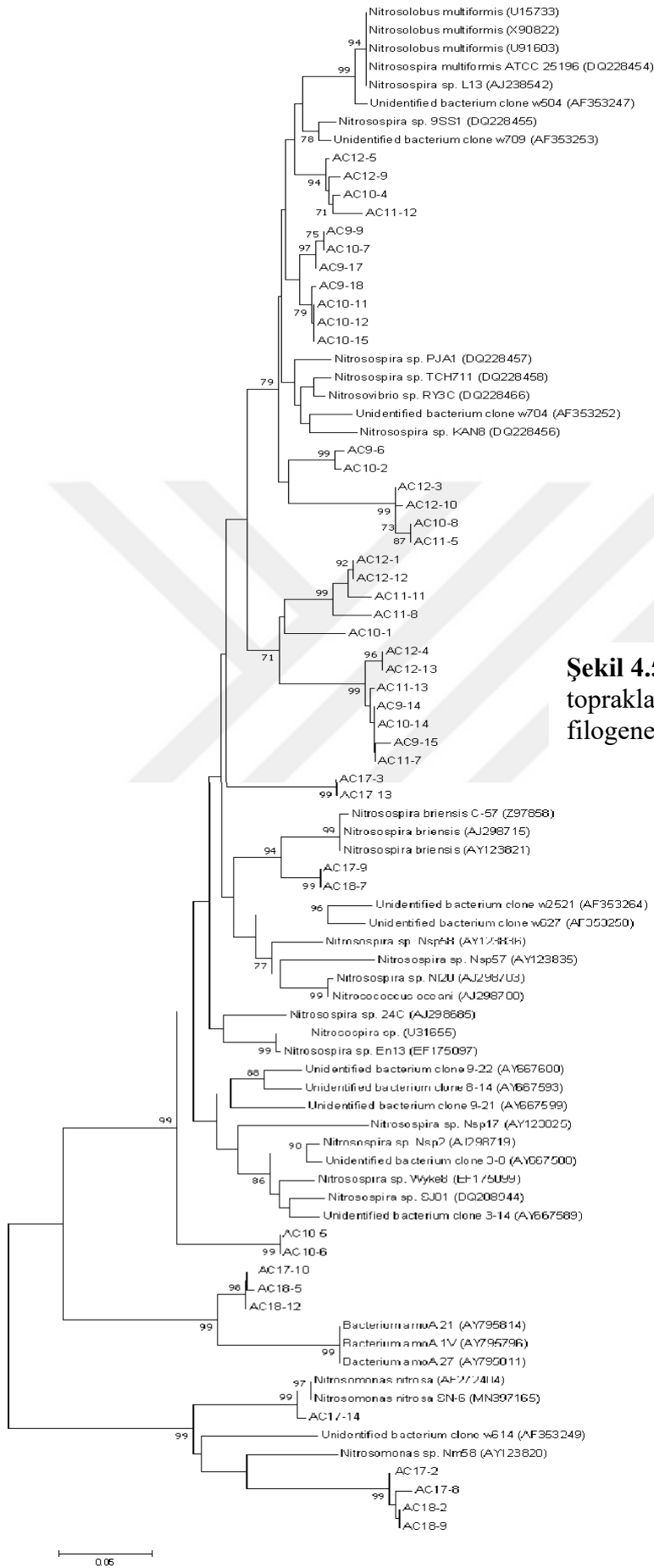
4.2.1. Amonyum okside ediciler için dizi analiz sonuçları ve filogenetik dağılımları

Birinci dönem normal topraklardan 31 adet *amoA* klon dizisi elde edilmiş ve bu dizilere ait filogenetik ağaç Şekil 4.4’de verilmiştir. Klonlara yakınlık gösteren ve filogenetik analizlere dahil edilen tanımlanmış dizilerin biri hariç tamamı Betaproteobacteria taksonomik grubunun üyeleridir. Sadece *Nitrosococcus oceani* gammaproteobacteria taksonomik grubuna aittir. Genel olarak bakıldığında klonların çoğunun daha önceden tanımlanmış dizilere yakın olmakla birlikte onlardan ayrı olarak kendi aralarında gruplar oluşturdıkları görülmektedir. Ancak yakından bakıldığında bazı klonların bu grup içinde de ayrıştığı görülmektedir. Örneğin aynı uygulamadan gelen (Kontrol) AC1-10, AC1-5 ve AC1-8 klonları ayrı bir alt dal oluşturmuşlardır. Ayrıca AC1-4 tanımlanmış dizilerle birlikte ayrı bir grup içerisinde yer almıştır. Benzer şekilde AC3-12 de tek olarak bilinen dizilerle birlikte ayrı bir dalda görünmüştür. AC1-16, AC3-17 ve AC1-4 grupları diğer uygulamalardan biraz daha farklı gruplarda yer almış. Yine AC1 (Kontrol) ve AC3 (Çiftlik gübresi) gruplarının genel olarak birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca AC1-16 ve AC3-17 klonlarının yine bir arada diğer gruplardan farklı olarak tanımlanmamış gruplara yakın olduğu görülmüştür. AC1-19 klonunda diğer gruplardan farklı olarak tek başına ayrı bir dal oluşturduğuda görülmektedir. Klonlardan AC2-4 (vermikompost)’ ün ise tanımlanmış gruplarla yakın dalda bulunması ve yine diğer uygulamalardan farklı olarak AC17-9 (çiftlik gübresi), AC18-7 (vermikompost) klonlarıyla yakınlığı göze çarpmakta ve bulundukları gruplardan farklı olarak uygulama gruplarına yakınlıkları da görülmektedir. Ayrıca AC17-9 ve AC18-7 klonları dışında diğer AC17 ve AC18 klonlarının *Nitrosomonas* gruplarına yakınlığı görülmektedir. Uygulama gruplarının ise *Nitrospira* bakteri gruplarına daha yakın olduğu söylenebilir. Yine klonlardan AC17-14 (çiftlik gübresi), *Nitrosomonas nitrosa* bakteri gruplarıyla ayrı bir dalda olduğu görülmüştür. AC17-3 ve AC17-13 klonlarının *Nitrospira* grupları ve diğer uygulamalara yakın olduğuda görülmüştür. Filogenetik ağaçta görülen en ilginç bulgulardan biri ise vermikompost ve çiftlik gübresinden elde edilen klonların çoğunluğunun belirgin bir şekilde diğer klonlardan ayrılması olmuştur. AC17-10, AC18-5 ve AC18-12 klonları ayrı bir dal üzerinde gruplaşmış iken AC17-2, AC17-8, AC17-14, AC18-2 ve AC18-9 klonları da tanımlanmış bazı dizilerle birlikte farklı bir dalda yer almışlardır. Buralarda uygulamalardan elde edilen klonlar yer almamıştır.



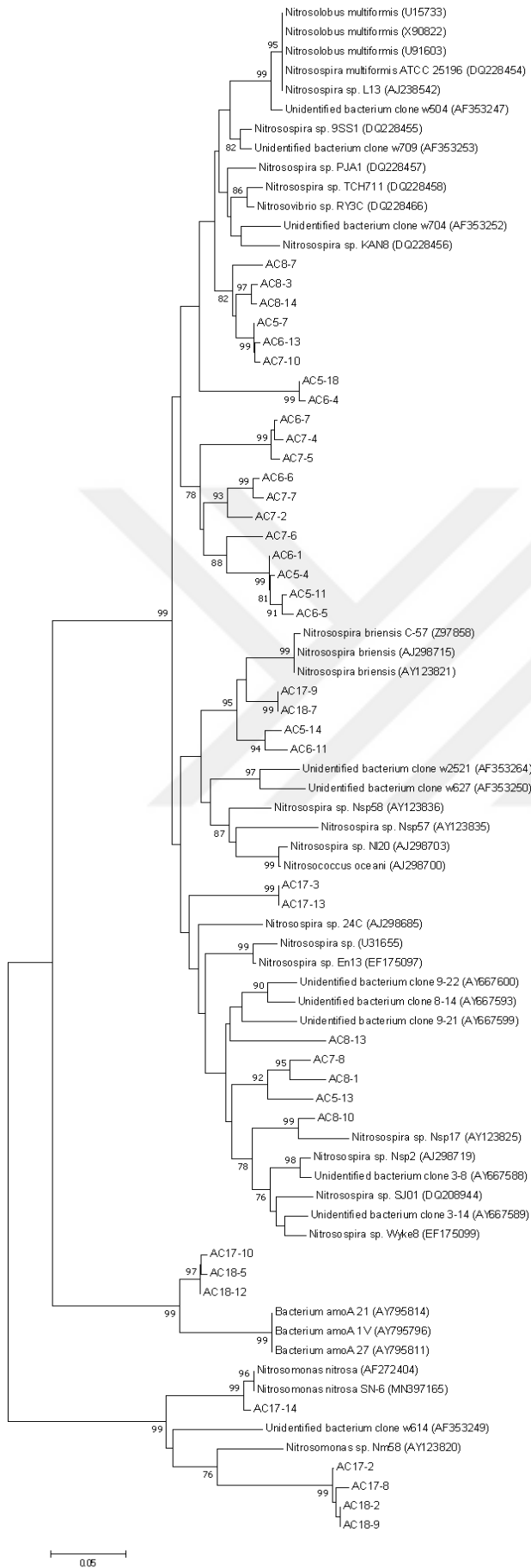
Şekil 4.4. Birinci yetiştiricilik dönemi normal topraklardan elde edilen amoA gen klonlarına ait filogenetik ağaç

İkinci dönem normal topraklardan 31 adet *amoA* klon dizisi elde edilmiş ve gen klonlarına ait filogenetik ağaç Şekil 4.5’de verilmiştir. AC12-5 (kimyasal gübre), AC12-9, AC10-4 (vermikompost) ve AC11-12 (çiftlik gübresi) klonlarının ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca AC9-9 (kontrol), AC9-17, AC10-7 (vermikompost), AC9-18, AC10-11, AC10-12 ve AC10-15 klonları ise ayrı bir grup oluşturmuşlardır. Genel olarak bakıldığında AC9 ve AC10, sırasıyla kontrol ve vermikompost uygulamalarının yapıldığı topraklara ait klonların birbirlerine daha yakın gruplaştığı görülmektedir. Yine dallanmalara bakıldığında kimyasal gübre uygulamasına ait AC12-1 ve AC12-12 klonlarının diğer AC11-11 ve AC11-8 çiftlik gübresi uygulaması olan klonlar ile yakın dallandığı görülmektedir. Bu dönemde uygulamalara ait klonlar genel olarak yine kendi aralarında bir gruplaşma göstermiş olup belli bir uygulamaya ait klonların oluşturduğu özel gruplaşmalar daha az görülmüştür. Vermikompost uygulamasına ait AC10-5 ve AC10-6 klonları belirgin bir şekilde diğer klonlardan ayrı olarak bir dal oluşturmuşlardır. Çiftlik gübresi AC17-3 ve AC17-13 klonlarının uygulama gruplarına yakın dallandığı da söylenebilir. Bir önceki paragrafta belirtilen belirgin ayrışmaya ek olarak vermikompost ve çiftlik gübrelerine ait klonlardan AC17-3 ve AC17-13 ile AC17-9 ve AC18-7 klonları iki ayrı dalda gruplaşmışlardır.



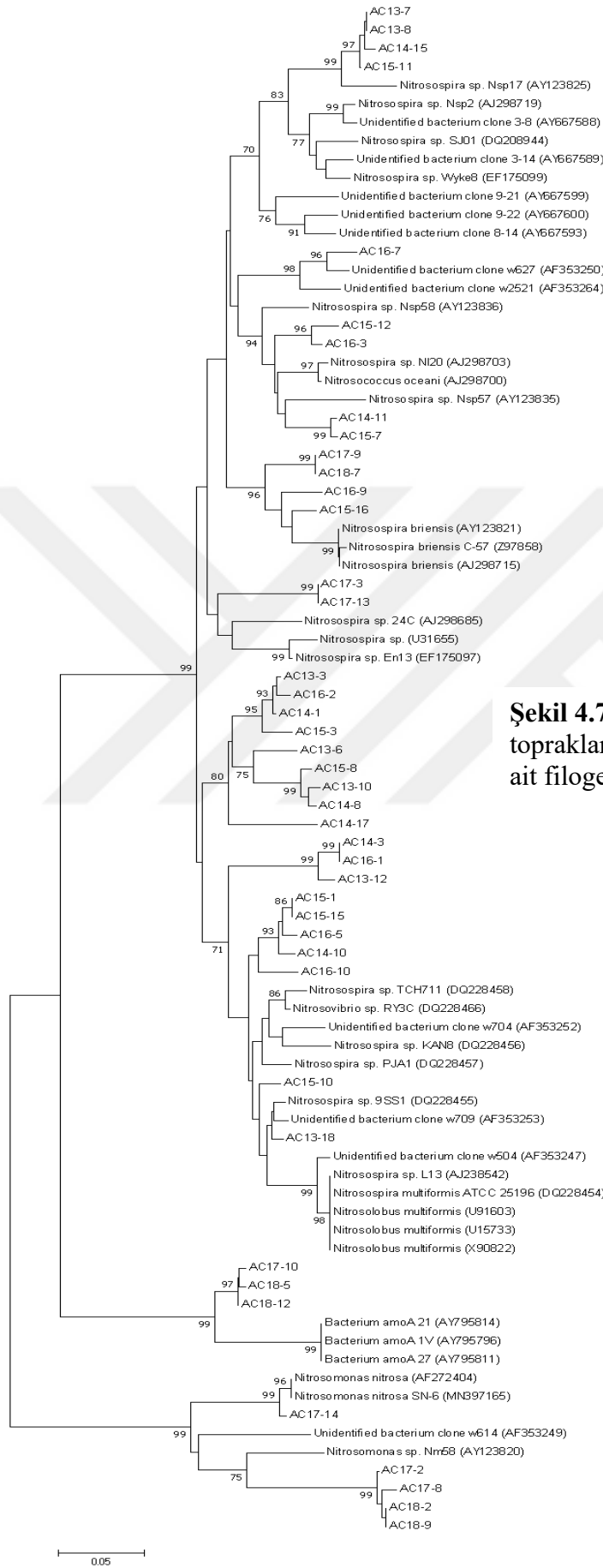
Şekil 4.5. İkinci yetiştiricilik dönemi normal topraklardan elde edilen *amoA* gen klonlarına ait filogenetik ağaç

Birinci dönem rizosfer topraklarından 25 adet *amoA* klon dizisi elde edilmiş ve gen klon dizilerine ait filogenetik ağaç Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu rizosfer toprağında, diğer normal topraklarda görülmeyen yeni gruplaşmalar oluşmuştur. Kimyasal gübre uygulamalarına ait topraklardan elde edilen AC8-3 ve AC8-14 klonları kendi arasında küçük bir gruplaşma oluştururken yine yakın dallarda aynı gruptan AC8-7, kontrol grubuna ait AC-5, vermikompost uygulamasına ait AC6-13, çiftlik gübresine ait AC7-10 klonları yakın olarak gruplaşmışlardır. Genel olarak bakıldığında kontrol ve vermikompost uygulamaları olan AC5 ve AC6 klonları hep bir arada gruplaşmışlardır. Kontrol grubu ve vermikompost uygulamasına ait AC5-18 ve AC6-4 klonları ise diğer gruplardan ayrı bir şekilde dallanmıştır. AC6-7, AC7-7, AC6-1 ve AC5-11 klonlarını da içerecek şekilde 11 klon içeren bir grup oluşmuş ancak bu grupta kimyasal gübre uygulamalarına (AC8) ait herhangi bir klon yer almamıştır. Yine sırasıyla kontrol ve vermikompost uygulamalarına ait AC5-14 ve AC6-5 klonlar diğer uygulamalardan farklı olarak tanımlanmış gruplar ve sırasıyla çiftlik gübresi ve vermikomposttan elde edilen AC17-9 ve AC18-7 klonlarına yakın dallar oluşturduğu görülmüştür. Benzer şekilde, AC8-13, AC7-8, AC8-1, AC5-13 ve AC8-10 tanımlanmış ve bazı tanımlanmamış bakterilerle birlikte belirgin olarak ayrı bir grup oluşturmuşlardır. Bu grupta vermikompost uygulamasına (AC6) ait herhangi bir klon bulunmamıştır. Ayrıntılı olarak bakacak olursak, kimyasal gübreleme uygulamasının yapıldığı toprağa ait AC8-13 klonunun tanımlanamamış bakteri klonlarıyla ayrı bir dal oluşturduğu görülmüş. Yine kimyasal gübreleme uygulamasının yapıldığı topraktan elde edilen AC8-10 klonunun *Nitrosospira sp. Nsp 17* bakterisiyle aynı dalda yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4.6. Birinci yetiştiricilik dönemi rizosfer topraklarından elde edilen *amoA* gen klonlarına ait filogenetik ağaç

İkinci dönem rizosfer topraklarından 30 adet *amoA* gen klon dizisi elde edilmiş ve bu klon dizilerine ait filogenetik ağaç Şekil 4.7 de verilmiştir. AC13-7, AC13-8, AC14-15 ve AC15-11 klonları *Nitrosomonas sp. Nsp17*, ve *Nitrospira sp. Wyke8* dizilerini de içeren grup içinde yer almışlardır. Ancak kimyasal gübre uygulamalarına (AC16) ait herhangi bir klon bu grupta yer almamıştır. Kimyasal gübre uygulamasına ait topraktan elde edilen AC16-7 klonu diğer gruplardan farklı olarak tanımlanmamış bakteri klonu w627 ile aynı grupta dallanmıştır. Yine aynı grupta çiftlik gübresi ve kimyasal gübre uygulamalarına ait topraklardan elde edilen AC15-12 ve AC16-3 klonları bir arada gruplanırken, vermikompost ve çiftlik gübresi uygulanmış topraklara ait AC14-11 ve AC15-7 klonları bir arada gruplanmışlardır. Ayrıntılı bakıldığında AC14-11 ve AC15-7 klonları *Nitrospira sp. Nsp57* dizilerin bulunduğu grupta aynı grupta yer aldığı göze çarpmaktadır. Genel olarak baktığımızda AC16-7, AC15-12, AC16-3, AC14-11 ve AC16-7 klonları tanımlanmış bazı bakterilerle bir grup oluştururken kontrol uygulamasına (C13) ait klon bu grupta bulunmamıştır. Ayrıca yine çiftlik gübresi uygulanmış topraktan elde edilmiş AC15-16 klonu *Nitrospira briensis* dizilerini içeren gruplarla yakın dallanmış ve yine kimyasal gübre uygulanmış topraklara ait AC16-9 klonu da aynı grupta yer almıştır. Bunun yanı sıra bu iki klon çiftlik gübresi ve vermikomposttan elde edilen AC17-9 ve AC18-7 klonlarıyla da yakın şekilde gruplaşmışlardır. Yine detaylı bakıldığında diğer gruplardan ayrı dallanan vermikompost uygulanmış topraklara ait AC14-17 klonunu görebiliriz. Başka bir dallanmada ise AC14-3 ve AC16-1 klonlarıyla yakın dallanan AC13-12 klonu görülmüş fakat bu grupta çiftlik gübresi uygulanmış toprağa ait AC15 klonu bulunmamıştır. Aynı şekilde AC15-1, AC15-15, AC16-5, AC14-10, AC16-10 klonları gruplaşmış fakat kontrol grubuna ait AC13 klonlarına rastlanmamıştır. Çiftlik gübresi uygulanmış topraktan elde edilen AC15-10 klonu diğer gruplardan ayrı olarak tanımlanmış gruplara yakın dallanmıştır. Yine bu gruba yakın kontrol grubuna ait topraktan elde edilen AC13-18 klonu tanımlanmış gruplarla dallanmış diğer uygulamalardan AC15-10 klonuyla yakın gruplaştığı görülmektedir.



Şekil 4.7. İkinci yetiştiricilik dönemi rizosfer topraklarından elde edilen *amoA* gen klonlarına ait filogenetik ağaç

Çizelge 4.2. Birinci dönem normal toprak *amoA* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
AC1-3	Uncultured bacterium clone DU29	KF619228.1	99	KONTROL
AC1-4	Uncultured bacterium clone C14G1	KJ438470.1	100	KONTROL
AC1-5	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	99	KONTROL
AC1-6	Uncultured bacterium clone OTU631	MT797534.1	99	KONTROL
AC1-8	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	99	KONTROL
AC1-10	Uncultured bacterium clone WBA104	KY130217.1	95	KONTROL
AC1-16	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 25	DQ995951.1	100	KONTROL
AC1-19	Uncultured bacterium clone BSW2-9	KT323509.1	91	KONTROL
AC1-22	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB259705.1	97	KONTROL
AC2-1	Uncultured bacterium clone BN1-149	KC444060.1	100	VERMİKOMPOST
AC2-2	Uncultured bacterium clone OTU23	MK214749.1	93	VERMİKOMPOST
AC2-3	Uncultured bacterium clone FQ-13C-HF-4	HQ678212.1	93	VERMİKOMPOST
AC2-4	Uncultured bacterium clone ZD-2.79	KP178156.1	98	VERMİKOMPOST
AC2-12	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>kmsc12</i>	AY249650.1	99	VERMİKOMPOST
AC2-15	Uncultured bacterium clone OTU488	MT797510.1	94	VERMİKOMPOST
AC3-1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM3-87	JX140561.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-3	Uncultured bacterium clone IDS-1d-4	MF508746.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-7	Uncultured bacterium clone AWI28	MG658147.1	94	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-8	Uncultured ammonia oxidising bacterium clone AOB03	JN688208.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-9	Uncultured bacterium clone CSu-3	MF117561.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-12	Uncultured bacterium clone OTU217	MT797428.1	96	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-13	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB259705.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-16	Uncultured ammonia oxidising bacterium clone AOB03	JN688208.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC3-17	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 25	DQ995951.1	100	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC4-2	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	HQ414514.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC4-4	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone BYD13-AOB-17	KY062602.1	97	KİMYASAL GÜBRE
AC4-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM3-87	JX140561.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC4-9	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone J40120781_Y4B_26_M13F	KJ497704.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC4-10	Uncultured bacterium clone CW-21	MF117279.1	94	KİMYASAL GÜBRE
AC4-11	Uncultured bacterium clone LZBBC-AOB-BC47	KF179511.1	99	KİMYASAL GÜBRE
C4-15	Uncultured bacterium clone AOB-SZW14	KY807849.1	99	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.3. İkinci dönem normal toprak *amoA* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
AC9-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone VCASc51	AY256364.1	99	KONTROL
AC9-9	Uncultured bacterium clone DL34	KF619190.1	99	KONTROL
AC9-14	Uncultured bacterium clone CWI13	MG658190.1	94	KONTROL
AC9-15	Uncultured bacterium clone OTU23	MK214749.1	93	KONTROL
AC9-17	Uncultured bacterium clone AOB-SZW14	KY807849.1	99	KONTROL
AC9-18	Uncultured <i>Nitrospira sp.</i>	LN828437.1	99	KONTROL
AC10-1	Uncultured bacterium clone b3	FJ536722.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-2	Uncultured bacterium clone AOB-U2-16w-6	JQ955231.1	97	VERMİKOMPOST
AC10-4	Uncultured bacterium clone J9I	KX501463.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-5	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 3	DQ995956.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 25	DQ995951.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-7	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	LC179823.1	100	VERMİKOMPOST
AC10-8	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-11	Uncultured ammonia oxidising bacterium clone AOB03	JN688208.1	99	VERMİKOMPOST
AC10-12	Uncultured bacterium clone AOB-U0-16w-17	JQ955267.1	98	VERMİKOMPOST
AC10-14	Uncultured bacterium clone OTU488	MT797510.1	94	VERMİKOMPOST
AC10-15	Uncultured bacterium clone HSP3	MG657703.1	98	VERMİKOMPOST
AC11-5	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone A2	EF122010.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC11-7	Uncultured bacterium clone FQ-13C-HF-4	HQ678212.1	94	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC11-8	Uncultured bacterium clone IDS-1d-22	MF508762.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC11-11	Uncultured bacterium clone FQ-13C-HF-12(3)	HQ678220.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC11-12	Uncultured bacterium clone BN3-64	KC444280.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC11-13	Uncultured <i>Nitrospira sp.</i> isolate SD18	DQ208965.1L	93	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC12-1	Uncultured bacterium clone IDS-1d-4	MF508746.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC12-3	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOBOTU6	MN174768.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC12-4	Uncultured bacterium clone CSu-41	MF117599.1	93	KİMYASAL GÜBRE
AC12-5	Uncultured bacterium clone AOB-SJ2	KJ641190.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC12-9	Uncultured bacterium clone LZBBC-AOB-BC47	KF179511.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC12-10	Uncultured bacterium clone WBA104	KY130217.1	98	KİMYASAL GÜBRE
AC12-12	Uncultured bacterium clone IDS-1d-4	MF508746.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC12-13	Uncultured bacterium clone CSu-41	MF117599.1	93	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.4. Birinci dönem rizosfer toprağı *amoA* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
AC5-4	Uncultured bacterium clone IDS-1d-4	MF508746.1	99	KONTROL
AC5-7	Uncultured bacterium clone AOB-SZW14	KY807849.1	100	KONTROL
AC5-11	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone C6	EF122063.1	100	KONTROL
AC5-13	Uncultured bacterium clone VBYPREA09	JQ029919.1	98	KONTROL
AC5-14	Uncultured bacterium clone ZD-2.79	KP178156.1	98	KONTROL
AC5-18	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	100	KONTROL
AC6-1	Uncultured bacterium clone OTU631	MT797534.1	99	VERMİKOMPOST
AC6-4	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone A2	EF122010.1	99	VERMİKOMPOST
AC6-5	Uncultured bacterium partial <i>amoA</i> gene	FN423463.1	99	VERMİKOMPOST
AC6-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone VCASc1	AY256349.1	99	VERMİKOMPOST
AC6-7	Uncultured bacterium clone AWI28	MG658147.1	94	VERMİKOMPOST
AC6-11	Uncultured bacterium clone ZD-2.79	KP178156.1	98	VERMİKOMPOST
AC6-13	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM3-87	JX140561.1	99	VERMİKOMPOST
AC7-2	Uncultured Nitrosomonadales bacterium NPK-HF-AOB-OTU-3-2	MT416053.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-4	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone B56-1-39	KU937541.1	93	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-5	Uncultured bacterium clone OTU488	MT797510.1	94	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone sIEAST25c27	AY177967.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-7	Uncultured ammonia-oxidizing archaeon clone BYD13-AOB-17	KY062602.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-8	Uncultured bacterium clone C7G1	KJ438514.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC7-10	Uncultured bacterium clone AOB-DL21	KY118451.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC8-1	Uncultured bacterium clone QML-J-24	MK987862.1	98	KİMYASAL GÜBRE
AC8-3	Uncultured bacterium clone AOB-U0-16w-17	JQ955267.1	98	KİMYASAL GÜBRE
AC8-7	Uncultured bacterium clone B122	KM460429.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC8-10	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM1-1	JX140608.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC8-13	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 25	DQ995951.1	100	KİMYASAL GÜBRE
AC8-14	Uncultured bacterium clone HSP3	MG657703.1	98	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.5. İkinci dönem rizosfer toprağı *amoA* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
AC13-3	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone VCASc1	AY256349.1	99	KONTROL
AC13-6	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone sIEASc25c27	AY177967.1	99	KONTROL
AC13-7	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-CK3-78	JX140591.1	99	KONTROL
AC13-8	Uncultured bacterium clone W6-AOB-17	KF803080.1	99	KONTROL
AC 13-10	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium isolate DGGE gel band M17	HQ414514.1	100	KONTROL
AC13-12	Uncultured bacterium clone AOBOTU6	MN174768.1	98	KONTROL
AC13-18	Uncultured Nitrosomonadales bacterium clone ZY-HF-1	KJ949143.1	99	KONTROL
AC14-1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone VCASc1	AY256349.1	99	VERMİKOMPOST
AC14-3	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	100	VERMİKOMPOST
AC14-8	Uncultured bacterium clone ASP34	MG657413.1	99	VERMİKOMPOST
AC14-10	Uncultured bacterium clone HSP3	MG657703.1	99	VERMİKOMPOST
AC14-11	Uncultured bacterium clone WH16051800606(f114)M13+ J_H03	MG574738.1	95	VERMİKOMPOST
AC14-15	Uncultured bacterium clone C18G1	KJ438478.1	99	VERMİKOMPOST
AC14-17	Uncultured bacterium clone AWI28	MG658147.1	94	VERMİKOMPOST
AC15-1	Uncultured bacterium clone AOBOTU12	MN174774.1	100	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-3	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-FM1-50	JX140503.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-7	<i>Nitrosospira sp.</i> N120	AJ298703.1	96	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-8	Uncultured bacterium clone IDS-1d-4	MF508746.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-10	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone 13_B1_AOB	KX160328.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-11	Uncultured bacterium clone C4G2	KJ438509.1	100	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-12	Uncultured bacterium clone OTU217	MT797428.1	96	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-15	Uncultured bacterium clone AOB-U0-16w-17	JQ955267.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC15-16	Uncultured bacterium clone ZD-2.79	KP178156.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC16-1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium <i>amoA</i> gene	AB286829.1	100	KİMYASAL GÜBRE
AC16-2	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone VCASc1	AY256349.1	99	KİMYASAL GÜBRE
AC16-3	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM3-52	JX140545.1	95	KİMYASAL GÜBRE
AC16-5	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone AOB-HM3-87	JX140561.1	100	KİMYASAL GÜBRE
AC16-7	Uncultured bacterium clone ES-Core-HL1-sB03	HM364045.1	98	KİMYASAL GÜBRE
AC16-9	Uncultured bacterium clone ZD-2.79	KP178156.1	98	KİMYASAL GÜBRE
AC16-10	Uncultured bacterium clone LZBBC-AOB-BC47	KF179511.1	99	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.6. Organik gübrelerin *amoA* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
AC17-2	Uncultured bacterium clone FSP43	MG657651.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-3	Uncultured beta proteobacterium clone WWTP-F4	JQ638771.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-8	Uncultured bacterium clone ESP41	MG657600.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-9	Uncultured bacterium clone WT-MD-L-4	KX619685.1	100	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-10	Uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium clone NA20B13FF10	KY474811.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-13	Uncultured bacterium clone A-pmoA-60	MG973260.1	100	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC17-14	<i>Nitrosomonas nitrosa</i> strain SN-6	MN397165.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
AC18-2	Uncultured bacterium clone FSP43	MG657651.1	99	VERMİKOMPOST
AC18-5	Uncultured ammonia-oxidizing beta proteobacterium clone NA20B13FF10	KY474811.1	99	VERMİKOMPOST
AC18-7	Uncultured bacterium clone XD-J-S1	MK988022.1	100	VERMİKOMPOST
AC18-9	Uncultured bacterium clone BPamo4	HQ190118.1	99	VERMİKOMPOST
AC18-12	Uncultured bacterium clone OTU39	MT797461.1	99	VERMİKOMPOST

4.3. Denitrifikasyon Bakteri Topluluk Yapısı

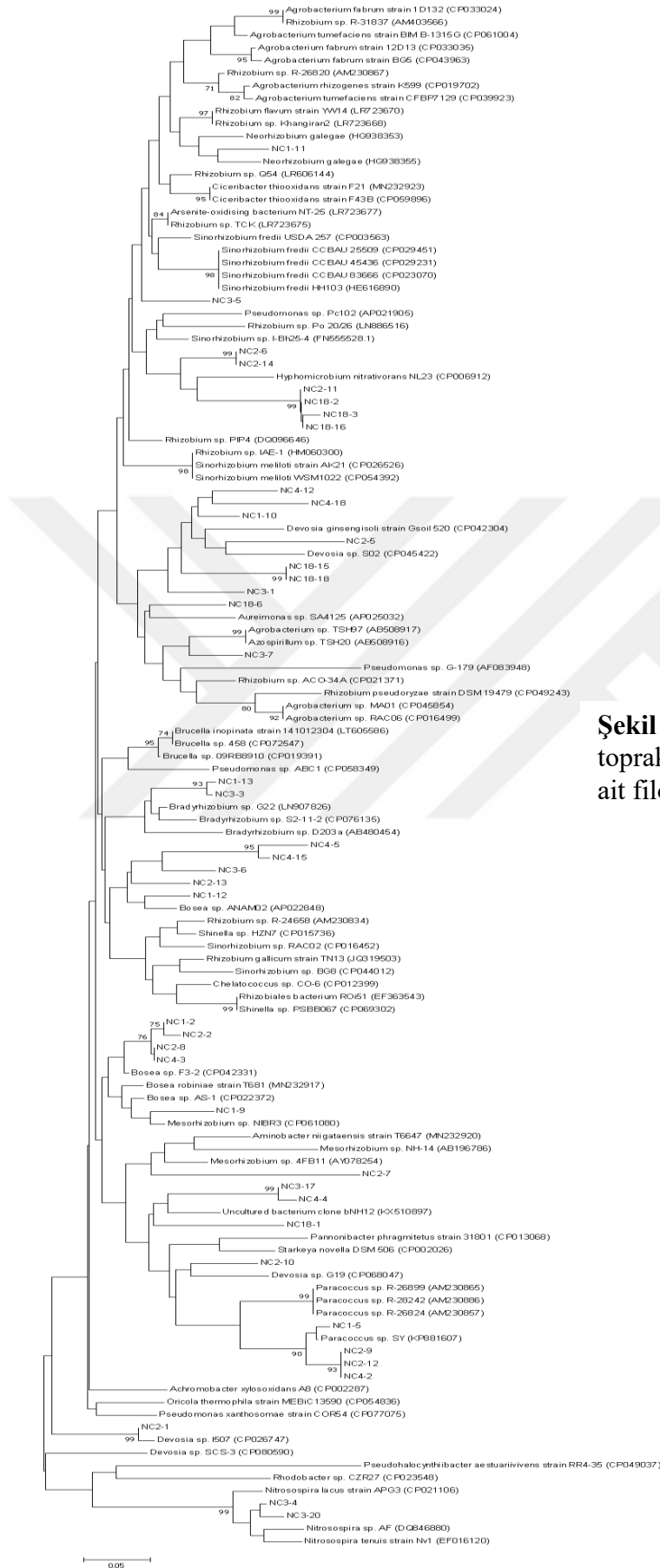
Denitrifikasyon bakterileri için kullanılması planlanan ve *nirK* genini hedefleyen *nirK1F* ve *nirK5R*, PZR primer setinin toprak örneklerinin bazılarında PZR ürünü üretmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle literatürde belirtilen 3 farklı primer seti test edilmiştir. Kullanılmasına karar verilen *nirKC1F* ve *nirKC1R* primer setinin tüm toprak örneklerinde ve vermikompostta ürün verdiği ama çiftlik gübresinde ise herhangi bir ürün vermediği tespit edilmiştir. Bu durum önemli bir bulgu olarak not edilmiş ve seçilen primer seti analizlerde kullanılmıştır.

Ek-2’de RFLP analizi ile belirlenen patern sayılarına göre rarefaksiyon analizleri verilmiştir. NC1 klonunun grafiğine bakıldığında eğrinin sabitlenmediği görülmektedir burdan yeterli RFLP klon grup sayısının elde edilemediği sonuca varılmıştır. NC2 ve NC3 klonlarının grafiği ise, sabitlenmiş ve elde edilen klon grup sayısı yeterli bulunmuştur. Fakat NC4, NC5, NC6 klonlarına ait eğrilerin sabitlenmediği görülmüştür. NC7, NC8, NC9 klonlarının grafiklerinin ise sabitlenmiş bir eğri yaptığı gözlemlenmiş ve yeteri kadar klon grubunun elde edildiği sonucuna varılmıştır. NC10 klonunun ise sabitlenmemiş bir eğri grafiği göstererek yeterli sayıda RFLP grubu sayısını yakalayamadığı görülmüştür. NC11 klon grafiğinin ise plato yaptığı, NC12, NC13, NC14 klonlarına ait eğrilerin sabitlenmediği görülmüştür. NC15 klon grafiğinin ise sabitlendiği ve yeterli sayıda klon grubuna sahip olduğu görülmüştür. Fakat NC16 ve NC18 klonlarına ait grafiklerin sabitlenmediği tespit edilmiş ve yeterince klon grubunu temsil edecek sayıda oldukları belirlenmiştir.

4.3.1. Denitrifikasyon bakterileri için dizi analiz sonuçları ve filogenetik dağılımları

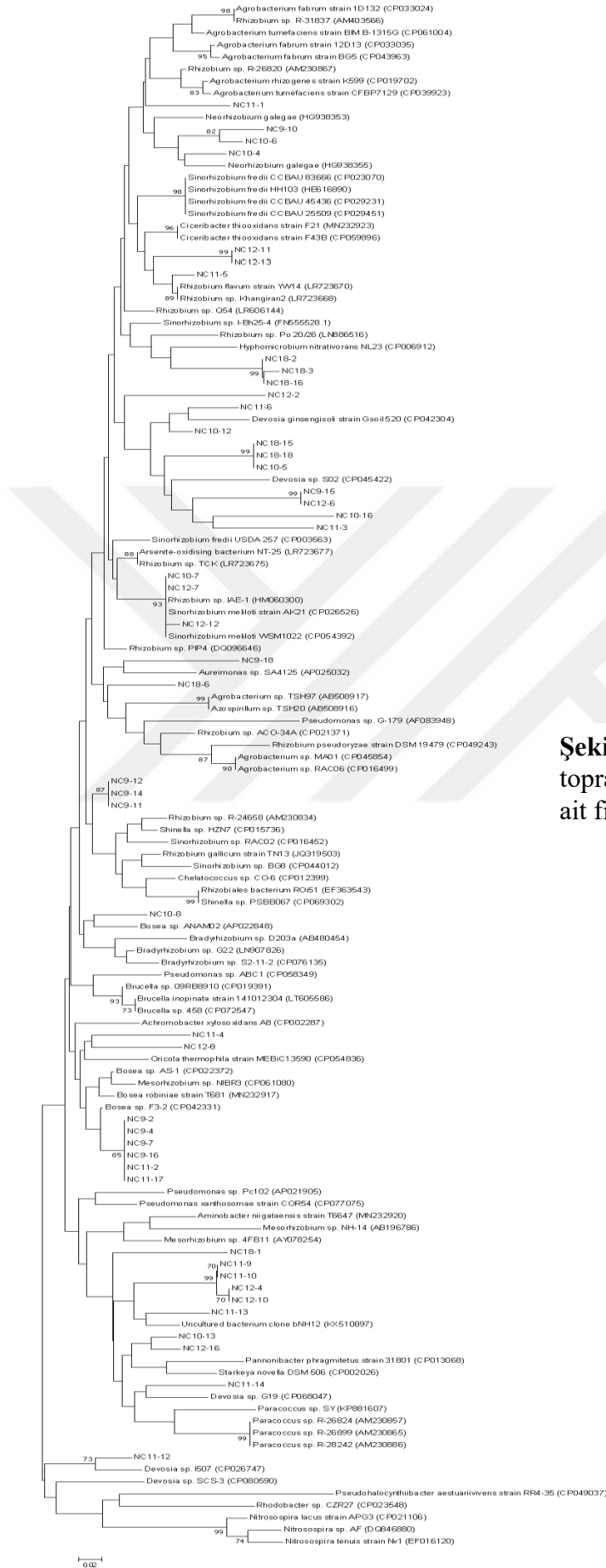
Birinci dönem normal topraklardan 34 adet *nirK* klon dizisi elde edilmiş ve bu gen klon dizilerine ait filogenetik ağaç şekil 4.8’de verilmiştir. Klonlara yakınlık gösteren ve filogenetik analizlere dahil edilen tanımlanmış dizilerin büyük bir çoğunluğu Alphaproteobacteria taksonomik grubunun üyesidir. Az sayıda olmakla birlikte betaproteobacteria ve gammaproteobacteria taksonomik grubuna ait üyelere de bulunmuştur. Filogenetik ağaç incelendiğinde klonlar daha önce tanımlanmış bakteriler ile birlikte ağaçta genele yakın bir dağılım sergilemişlerdir. Uygulama bazında gruplaşma *amoA* gen ağaçlarına göre daha düşük olmuştur. Var olan gruplardan en belirgin NC3-4 ve NC3-20 (çiftlik gübresi uygulaması) klonlarının diğer klonlardan belirgin bir şekilde ayrılarak betaproteobacteria üyesi *Nitrospira* ile yaptıkları gruptur. Detaylı şekilde bakılacak olursa, kontrol grubuna ait topraktan elde edilen NC1-11 klonu *Neorhizobium galagae* ile aynı dalda yer almış ve genel olarak bakıldığında *Rhizobium* dizilerini içeren gruplara yakın konumda yer almıştır. Çiftlik gübresi uygulanmış topraktan elde edilen NC3-5 klonu yine *Rhizobium* gruplarına yakın fakat ayrı bir dalda yer almıştır. Vermikompost gübresi uygulanmış topraktan elde edilen NC2-6 ve NC2-14 klonları ayrı bir dal oluşturmuş yine aynı uygulamadan elde edilen NC2-11 klonu ve vermikomposttan elde edilen NC18-2, NC18-3 ve NC18-16 klonları *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23 dizileriyle yakın grupta yer almışlardır. Kimyasal gübre uygulaması olan NC4-12 ve NC4-18 klonları ayrı bir dal oluştururken kontrol grubuna ait topraklardan elde edilen NC1-10 klonları ile yakın bir grupta yer almışlardır. Yine yakın dalda NC2-5 klonu *Devosia sp.* S02 tanımlı diziyle ayrı bir dal oluşturmuşlardır. Fakat bu dallanmada NC3-1 (vermikompost uygulaması) klonu biraz daha uzakta yer almıştır. Göze çarpan diğer bir detay ise çiftlik gübresi uygulamasından

elde edilen NC3-7 klonunun diğerlerinden ayrı olarak yine tanımlanmış dizilerle dallanması ve yakın bulunan grupta vermikomposttan elde edilen NC18-6 klonunun yer alması olmuştur. Kontrol toprağı ve çiftlik gübresi uygulanan topraktan elde edilen NC1-13 ve NC3-3 klonları da tanımlanmış *Bradyrhizobium* dizileri ile yakın gruplar oluşturmuşlardır. Kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC4-5 ve NC4-15 klonları ise diğer klonlara yakın kendi aralarında bir dal oluşturmuşlardır. Kontrol grubu klonu olan NC1-12 ise *Bosea sp.* ANAM02 tanımlanmış dizileriyle ayrı bir dal yapmıştır. Başka bir gruplaşma ise NC1-2, NC2-2, NC2-8, NC4-3, NC1-9 klonları ile tanımlanmış diziler arasında oluşmuştur ve bu grupta çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC3 klonları yer almamıştır. Vermikompost uygulamasına ait NC2-7 klonunun ise diğer klonlardan ayrı olarak tanımlanmış gruplarla bir dalda yer aldığı görülmektedir. NC3-17 ve NC4-4 klonların da ayrı bir dal oluşturduğu ve vermikomposttan elde edilen NC18-1 klonunun da bu dala yakın olduğu görülmüştür. Vermikompost uygulamasından elde edilen NC2-10 klonunda *Devosia sp. G19* tanımlı dizisiyle bir dal oluşturduğu görülmüştür. Yine göze çarpan önemli bir detay da çiftlik gübresi uygulamasına ait NC2-1 klonunun diğer gruplardan ayrı bir dalda *Devosia sp. 1507* tanımlı dizisiyle bulunması olmuştur. Bunun dışında, NC2-6, NC2-14, NC2-11 (vermikompst uygulaması) ile NC18-2, NC18-3 ve NC18- 16 (vermikompst gübresi) klonları bir arada yer almışlardır.



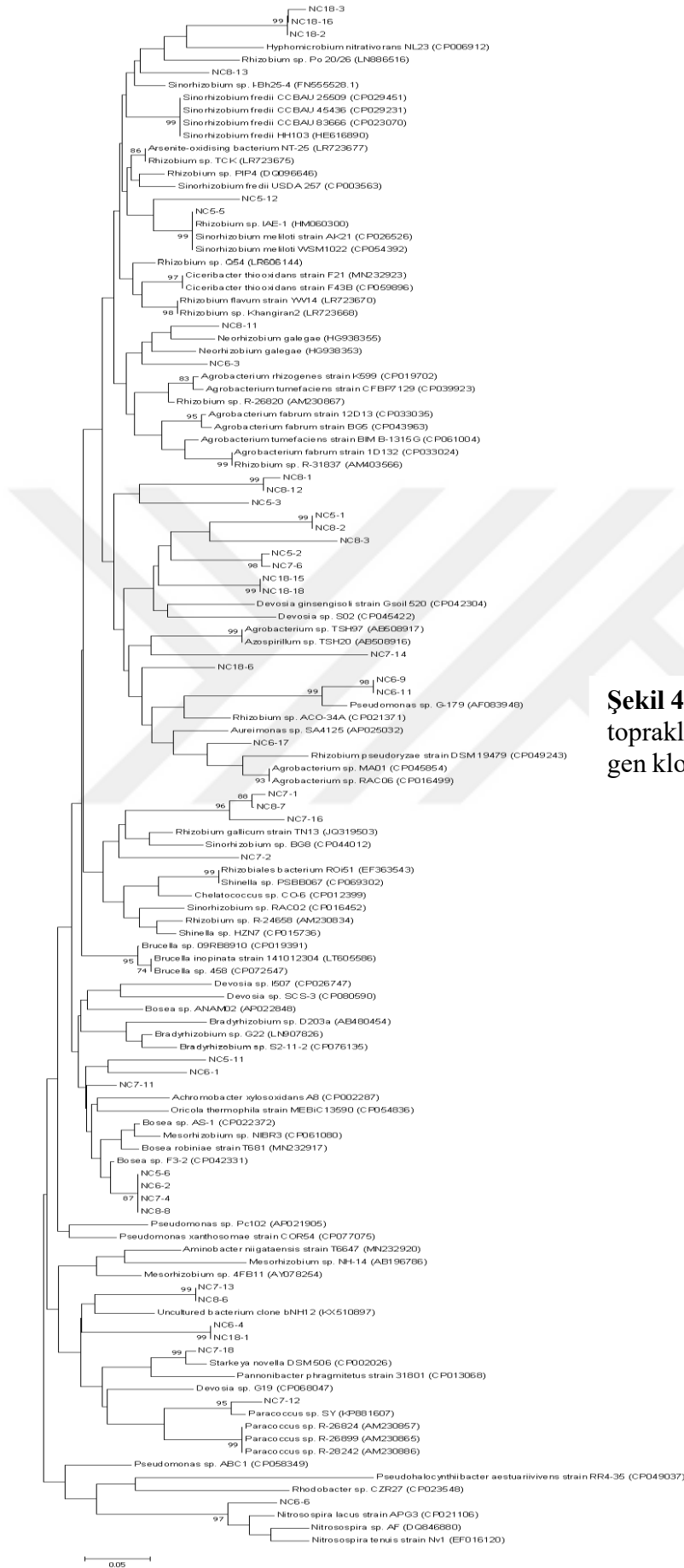
Şekil 4.8. Birinci dönem normal topraklardan elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç

İkinci dönem normal topraklardan 40 adet *nirK* gen klon dizisi elde edilmiş ve bu klon dizilerine ait filogenetik ağaç Şekil 4.9'da verilmiştir. Çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC11-1 klonunun tanımlanmış dizilerle gruplaştığı görülmektedir. Ayrıca kontrol uygulaması ve vermikompost uygulamasından elde edilen NC9-10 ve NC10-6 klonlarının bir dal oluşturduğu da görülmüştür. Yine vermikompost uygulamasına ait topraktan elde edilen NC10-4 klonunun *Neorhizobium galagae* tanımlanmış dizisiyle bir dal oluşturduğu da görülmüştür. Başka bir dalda kimyasal gübre uygulaması yapılmış topraklara ait NC12-11 ve NC12-13 klonu dizileri hemen hemen aynı olduğu görülmüş ve yine aynı gruba yakın çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC11-5 klonu *Rhizobium* gruplarıyla dallanmıştır. Bu dönemde uygulamalara ait örneklerden NC18-2, NC18-3 ve NC18-16 (vermikompost gübresi) klonları ile bir araya gelen herhangi bir klon tespit edilememiştir. Kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC12-2 klonunun tek başına ayrı bir dal oluşturduğu da görülmüştür. Yine yakın bir dal yapan NC11-6 klonu *Devosia ginsengisoli* tanımlanmış dizisiyle ayrı bir dal oluşturmuştur. Yakın bir dalda ise vermikompost uygulamasından elde edilen NC10-12 klonu yer almaktadır. Yine vermikompost uygulamasına ait NC10-5 klonu, vermikomposttan elde edilen NC18-15 ve NC18-18 klonları dizileri ile hemen hemen aynı diziye sahip olduğu da görülmüştür. Yine yakın şekilde NC9-15 ve NC12-6 (sırasıyla kontrol ve kimyasal gübre uygulaması) ayrı bir dalda NC10-16 ve NC11-3 (vermikompost ve çiftlik gübresi uygulaması) ayrı bir dalda bir arada gruplaşmışlardır. NC11-12 klonu diğer klonlardan belirgin şekilde ayrılmıştır. Vermikompost uygulanmış ve kimyasal gübre uygulanmış topraklardan elde edilen NC10-7, NC12-7 klonları *Rhizobium sp.* IAE-1 ve *Sinorhizobium meliloti* WSM1022 ve NC12-12 ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür. Başka bir gruplaşma da NC9-18 ile *Aureimonas sp.* arasında görülmüş ayrıca NC18-8 vermikomposttan elde edilen klonda aynı grupta bulunmuştur. Başka bir gruplaşmada kontrol uygulamasına ait NC9-12, NC9-14 ve NC9-11 klonları arasında olmuştur. Vermikompost uygulamasına ait NC10-8 klonuna baktığımızda ise *Bosea sp.* ANAM02 tanımlı dizileriyle ayrı bir dallanma oluşturduğu da görülmüştür. Başka bir gruplaşma ise çiftlik gübresi uygulaması ve kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC11-4 ve NC12-8 arasında görülmüş ve bu dizilere en yakın dizi *Oricola thermophila strain* MEBiC13590 olmuştur. Ayrıca uygulamalardan bağımsız olarak bazı klon dizilerinin hemen hemen aynı oldukları görülmüştür. Buna örnek olarak NC9-2, NC9-4, NC9-7, NC9-16, NC11-2 ve NC11-16 verilebilir. Başka bir gruplaşmada ise NC11-9, NC11-10 klonları kendi aralarında, NC12-4, NC12-10 klonları kendi aralarında yakın dallar oluşturmuş ve benzer dizilere sahip oldukları görülmüştür. Yine vermikompost ve kimyasal gübre uygulamasına ait NC10-13 ve NC12-16 klonları aynı dalda yer almış ve yakın bir grupta çiftlik gübresi uygulamasına ait NC11-14 klonu *Devosia sp.* G19 tanımlanmış dizisiyle aynı dalda yer almıştır. Fakat bu gruplaşmada NC9 kontrol uygulaması klonuna rastlanmamıştır. Bakıldığında en göze çarpan detay ise NC11-12 klonu *Devosia sp.* 1507 tanımlanmış grubuyla aynı dalda yer almış fakat diğer klonlardan çok ayrı bir dal oluşturmuştur.



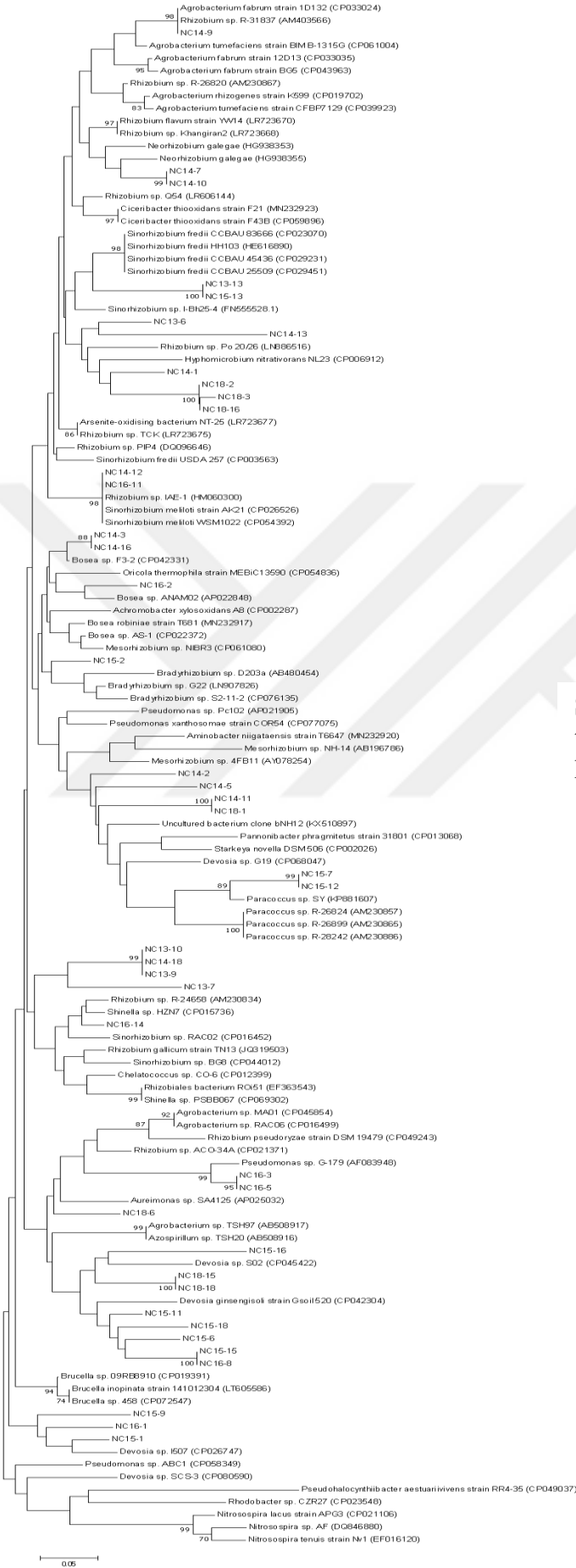
Şekil 4.9. İkinci dönem normal topraklardan elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç

Birinci dönem rizosfer topraklarından 34 adet *nirK* klon dizisi elde edilmiş ve bu gen klon dizilerine ait filogenetik ağaç Şekil 4.10'da verilmiştir. Kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC8-13 klonu vermikompost gübresinden elde edilen NC18-3, NC18-16, NC18-2 ile yakın dallarda bulunmuştur. Kontrol grubuna ait NC5-12 klonunun ise yine aynı uygulamadan NC5-5 klonu ile diğer klonlardan ayrı gruplaştığı görülmüştür. NC8-11 klonunun *Neorhizobium galagae* tanımlı dizileriyle aynı dalda bulunduğu ve yakınında vermikompost uygulamasından elde edilen NC6-3 klonunda ayrı bir dal yaptığı görülmüştür. Diğer klonlardan ayrı bir dalda; kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC8-1, NC8-12 klonları aynı dalda bulunurken yine yakın dalda kontrol uygulamasından elde edilen NC5-3 olduğu görülmektedir. Kontrol ve kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC5-1 ve NC8-2 klonlarının neredeyse çok benzer olduğu ve yine kimyasal gübre uygulamasına ait NC8-3 klonunda aynı dalda olduğu göze çarpmaktadır. Yine kontrol ve çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC5-2 ve NC7-6 klonları yakın bir dal yapmıştır. Fakat yakın dalda vermikompost gübresinden elde edilen NC18-15 ve NC18-18 klonlarının bulunması ama bu gruba yakın dalda NC6 (Vermikompost uygulaması) klonunun bulunmaması önemli bir detay olarak görülmüştür. NC6-9, NC6-11 ve NC6-17 (vermikompst uygulaması) uzaktan NC18-6 (vermikompst gübresi) ile bir grup oluşturmuşlardır. Yine vermikompost uygulaması olan NC6-9 ve NC6-11 klonları birbirine çok benzer bulunmuş ve *Pseudomonas sp.* G-179 tanımlanmış dizileriyle aynı dal üzerinde olduğu görülmüştür. Aynı grupta bulunan NC6-17 klonu da tanımlı dizilerle gruplaşmış ve genel olarak baktığımızda vermikompost uygulamasına ait NC6 klonları genelolarak bir arada gruplaşmışlardır. Çiftlik gübresi ve kimyasal gübre uygulamasına ait NC7-1 ve NC8-7 aynı dalda yine NC7-16 klonu ile yakın gruplaşmışlardır. Yine çiftlik gübresi uygulamasına ait NC7-2 klonu yakın bir dalda tek başına bulunmuştur. Genel olarak bu dalda NC7 (Çiftlik gübresi) ve NC8 (kimyasal gübre) klonları yer almış ve *Rhizobium* grubuna ait dizilerle gruplaşmışlardır. Kontrol grubuna ait NC5-11 ve vermikompost grubuna ait NC6-1 aynı dalda bulunurken yakın dalda çiftlik gübresi grubuna ait NC7-11 klonu yer almıştır. NC5-6, NC6-2, NC7-4 ve NC8-8 klonlarının olduğu tüm uygulama gruplarını içeren bir dal olduğu ve benzer dizilerde olduğu görülmüştür. Başka bir gruplaşma da ise NC7-13 ve NC8-6 klonlarının dizilerinin çok benzer olduğu görülmüş ve kültürlenememiş bakteri klonu tanımlı dizileri ile aynı dalda yer almışlardır. NC6-4 ve NC18-1 tek bir dal üzerinden diğer klonlardan ayrılmıştır. NC6-6 çok belirgin bir şekilde ayrılarak *Nitrosospora* grubunda yer almıştır. Aynı şekilde NC7-18 ve NC7-12 (çiftlik gübresi uygulaması) tanımlanmış bakteriler ile birlikte gruplaşmıştır.



Şekil 4.10. Birinci dönem rizosfer topraklarından elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç

İkinci dönem rizosfer topraklarından 34 adet *nirK* klon dizisi elde edilmiş ve bu gen klon dizilerine ait filogenetik ağaç Şekil 4.11’de verilmiştir. NC14-9, NC14-7 ve NC14-10 (vermikompost uygulaması) diğer tanımlanmış bakteriler ile birlikte yer almışlardır. Kontrol grubuna ait NC13-13 ve çiftlik gübresi uygulamasına ait NC15-13 klonlarının birbirine %100 benzer olduğu görülmüş ve *Snorhizobium fredii* tanımlı dizileriyle yakın dalda yer almışlardır. NC14-13 ve NC14-1 klonları NC18-2, NC18- 3, NC18-16 (vermikompost gübresi) ve NC13-6 (kontrol uygulaması) ve bazı tanımlanmış bakteriler ile birlikte bir gruplaşma göstermişlerdir. Ayrı bir grupta ise NC14-12 ve NC16-11 vermikompost ve kimyasal gübre uygulamasına ait klonlarda *Rhizobium* grubu tanımlı dizilerle benzer dizilere sahip oldukları belirlenmiştir. Yine vermikompost uygulamasına ait NC14-3 ve NC14-16 klonları *Bosea sp. F3-2* tanımlı dizileri ile bir dal oluşturmuşlardır. Kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC16-2 klonunda *Bosea sp. ANAM02* tanımlı dizileriyle dal oluşturduğu belirlenmiştir. Çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC15-2 klonu da *Bradyrhizobium sp.* tanımlı gruplarıyla ayrı bir dal yaptığı görülmüştür. Yine yakın dalda gruplaşan vermikompost uygulamasından elde edilen NC14-2 ve NC14-5 klonları yakın dallar oluşturmuş bunun yanı sıra NC14-11 klonunun vermikomposttan elde edilen NC18-1 klonu ile %100 benzerlik oluşturduğu belirlenmiştir. Çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC15-7 ve NC15-12 klonlarının yakın dizilere sahip oldukları ve *Paracoccus sp. SY* ve aynı tanımlanmış dizilerle bir grup oluşturduğu görülmüştür. Fakat NC14-3, NC14-16, NC16-2, NC15-2, NC14-2, NC14-5, NC15-7 ve NC15-12 uygulama klonlarının olduğu grupta NC13 kontrol grubu uygulamasından elde edilen herhangi bir klon bulunmamıştır. Başka bir grupta ise kontrol grubu ve çiftlik gübresinden elde edilen NC13-10, NC14-18 ve NC13-9 klonları birbirine çok benzer dizilere sahip oldukları görülmüş aynı dalda NC13-7 klonunda bulunduğu belirlenmiştir. Kimyasal gübre uygulamasından elde edilen NC16-3 ve NC16-5 klonlarının birbirine benzer oldukları görülmüş ve *Pseudomonas sp. G-179* ile aynı dalda olduğu görülmüştür. Çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC15-16 klonun ise *Devosia sp. S02* ile dal oluşturduğu belirlenmiştir. Yakınında vermikompost uygulamasından gelen NC18 klonlarının bulunduğu belirlenmiştir. NC15-16, NC15-11, NC15-18, NC15-6, NC15-15 klonlarının bulunduğu ve NC16-8 kimyasal gübre uygulamasının olduğu ir grupta bulunmaktadır. Genel olarak, çiftlik gübresi uygulamalarından gelen NC15 klonlarının oluşturduğu (NC15-16, NC15-11, NC15-18, NC15-6, NC15-15) ve içerisinde NC18-15 ve NC18-18 klonları bir arada bulunmuşlardır. Başka bir grupta ise yine NC15-9, NC16-1 ve NC15-1 klonlarının *Devosia sp. 1507* ile ayrı bir grupta olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11. İkinci dönem rizosfer topraklarından elde edilen nirK gen klonlarına ait filogenetik ağaç

Çizelge 4.7. Birinci dönem normal toprak *nirK* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
NC1-2	Uncultured bacterium clone OTU17	MH401152.1	99	KONTROL
NC1-5	<i>Paracoccus</i> sp. SY nitrite reductase gene	KP881607.1	98	KONTROL
NC1-9	Uncultured bacterium nirK gene	AB684596.1	85	KONTROL
NC1-10	Uncultured bacterium clone bXS41	KX510826.1	92	KONTROL
NC1-11	Uncultured bacterium clone C1-15	DQ304147.1	97	KONTROL
NC1-12	Uncultured bacterium clone bNH85	KX510970.1	90	KONTROL
NC1-13	Uncultured bacterium nirK gene	LC532459.1	94	KONTROL
NC2-1	<i>Devosia</i> sp. I507 chromosome	CP026747.1	97	VERMİKOMPOST
NC2-2	Uncultured bacterium clone OTU17	MH401152.1	99	VERMİKOMPOST
NC2-4	<i>Streptomyces</i> sp. WAC 01529 chromosome	CP029617.1	100	VERMİKOMPOST
NC2-5	Uncultured bacterium clone 2007WL_nirK_1213	KY901346.1	98	VERMİKOMPOST
NC2-6	Uncultured bacterium clone K-12	KU569167.1	88	VERMİKOMPOST
NC2-7	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band k25-6	HM116363.1	86	VERMİKOMPOST
NC2-8	Uncultured bacterium clone OTU38	MH401173.1	99	VERMİKOMPOST
NC2-9	Uncultured bacterium nirK gene	LC217979.1	98	VERMİKOMPOST
NC2-10	Uncultured bacterium clone nirK_OTU_134	KT210631.1	90	VERMİKOMPOST
NC2-11	Uncultured denitrifying bacterium clone J40811052_3_nirK_22	KM402291.1	89	VERMİKOMPOST
NC2-12	Uncultured bacterium nirK gene	LC217979.1	97	VERMİKOMPOST
NC2-13	Uncultured bacterium clone bNH85	KX510970.1	94	VERMİKOMPOST
NC2-14	Uncultured bacterium clone K-12	KU569167.1	88	VERMİKOMPOST
NC3-1	Uncultured bacterium clone K2003	MT532597.1	89	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-3	Uncultured bacterium nirK gene	LC532459.1	94	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-4	Uncultured bacterium clone 17K31	KU310359.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-5	Uncultured bacterium clone HT-nirK-21	KM520936.1	95	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-6	Uncultured bacterium clone K3167	MT532655.1	93	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-7	Uncultured bacteria partial nirK gene	HG800240.1	91	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-17	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 5	JF261019.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC3-20	Uncultured microorganism clone SF_Jan12_USGS13_D10	KR060155.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC4-2	Uncultured bacterium nirK gene	LC217979.1	98	KİMYASAL GÜBRE
NC4-3	Uncultured bacterium clone OTU38	MH401173.1	99	KİMYASAL GÜBRE
NC4-4	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 5	JF261019.1	97	KİMYASAL GÜBRE
NC4-5	Uncultured bacterium nirK gene	AB489847.1	86	KİMYASAL GÜBRE
NC4-12	Uncultured bacterium clone K3110	MT532624.1	91	KİMYASAL GÜBRE
NC4-15	Uncultured bacterium clone Kasp8	DQ182167.1	88	KİMYASAL GÜBRE
NC4-18	Uncultured bacterium clone SKC52	KX952298.1	94	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.8. İkinci dönem normal toprak *nirK* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
NC9-2	Uncultured bacterium clone OTU38	MH401173.1	99	KONTROL
NC9-4	Uncultured bacterium clone OTU30	MH401165.1	99	KONTROL
NC9-7	Uncultured bacterium clone LM 21	EU790842.1	99	KONTROL
NC9-10	Uncultured bacterium isolate	FJ842437.1	97	KONTROL
NC9-11	Uncultured bacterium isolate	JF261023.1	99	KONTROL
NC9-12	Uncultured bacterium clone G-N1M1-K-26	KM852636.1	93	KONTROL
NC9-14	Uncultured bacterium clone nirK_OTU_68	KM031809.1	93	KONTROL
NC9-15	Uncultured bacterium clone K2009	MT532600.1	84	KONTROL
NC9-16	Uncultured bacterium clone OTU38	MH401173.1	99	KONTROL
NC9-18	Uncultured bacterium clone 3K5	KU310208.1	87	KONTROL
NC10-4	Uncultured bacterium clone C1-15	DQ304147.1	97	VERMİKOMPOST
NC10-5	Uncultured denitrifying bacterium clone J40811052_3_nirk_22	KM402291.1	88	VERMİKOMPOST
NC10-6	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band KAG20-1	FJ842437.1	99	VERMİKOMPOST
NC10-7	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021 nirK gene	AJ224909.1	99	VERMİKOMPOST
NC10-8	<i>Bosea robiniae</i> strain T681	MN232917.1	90	VERMİKOMPOST
NC10-12	Uncultured bacterium clone CK-nirK-13	HQ221374.1	91	VERMİKOMPOST
NC10-13	Uncultured bacterium clone nirK_OTU_64	KT210590.1	99	VERMİKOMPOST
NC10-16	Uncultured bacterium clone OTU12	MH401147.1	82	VERMİKOMPOST
NC11-1	Uncultured bacterium clone OTU8	MH401143.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-2	Uncultured bacterium clone OTU38	MH401173.1	99	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-3	Uncultured bacterium clone OTU24	MH401159.1	83	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-4	Uncultured bacterium nirK gene	AB453550.1	86	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-5	<i>Rhizobium flavum</i> strain YW14	LR723670.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-6	Uncultured bacterium clone OTU41	MH401176.1	95	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-9	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 5	JF261019.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-10	Uncultured bacterium isolate	JF261019.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-12	<i>Devosia salina</i> strain SCS-3	CP080590.1	84	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-13	<i>Aquibium microcysteis</i> strain NIBR3	CP061080.1	81	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-14	<i>Aquibium microcysteis</i> strain NIBR3	CP061080.1	88	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC11-17	<i>Bosea sp.</i> AS-1	CP022372.1	92	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC12-2	<i>Shinella sp.</i> PSBB067 plasmid unnamed1	CP069302.1	85	KİMYASAL GÜBRE
NC12-4	<i>Brucella inopinata</i> strain 141012304	LT605586.1	80	KİMYASAL GÜBRE
NC12-6	<i>Falsihalocynthiibacter arcticus</i> strain PAMC 20958	CP014327.1	87	KİMYASAL GÜBRE
NC12-7	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	AJ224909.1	99	KİMYASAL GÜBRE
NC12-8	<i>Bosea sp.</i> AS-1	CP022372.1	89	KİMYASAL GÜBRE
NC12-10	<i>Brucella inopinata</i> strain 141012304	LT605586.1	80	KİMYASAL GÜBRE
NC12-11	<i>Rhizobium flavum</i> strain YW14	LR723670.1	87	KİMYASAL GÜBRE
NC12-12	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	AJ224909.1	99	KİMYASAL GÜBRE
NC12-13	<i>Rhizobium flavum</i> strain YW14	LR723670.1	88	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.9. Birinci dönem rizosfer toprağı *nirK* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
NC5-1	<i>Leisingera caerulea</i> strain S185	CP081084.1	81	KONTROL
NC5-2	<i>Devosia beringensis</i> strain S02	CP045422.1	85	KONTROL
NC5-3	<i>Lautropia mirabilis</i> strain NCTC12852	LR134378.1	91	KONTROL
NC5-5	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	AJ224909.1	99	KONTROL
NC5-6	<i>Bosea</i> sp. F3-2 chromosome	CP042331.1	93	KONTROL
NC5-11	<i>Devosia oryzae</i> strain G19	CP068047.1	82	KONTROL
NC5-12	<i>Sinorhizobium meliloti</i> WSM1022	CP054392.1	93	KONTROL
NC6-1	<i>Bosea</i> sp. AS-1 chromosome	CP022372.1	89	VERMİKOMPOST
NC6-2	<i>Bosea</i> sp. AS-1 chromosome	CP022372.1	92	VERMİKOMPOST
NC6-3	<i>Rhizobium</i> sp. Po 20/26	LN886516.1	86	VERMİKOMPOST
NC6-4	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C plasmid pAZKH	AP012305.1	82	VERMİKOMPOST
NC6-6	<i>Nitrosospora tenuis</i> strain Nv1	EF016120.1	86	VERMİKOMPOST
NC6-9	<i>Pseudomonas</i> sp. G-179	AF040987.1	96	VERMİKOMPOST
NC6-11	<i>Pseudomonas</i> sp. G-179	M97294.1	96	VERMİKOMPOST
NC6-17	<i>Parashewanella tropica</i> strain MEBiC05444	CP037951.1	93	VERMİKOMPOST
NC7-1	<i>Sinorhizobium</i> sp. BG8 plasmid pEMPC1	CP044012.1	84	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-2	<i>Aureimonas</i> sp. SA4125	AP025032.1	82	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-4	<i>Bosea</i> sp. AS-1	CP022372.1	91	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-6	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	85	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-11	<i>Oricola thermophila</i> strain MEBiC13590	CP054836.1	89	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-12	<i>Paracoccus everestensis</i> strain S8-55	CP090836.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-13	<i>Brucella inopinata</i> strain 141012304	LT605586.1	80	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-14	<i>Pseudomonas</i> sp. Pc102	AP021905.1	80	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-16	<i>Rhizobium gallicum</i> strain TN13	JQ319503.1	83	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC7-18	<i>Starkeya novella</i> DSM 506	CP002026.1	98	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC8-1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain TN13	JQ319503.1	82	KİMYASAL GÜBRE
NC8-2	<i>Leisingera caerulea</i> strain S185	CP081084.1	80	KİMYASAL GÜBRE
NC8-3	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	83	KİMYASAL GÜBRE
NC8-6	<i>Brucella inopinata</i> strain 141012304	LT605586.1	80	KİMYASAL GÜBRE
NC8-7	<i>Sinorhizobium</i> sp. BG8 plasmid	CP044012.1	84	KİMYASAL GÜBRE
NC8-8	<i>Bosea</i> sp. AS-1	CP022372.1	92	KİMYASAL GÜBRE
NC8-11	<i>Neorhizobium galegae</i>	HG938355.1	93	KİMYASAL GÜBRE
NC8-12	<i>Shinella</i> sp. PSBB067 plasmid unnamed1	CP069302.1	85	KİMYASAL GÜBRE
NC8-13	<i>Rhizobium</i> sp. Q54	LR606144.1	86	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.10. İkinci dönem rizosfer toprağı *nirK* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
NC13-4	<i>Bosea sp.</i> AS-1	CP022372.1	92	KONTROL
NC13-6	<i>Rhizobium sp.</i> Q54	LR606144.1	86	KONTROL
NC13-7	<i>Rhizobium gallicum</i> strain TN13	JQ319503.1	83	KONTROL
NC13-9	<i>Shewanella amazonensis</i> SB2B	CP000507.1	88	KONTROL
NC13-10	<i>Shewanella amazonensis</i> SB2B	CP000507.1	88	KONTROL
NC13-13	<i>Lautropia mirabilis</i> strain NCTC12852	LR134378.1	91	KONTROL
NC14-1	<i>Sinorhizobium sp.</i> I-Bh25-4	FN555528.1	86	VERMİKOMPOST
NC14-2	<i>Chelatococcus sp.</i> CO-6 plasmid pCO-6	CP012399.1	81	VERMİKOMPOST
NC14-3	<i>Bosea sp.</i> AS-1	CP022372.1	92	VERMİKOMPOST
NC14-5	<i>Brucella inopinata</i> strain 141012304	LT605586.1	80	VERMİKOMPOST
NC14-7	<i>Neorhizobium galegae</i>	HG938355.1	93	VERMİKOMPOST
NC14-9	<i>Rhizobium sp.</i> R-31837	AM403566.1	99	VERMİKOMPOST
NC14-10	<i>Neorhizobium galegae</i>	HG938355.1	92	VERMİKOMPOST
NC14-11	<i>Azoarcus sp.</i> KH32C plasmid pAZKH	AP012305.1	82	VERMİKOMPOST
NC14-12	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	AJ224909.1	99	VERMİKOMPOST
NC14-13	<i>Roseobacter ponti</i> strain DSM 106830	CP048788.1	94	VERMİKOMPOST
NC14-16	<i>Bosea sp.</i> AS-1	CP022372.1	92	VERMİKOMPOST
NC14-18	Arsenite-oxidising bacterium NT-25	LR723677.1	86	VERMİKOMPOST
NC15-1	<i>Devosia sp.</i> I507	CP026747.1	84	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-2	<i>Bosea robiniae</i> strain T681	MN232917.1	90	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-6	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	88	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-7	<i>Paracoccus everestensis</i> strain S8-55	CP090836.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-9	<i>Devosia salina</i> strain SCS-3	CP080590.1	85	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-11	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	88	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-12	<i>Paracoccus everestensis</i> strain S8-55	CP090836.1	97	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-13	<i>Lautropia mirabilis</i> strain NCTC12852	LR134378.1	91	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-15	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	84	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-16	<i>Devosia beringensis</i> strain S02	CP045422.1	83	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-17	<i>Mycobacterium parmense</i> JCM 14742	AP022614.1	92	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC15-18	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	86	ÇİFTLİK GÜBRESİ
NC16-1	<i>Shinella zoogloeoides</i> strain XJ20 plasmid p1	CP093529.1	84	KİMYASAL GÜBRE
NC16-2	<i>Rhizobium sp.</i> R-24658 <i>nirK</i> gene	AM230834.1	84	KİMYASAL GÜBRE
NC16-3	<i>Pseudomonas sp.</i> G-179 nitrite reductase	AF040987.1	96	KİMYASAL GÜBRE
NC16-5	<i>Pseudomonas sp.</i> G-179	AF083948.1	96	KİMYASAL GÜBRE
NC16-8	<i>Devosia ginsengisoli</i> strain Gsoil 520	CP042304.1	85	KİMYASAL GÜBRE
NC16-11	<i>Rhizobium meliloti</i> Rm 1021	AJ224909.1	99	KİMYASAL GÜBRE
NC16-14	<i>Shinella sp.</i> HZN7	CP015736.1	95	KİMYASAL GÜBRE

Çizelge 4.11. Organik gübrelerin *nirK* klon dizilerinin NCBI GenBank veri tabanında BLAST sonuçları

KLON NO	BLAST SONUCU	GENBANK NO	BENZERLİK %	UYGULAMA
NC18-1	Uncultured bacterium clone nirK_OTU_8	MG543675.1	96	VERMİKOMPOST
NC18-2	Uncultured denitrifying bacterium clone J40811052_3_nirk_22	KM402291.1	89	VERMİKOMPOST
NC18-3	Uncultured bacterium clone K117	JN255539.1	89	VERMİKOMPOST
NC18-6	Uncultured bacterium clone 4S2T0nirK321	JN123001.1	86	VERMİKOMPOST
NC18-15	Uncultured denitrifying bacterium clone J40811052_3_nirk_22	KM402291.1	88	VERMİKOMPOST
NC18-16	Uncultured denitrifying bacterium clone J40811052_3_nirk_22	KM402291.1	89	VERMİKOMPOST
NC18-18	Uncultured denitrifying bacterium clone J30914041_2_2_13_M13F	KJ498174.1	88	VERMİKOMPOST

4.4. RFLP Desenleri İle Toprağın Bazı Kimyasal Ve Biyolojik Özellikleri Arasındaki İlişkiler

Moleküler analizler sonucunda elde edilen verilere göre yapılan denemeden elde edilen *amoA* ve *nirK* klonlarının zaman (dönem) ve toprak örneğinin kaynağına göre (normal toprak, rizosfer toprağı) değişimler sergiledikleri görülmüş, bu durum bu genleri taşıyan bakterilerin topluluk yapılarında farklılaşmalar olduğuna işaret etmektedir. Bu değişimlerin hangi parametreler tarafından etkilendiğini görmek üzere klonlara ait RFLP desen sayıları kullanılarak yaptığımız korelasyon analizlerinde farklı dönemlerde ve topraklarda farklı sonuçlar çıkmıştır (Çizelge 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15). Birinci dönem normal toprakta *amoA* RFLP değerleri ile diğer veriler arasındaki korelasyona baktığımızda; *amoA* RFLP ve *nirK* arasında istatistiksel açıdan önemli korelasyon görülmemiş, alkali fosfataz enzim aktivitesi ile de aralarında istatistiksel açıdan önemli korelasyon görülmemiştir. Fakat *amoA* ve beta glikosidaz enzim aktivitesi arasında negatif korelasyon görülmüştür. Aynı şekilde üreaz enzim aktivitesi ve dehidrogenaz enzim aktivitesi arasında da negatif korelasyon olduğu bulunmuştur. Nitrifikasyon aktivitesi ve *amoA* arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu görülmüş fakat denitrifikasyon aktivitesi arasında negatif korelasyon olduğu bulunmuştur. Mezofilik bakteri sayısı ile *amoA* arasında istatistiksel açıdan önemli korelasyon olmadığı belirlenmiştir. *AmoA* RFLP ile nitrifikasyon bakteri sayısı arasında pozitif ilişki görülmüştür. Yine denitrifikasyon bakteri sayısı ile istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon görülmemektedir. Fakat değişebilir amonyum ve değişebilir nitritle *amoA* arasında negatif korelasyon olduğu göze çarpmaktadır. Değişebilir nitratla ve pH ile istatistiksel olarak önemsiz korelasyon görülmektedir. Bunun yanı sıra EC, N, P, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn ve Mn elementleriyle aralarında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir.

İkinci dönem normal toprakta *amoA* RFLP sonuçları ile veriler arasındaki korelasyonda ise; önceki dönemden farklı olarak negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Alkali fosfataz enzim aktivitesi ve *amoA* arasında negatif korelasyon olduğu görülmüş fakat beta glikosidaz, üreaz, dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile *amoA* arasında önemli bir korelasyon bulunmamıştır. Nitrifikasyon aktivitesi ile istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon yokken, denitrifikasyon aktivitesi ile aralarında negatif korelasyon olduğu negatif korelasyon olmasıdır. Nitrifikasyon bakterileri ile aralarında ise istatistiksel açıdan önemsiz bir korelasyon, denitrifikasyon bakterileri ile aralarında ise negatif korelasyon bulunmuştur. Değişebilir nitrit ve değişebilir nitrat ile aralarında negatif bir korelasyon olduğu gözlenirken amonyum ile aralarında istatistiksel olarak önemsiz korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra önceki döneme göre bu dönemde EC değeri ile istatistiksel açıdan önemsiz korelasyon olduğu görülmüştür. Aynı şekilde pH değeri önceki dönemdeki gibi önemli bir korelasyon oluşmamıştır. Toplam azot ile aralarında pozitif bir korelasyon görülmüştür. Önceki dönemden farklı olarak P, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn elementleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon görülmemiştir.

Birinci dönem rizosfer toprağı *amoA* ile diğer veriler arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde ise; *nirK* ile aralarında negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Alkali fosfataz enzim aktivitesi ile negatif korelasyon oluşmuşken, beta glikosidaz, üreaz, dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile aralarında istatistiksel olarak önemsiz korelasyon olduğu görülmüştür. Nitrifikasyon ve denitrifikasyon aktiviteleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemsiz bir korelasyon bulunmuştur. Mezofilik bakteri sayısı ve

nitrifikasyon bakteri sayısı ile aralarında istatistiksel olarak önemsiz bir korelasyon oluşmuşken, denitrifikasyon bakteri sayısı ile aralarında negatif korelasyon olduğu bulunmuştur. Değişebilir amonyum ve nitratla aralarında istatistiksel olarak önemsiz bir korelasyon görülürken, değişebilir nitrit ile negatif korelasyon bulunmaktadır. Normal topraktan farklı olarak, rizosfer toprağında pH ile *amoA* aralarında önemli düzeyde negatif korelasyon olduğu görülürken EC ile de negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. N, K ve Cu ile aralarında negatif ilişki bulunurken, P, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn elementleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon görülmemiştir.

İkinci dönem rizosfer toprağı *amoA* RFLP sonuçları ile veriler arasındaki korelasyona bakıldığında ise; *nirK* ile aralarında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Alkali fosfataz, beta glikosidaz, üreaz, dehidrogenaz, enzim aktiviteleri ile *amoA* arasında önemli korelasyon görülmemiştir. Nitrifikasyon aktivitesi ile aralarında negatif korelasyon görülürken, denitrifikasyon aktiviteleri ile aralarında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon oluşmamıştır. Mezofilik bakteri sayısı ile aralarında önemli düzeyde negatif korelasyon bulunurken aynı şekilde denitrifikasyon bakterileri ile aralarında önemli negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Nitrifikasyon bakterileri ile aralarında negatif ilişki olduğu bulunmuştur. Toplam nitrat ve nitrit ile aralarında negatif ilişki olduğu görülürken, toplam amonyum ile aralarında önemli seviyede korelasyon olmadığı gözlemlenmiştir. EC ve pH değerleri ile aralarında istatistiksel olarak önemli seviyede ilişki olmadığı görülmüştür. Toplam azot değerleri ile aralarındaki ilişkiye baktığımızda önemli düzeyde pozitif korelasyon olduğu görülmüş bunun yanı sıra Fe değeri ile de aralarında pozitif ilişki olduğu bulunmuştur. P, K, Mg, Ca, Cu elementleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunmazken, Zn ve Mn ile aralarında negatif ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Birinci dönem normal toprakta *nirK* geni için RFLP sonuçları ile diğer parametreler arasındaki ilişkilere bakıldığında; *amoA* ile aralarında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon görülmemiştir. Alkali fosfataz enzim aktivitesi ile aralarında negatif bir korelasyon görülürken, beta glikosidaz, üreaz, dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon olmadığı görülmektedir. Mezofilik bakteri sayısı ve nitrifikasyon bakteri sayıları ile aralarında pozitif bir ilişki olduğu bulunurken, denitrifikasyon bakteri ile aralarında negatif ilişki olduğu tespit edilmiştir. Değişebilir amonyum ile aralarında önemsiz bir korelasyon bulunurken değişebilir nitrat ve nitrit ile aralarında negatif bir ilişki olduğu bulunmuştur. EC, pH, N, P, K, Mg, Fe, Cu, Zn ile aralarında önemli seviyede korelasyon tespit edilmemiştir fakat Ca ve Mn ile aralarında negatif ilişki olduğu görülmüştür.

İkinci dönem normal toprakta *nirK* RFLP değerleri ile diğer toprak değerleri arasındaki ilişkiye bakıldığında; *amoA* ile aralarında negatif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Alkali fosfataz ve dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile *nirK* arasında önemsiz seviyede korelasyon oluşurken, beta glikosidaz ve üreaz enzim aktiviteleri ile aralarında negatif ilişki olduğu görülmüştür. Nitrifikasyon aktivitesi ile aralarındaki ilişkiye baktığımızda ise istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon olmadığı bulunmuştur. Denitrifikasyon enzim aktivitesi ile aralarında ise negatif korelasyon söz konusu olmuştur. Mezofilik, nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakteri sayıları ile aralarında önemsiz bir ilişki olduğu görülmüştür. Değişebilir amonyum ile aralarında ise istatistiksel açıdan önemli korelasyon bulunamamıştır. Değişebilir nitrat ile aralarında negatif korelasyon görülürken, değişebilir nitrit ile aralarında istatistiksel açıdan önemsiz

korelasyon olduğu bulunmuştur. Önceki dönemden farklı olarak hem pH hem EC ile aralarında negatif ilişki bulunmuştur. N, Fe elementleri ile aralarında negatif korelasyon görülürken, P, K, Mg, Ca, Cu, Zn, Mn elementleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon görülmemiştir.

Birinci dönem rizosfer toprağında *nirK* RFLP ile diğer toprak analiz sonuçları arasındaki ilişkide ise; *amoA* ile aralarında negatif bir ilişki olduğu görülmüştür. Alkali fosfataz, beta glikosidaz, üreaz, dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile aralarında önemsiz bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Nitrifikasyon aktivitesi, denitrifikasyon aktivitesi ile aralarında ise negatif bir ilişki olduğu görülmüştür. Mezofilik bakteri sayısı ve nitrifikasyon bakteri sayısı ile aralarında negatif ilişki bulunurken, denitrifikasyon bakteri sayısı ile aralarında önemsiz bir ilişki olduğu görülmüştür. Toplam amonyum ve nitrat ile aralarında negatif ilişki olduğu görülmüşken, toplam nitrit ile aralarında istatistiksel açıdan önemli seviyede korelasyon görülmemiştir. EC, pH, N, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn değerleri ile *nirK* arasında önemsiz bir ilişki bulunurken, Ca ve Zn arasında negatif ilişki olduğu tespit edilmiştir.

İkinci dönem rizosfer toprağında *nirK* RFLP sonuçları ile diğer toprak değerleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde; *amoA* ile aralarında pozitif ilişki bulunmuştur. Alkali fosfataz, betaglikosidaz, üreaz, dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemsiz bir ilişki olduğu saptanmıştır. Nitrifikasyon aktivitesi ile aralarında negatif ilişki görülürken, denitrifikasyon aktivitesi ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki olmadığı görülmüştür. Mezofilik ve nitrifikasyon bakteri sayıları ile aralarında negatif korelasyon olduğu görülmüş ve denitrifikasyon bakteri sayısı ile aralarında önemli seviyede negatif korelasyon bulunmuştur. Toplam amonyum ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki olmadığı görülmüş fakat toplam nitrat ve nitrit arasında negatif bir ilişki olduğu görülmüştür. EC ile arasında negatif korelasyon bulunurken pH ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki olmadığı bulunmuştur. N elementi ile aralarında pozitif korelasyon yaparken, P, Mg, Ca, Fe elementleri ile aralarında istatistiksel açıdan önemsiz bir korelasyon yapmış fakat K, Cu, Zn, Mn elementleri ile negatif korelasyon yaptığı görülmüştür.

Çizelge 4.12. Birinci dönem normal toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu

PC	nirK	amoA	AF	BG	ÜA	DA	NA	DeA	MB	NB	DB	NH ₄	NO ₃	NO ₂	pH	EC	N	P	K	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn
nirK	1																								
amoA	,058	1																							
AF	-,448	,057	1																						
BG	,723	-,647	-,407	1																					
ÜA	,806	-,535	-,501	,988*	1																				
DA	,735	-,234	-,903	,741	,818	1																			
NA	,433	,880	-,375	-,269	-,120	,256	1																		
DeA	,458	-,717	,166	,830	,753	,242	-,577	1																	
MB	,693	,736	-,416	,026	,172	,430	,948	-,291	1																
NB	,027	,991**	-,049	-,660	-,541	-,172	,897	-,790	,734	1															
DB	-,477	,114	-,547	-,417	-,378	,147	,160	-,745	-,073	,242	1														
NH ₄	,192	-,302	,716	,328	,242	-,347	-,448	,773	-,256	-,429	-,943	1													
NO ₃	-,268	,028	-,733	-,196	-,143	,386	,194	-,623	,021	,164	,969*	-,960*	1												
NO ₂	-,636	-,802	,296	,066	-,075	-,307	-,955*	,320	-,991**	-,788	,123	,195	,057	1											
pH	,535	,310	-,926	,218	,351	,809	,696	-,351	,712	,397	,476	-,726	,636	-,621	1										
EC	,254	-,620	,483	,601	,500	-,088	-,640	,944	-,400	-,720	-,844	,926	-,798	,386	-,623	1									
N	,540	-,729	,016	,905	,841	,385	-,520	,988*	-,222	-,787	-,677	,677	-,524	,270	-,211	,883	1								
P	,406	-,734	,210	,802	,717	,193	-,618	,998**	-,341	-,808	-,743	,790	-,633	,366	-,401	,957*	,980*	1							
K	,318	-,915	-,077	,870	,784	,394	-,708	,919	-,460	-,938	-,423	,503	-,280	,528	-,218	,791	,941	,919	1						
Mg	,789	-,473	-,104	,919	,905	,521	-,197	,908	,124	-,537	-,735	,620	-,550	-,076	,015	,770	,939	,882	,789	1					
Ca	-,935	-,034	,736	-,701	-,802	-,912	-,487	-,271	-,699	-,052	,142	,143	-,089	,609	-,777	,007	-,393	-,215	-,260	-,632	1				
Fe	,776	-,468	-,064	,905	,887	,486	-,208	,916	,113	-,536	-,760	,651	-,583	-,069	-,020	,791	,941	,891	,785	,999**	-,606	1			
Cu	,580	-,453	-,881	,775	,819	,965*	,019	,311	,182	-,380	,220	-,342	,451	-,050	,695	-,018	,450	,273	,536	,497	-,784	,462	1		
Zn	,706	-,531	-,735	,918	,945	,936	-,066	,546	,167	-,492	-,055	-,073	,188	-,045	,551	,239	,666	,508	,692	,717	-,819	,689	,961*	1	
Mn	-,357	-,878	-,238	,345	,250	,203	-,786	,298	-,779	-,812	,367	-,141	,411	,855	-,138	,188	,329	,319	,631	,045	,186	,030	,451	,393	1

PC: Pearson Correlation, ÜA: Üreaz Enzim Aktivitesi, AF: Alkali Fosfataz Enzim Aktivitesi, BG: β -Glikosidaz Enzim Aktivitesi, DA: Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi, NA: Nitrifikasyon Aktivitesi, DeA: Denitrifikasyon Aktivitesi, MB: Mezofilik Bakteri Sayısı, NB: Nitrifikasyon Bakteri Sayısı, DB: Denitrifikasyon Bakteri Sayısı, NH₄: Değişebilir Amonyum, NO₃: Değişebilir Nitrat, NO₂: Değişebilir Nitrit, N: Azot, P: Fosfor, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, Fe: Demir, Cu: Bakır, Zn: Çinko, Mn: Mangan, *%5 düzeyinde önemlidir. **%1 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.13. İkinci dönem normal toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu

PC	nirK	amoA	AF	BG	ÜA	DA	NA	DeA	MB	NB	DB	NH ₄	NO ₃	NO ₂	pH	EC	N	P	K	Mg	Ca	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
nirK	1																									
amoA	-,051	1																								
AF	,143	-,165	1																							
BG	-,084	,032	,957*	1																						
ÜA	-,170	,880	,286	,496	1																					
DA	,741	,559	-,287	-,350	,254	1																				
NA	,951*	,250	,169	,010	,136	,858	1																			
DeA	-,491	-,788	,361	,327	-,485	-,945	-,685	1																		
MB	,339	-,358	,959*	,835	,047	-,220	,292	,383	1																	
NB	,098	,932	-,457	-,312	,650	,734	,346	-,915	-,578	1																
DB	,867	-,255	-,284	-,529	-,539	,654	,724	-,393	-,029	,036	1															
NH ₄	,958*	,209	,216	,048	,118	,827	,998**	-,642	,344	,295	,721	1														
NO ₃	-,826	-,493	-,207	-,122	-,408	-,878	-,960*	,786	-,252	-,525	-,523	-,951*	1													
NO ₂	,721	-,654	,508	,235	-,517	,069	,526	,247	,731	-,613	,614	,570	-,320	1												
pH	-,154	,260	,872	,972*	,684	-,256	,006	,167	,699	-,095	-,618	,034	-,176	,033	1											
EC	-,806	,618	-,083	,210	,699	-,291	-,583	-,036	-,360	,422	-,878	-,608	,334	-,899	,391	1										
N	-,161	,994**	-,179	,041	,888	,470	,142	-,725	-,392	,910	-,348	,100	-,395	-,726	,274	,700	1									
P	,448	,815	,233	,293	,797	,739	,702	-,808	,136	,729	,072	,683	-,874	-,099	,437	,163	,756	1								
K	,585	,004	,870	,759	,302	,206	,632	-,063	,897	-,179	,134	,668	-,644	,655	,693	-,349	-,061	,541	1							
Mg	,068	,914	,245	,408	,968*	,480	,371	-,661	,050	,740	-,311	,349	-,617	-,397	,593	,526	,896	,921	,386	1						
Ca	,873	,438	-,015	-,125	,243	,956*	,969*	-,842	,074	,561	,684	,953*	-,968*	,310	-,075	-,432	,337	,777	,474	,478	1					
Na	-,017	,135	,944	,992**	,575	-,236	,105	,206	,817	-,204	-,491	,139	-,233	,216	,983*	,217	,135	,410	,798	,508	-,015	1				
Fe	-,451	,914	-,228	,039	,844	,205	-,165	-,512	-,478	,801	-,569	-,206	-,101	-,884	,272	,877	,953*	,539	-,252	,780	,039	,104	1			
Cu	,873	,434	-,041	-,152	,227	,962*	,965*	-,847	,051	,566	,697	,949	-,961*	,304	-,102	-,438	,332	,765	,451	,463	1,000**	-,042	,036	1		
Zn	,933	,006	,474	,278	,052	,615	,932	-,391	,611	,024	,636	,951*	-,862	,751	,210	-,676	-,097	,573	,836	,251	,817	,345	-,381	,807	1	
Mn	,822	,519	,119	,038	,392	,917	,957*	-,832	,168	,577	,553	,944	-,996**	,274	,102	-,327	,422	,868	,574	,607	,983*	,152	,128	,978*	,830	1

PC: Pearson Correlation, ÜA: Üreaz Enzim Aktivitesi, AF: Alkali Fosfataz Enzim Aktivitesi, BG: β -Glikosidaz Enzim Aktivitesi, DA: Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi, NA: Nitrifikasyon Aktivitesi, DeA: Denitrifikasyon Aktivitesi, MB: Mezofilik Bakteri Sayısı, NB: Nitrifikasyon Bakteri Sayısı, DB: Denitrifikasyon Bakteri Sayısı, NH₄: Değişebilir Amonyum, NO₃: Değişebilir Nitrat, NO₂: Değişebilir Nitrit, N: Azot, P: Fosfor, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, Fe: Demir, Cu: Bakır, Zn: Çinko, Mn: Mangan, *%5 düzeyinde önemlidir. **%1 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14. Birinci dönem rizosfer toprağında ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu

PC	nirK	amoA	AF	BG	ÜA	DA	NA	DeA	MB	NB	DB	NH ₄	NO ₃	NO ₂	pH	EC	N	P	K	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn
nirK	1																								
amoA	-,426	1																							
AF	,819	-,125	1																						
BG	,223	,783	,466	1																					
ÜA	,657	,343	,550	,791	1																				
DA	,470	,426	,840	,822	,617	1																			
NA	-,730	,573	-,205	,168	-,470	,197	1																		
DeA	-,765	,408	-,274	-,032	-,636	,052	,979*	1																	
MB	-,729	,811	-,252	,407	-,221	,261	,942	,865	1																
NB	-,378	,645	-,568	,373	,352	-,222	-,038	-,145	,267	1															
DB	,909	-,397	,957*	,227	,462	,648	-,408	-,430	-,501	-,664	1														
NH ₄	-,076	,160	-,538	,040	,350	-,479	-,515	-,559	-,264	,850	-,482	1													
NO ₃	-,422	,016	,069	-,198	-,674	,163	,806	,873	,565	-,609	-,011	-,870	1												
NO ₂	,817	-,645	,342	-,175	,456	-,103	-,985*	-,957*	-,968*	-,126	,548	,360	-,707	1											
pH	,292	-,987*	,045	-,854	-,490	-,478	-,439	-,258	-,708	-,681	,309	-,237	,122	,513	1										
EC	,400	-,251	,778	,077	-,078	,626	,247	,267	,026	-,888	,745	-,943	,657	-,076	,276	1									
N	,736	-,353	,243	,068	,661	-,054	-,968*	-,998**	-,833	,209	,388	,605	-,903	,936	,202	-,317	1								
P	,693	,339	,829	,849	,886	,904	-,197	-,358	-,049	-,016	,693	-,122	-,268	,255	-,452	,370	,365	1							
K	,744	-,172	,985*	,375	,401	,816	-,095	-,141	-,192	-,685	,945	-,674	,233	,248	,117	,875	,103	,739	1						
Mg	,176	,799	,482	,993**	,724	,855	,267	,072	,482	,308	,229	-,063	-,083	-,262	-,854	,156	-,039	,831	,409	1					
Ca	-,395	,554	,203	,391	-,216	,555	,916	,860	,851	-,238	-,024	-,714	,813	-,849	-,455	,547	-,859	,163	,302	,495	1				
Fe	,299	,421	,015	,597	,841	,157	-,499	-,644	-,179	,768	-,041	,790	-,890	,394	-,551	-,606	,691	,507	-,157	,501	-,459	1			
Cu	,634	-,138	,948	,345	,284	,815	,050	,013	-,076	-,736	,891	-,777	,381	,110	,108	,934	-,052	,671	,988*	,395	,430	-,281	1		
Zn	-,276	,869	,230	,784	,243	,710	,742	,595	,856	,183	-,058	-,339	,396	-,728	-,833	,257	-,566	,473	,242	,845	,856	,065	,313	1	
Mn	,684	,173	,956*	,693	,644	,961*	-,029	-,146	-,006	-,376	,832	-,491	,079	,144	-,247	,701	,131	,922	,928	,714	,370	,134	,902	,488	1

PC: Pearson Correlation, ÜA: Üreaz Enzim Aktivitesi, AF: Alkali Fosfataz Enzim Aktivitesi, BG: β -Glikosidaz Enzim Aktivitesi, DA: Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi, NA: Nitrifikasyon Aktivitesi, DeA: Denitrifikasyon Aktivitesi, MB: Mezofilik Bakteri Sayısı, NB: Nitrifikasyon Bakteri Sayısı, DB: Denitrifikasyon Bakteri Sayısı, NH₄: Değişebilir Amonyum, NO₃: Değişebilir Nitrat, NO₂: Değişebilir Nitrit, N: Azot, P: Fosfor, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, Fe: Demir, Cu: Bakır, Zn: Çinko, Mn: Mangan, *%5 düzeyinde önemlidir. **%1 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.15. İkinci dönem rizosfer toprağında ölçülen parametreler arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu

PC	nirK	amoA	AF	BG	ÜA	DA	NA	DeA	MB	NB	DB	NH ₄	NO ₃	NO ₂	pH	EC	N	P	K	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn
nirK	1																								
amoA	,970*	1																							
AF	,160	,341	1																						
BG	,665	,660	,615	1																					
ÜA	,706	,760	-,043	,014	1																				
DA	,651	,447	-,478	,388	,222	1																			
NA	-,649	-,472	,145	-,691	-,002	-,914	1																		
DeA	,701	,843	,777	,685	,551	-,054	-,116	1																	
MB	-,869	-,951*	-,615	-,767	-,612	-,229	,364	-,960*	1																
NB	-,708	-,584	-,138	-,866	-,008	-,783	,960*	-,347	,551	1															
DB	-,986*	-,995**	-,310	-,702	-,713	-,522	,558	-,809	,938	,660	1														
NH ₄	,841	,720	-,398	,261	,705	,847	-,655	,235	-,475	-,555	-,749	1													
NO ₃	-,523	-,383	-,111	-,823	,223	-,732	,944	-,184	,375	,972*	,469	-,393	1												
NO ₂	-,751	-,614	-,044	-,815	-,089	-,848	,978*	-,320	,544	,993**	,689	-,648	,949	1											
pH	,561	,345	-,491	,386	,086	,991**	-,930	-,140	-,140	-,794	-,428	,767	-,774	-,849	1										
EC	-,189	,051	,604	-,197	,278	-,857	,817	,476	-,227	,641	,042	-,478	,713	,678	-,916	1									
N	,970*	1,000**	,341	,660	,760	,447	-,472	,843	-,951*	-,584	-,995**	,720	-,383	-,614	,345	,051	1								
P	,528	,691	,393	,084	,869	-,219	,303	,766	-,695	,176	-,616	,305	,388	,146	-,348	,688	,691	1							
K	-,043	,191	,902	,236	,092	-,757	,538	,681	-,449	,281	-,122	-,519	,327	,357	-,792	,888	,191	,571	1						
Mg	,845	,841	-,125	,174	,960*	,482	-,280	,525	-,658	-,262	-,821	,870	-,038	-,349	,357	,017	,841	,732	-,099	1					
Ca	,576	,704	,207	,005	,947	-,081	,236	,673	-,645	,160	-,635	,452	,384	,107	-,216	,567	,704	,979*	,395	,833	1				
Fe	,907	,972*	,549	,758	,646	,300	-,412	,935	-,997**	-,580	-,963*	,546	-,399	-,583	,209	,167	,972*	,687	,377	,706	,653	1			
Cu	-,141	,054	,954*	,397	-,233	-,691	,365	,575	-,358	,099	-,015	-,652	,075	,204	-,680	,687	,054	,261	,930	-,365	,060	,280	1		
Zn	-,240	-,152	-,351	-,819	,515	-,408	,735	-,165	,261	,825	,230	,004	,916	,757	-,483	,523	-,152	,499	,074	,309	,568	-,253	-,249	1	
Mn	-,364	-,168	,199	-,592	,319	-,819	,944	,131	,093	,882	,265	-,414	,945	,880	-,879	,900	-,168	,596	,602	,040	,544	-,132	,340	,825	1

PC: Pearson Correlation, ÜA: Üreaz Enzim Aktivitesi, AF: Alkali Fosfataz Enzim Aktivitesi, BG: β -Glikosidaz Enzim Aktivitesi, DA: Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi, NA: Nitrifikasyon Aktivitesi, DeA: Denitrifikasyon Aktivitesi, MB: Mezofilik Bakteri Sayısı, NB: Nitrifikasyon Bakteri Sayısı, DB: Denitrifikasyon Bakteri Sayısı, NH₄: Değişebilir Amonyum, NO₃: Değişebilir Nitrat, NO₂: Değişebilir Nitrit, N: Azot, P: Fosfor, K: Potasyum, Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, Fe: Demir, Cu: Bakır, Zn: Çinko, Mn: Mangan, *%5 düzeyinde önemlidir.

**%1 düzeyinde önemlidir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, marulda 4 farklı uygulama grubu toprağı kùltürden bağımsız teknikler ile incelenmiştir. Topraklardan ve kullanılan organik gübrelerden DNA izolasyonu yapılmış ve PZR aracılığı ile RFLP analizine tabi tutularak çeşitlilik belirlenmeye çalışılmıştır. Klonlama tekniğı ile fonksiyonel genleri içeren klonlardan elde edilen dizilerin filogenetik analizleri vasıtasıyla topluluk yapısı belirlenmeye çalışılmıştır.

5.1. Amonyum Okside Edici Bakteri Topluluk Yapısı

Birinci yetiştiricilik dönemi normal toprağı aít filogenetik ağaçda (Şekil 4.4), çiftlik gübresinden elde edilen AC17 klonları *Nitrosospira* gruplarına yakın dallanmalar yapmış olduğı tespit edilmiş. Yine aynı şekilde vermikompost uygulaması olan AC2 klonu da yakınlık göstermiş, bu durum değerlendirildiğinde organik uygulamalardan ve gübrelerden gelen türlerin birbirlerine yakın türler olabileceğı akla gelmektedir. Yine farklı bir gruplaşma da AC17 (Çiftlik gübresi) ve AC18 (Vermikompost) klonlarının *Nitrosomonas* grubuna yakın dallandığı görülmüştür. Bi vd. (2022) yaptıkları bir çalışmada, organik gübre uygulamasının, *Nitrosospira*' ya göre *Nitrosomonas* bolluğunu arttırdığını tespit etmişlerdir. İkinci yetiştiricilik dönemi normal toprağı aít filogenetik ağaçda (Şekil 4.5) da aynı durum görülmüş, vermikompost ve çiftlik gübresinden elde edilen klonlar *Nitrosomonas* grubuyla dal oluşturmışlar diğer klonlar ise *Nitrosospira* grubuna daha yakın dallanmışlardır. Burada çok bariz bir şekilde kontrol grubuna aít AC9 ve vermikompost uygulamasından elde edilen AC10 klonlarının genel olarak bir arada ve genetik olarak çok benzediğı görülmüş ve AC10 vermikompost gübrelemesinden gelen klonun ayrı bir dallanma ile organik gübrelerden (çiftlik gübresi, vermikompost) elde edilen AC17 ve AC18 klonlarına yakın dallandığı ve organik gübre uygulamalarından elde edilen klonlar ile benzer bakteri gruplarına sahip olduğı sonucunu çıkarabiliriz. Birinci dönem ve ikinci dönem normal topraklar karşılaştırıldığında birinci dönemde kontrol grubu ile çiftlik gübresi uygulanmış topraktan elde edilmiş klonlar yakın dallanmışken ikinci dönemde bu durum değişmiş ve kontrol toprağından elde edilen klonlara yakın dallanan uygulama grubu vermikompost olmuştur. Bu dönemsel olarak topluluk yapısı üzerinde değişimler olduğunu göstermektedir. Birinci yetiştiricilik dönemi rizosfer toprağına aít filogenetik ağacı (Şekil 4.6) incelediğimizde normal döneme göre yeni ve farklı gruplar oluştuğı görülmüştür. Kimyasal gübre uygulamasına aít AC8 klonunun genel olarak tek başına dal oluşturduğı görülmüş, tanımlı bir grup olan *Nitrosospira* sp. *Nsp17* ve tanımlanamamış bakteri ile ayrı bir dal oluşturduğı görülmüştür. Bilindiğı üzere kimyasal gübreler toprak pH'ını düşürmektedir. Bi vd. (2022)'a göre *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* gruplarına göre daha yüksek nitrifikasyon aktivitesine sahiptir fakat *Nitrosomonas* çevresel strese karşı *Nitrosospira* grubuna göre daha dirençli olabilir. French vd. (2012)'nin yaptığı bir çalışmada ise kontrol toprağında *Nitrosomonas* cinsi bakteriler hakimken uygulanan kimyasal gübre ile toprak pH'ı düştükçe yerine *Nitrosospira* grubu baskın hale gelmiştir. Bu durumda kimyasal gübre uygulamasının etkisiyle *Nitrosospira* grubuna yakın dallanma olabileceğı düşünülmüştür. İkinci yetiştiricilik dönemi rizosfer toprağına aít filogenetik ağaçda (Şekil 4.7) görüldüğü üzere klonlar çok daha farklı dallar oluşturmışlardır. Vermikompost, çiftlik gübresi ve kimyasal gübre uygulamalarından elde edilen AC14, AC15, AC16 klonlarının bir arada olduğı *Nitrosospira* sp. ve *Nitrosococcus oceani* grupları dikkat çekmiştir. *Nitrosospira* grubunun betaproteobacteria grubunda, *Nitrococcus oceani* grubunun

gammaproteobacteria grubunda yer alması ve vermikompost ve çiftlik gübresi uygulamalarından elde edilmiş klonlarla dal oluşturmaları organik gübrelerin topluluk yapılarının çeşitliliğini göstermektedir. Head vd. (1993) yaptıkları çalışmada *Nitrosococcus* grubunun AOB'de görev aldığını ve proteobacteria grubuna ait olduklarını bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada *Nitrosococcus* cinsinin iki türünün proteobacteria gamma alt grubuna ait olduğunu, şimdiye kadar karakterize edilen AOB grubunda yer alan *Nitrospira* ve *Nitrosomonas* cinslerine ait türlerin ve *Nitrosococcus* cinsinin bir türünün betaproteobacteria grubuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. AC14, AC15 ve AC16 klonlarının bulunduğu bu dala birinci dönemde sadece vermikompost ve çiftlik gübresinden elde edilmiş klonlar yakinken, ikinci dönemde vermikompost ve çiftlik gübresi uygulamalarından elde edilen klonlar yakın dal oluşturmuşlardır. Bu dallanma değerlendirildiğinde dönemsel farklılıkların organik gübre uygulanmış topraklarda topluluk değişimine yol açtığı sonucu çıkarılabilir. Normal ve rizosfer toprakları ele alındığında ise kontrol toprağında çeşitliliğin düşük olması fakat rizosfer toprağında çeşitliliğin artmış olması dikkat çekmektedir. Bunun sebebinin ortam pH'ının farklı oluşu ve mevcut kök salgılarının rizosfer ortamını zenginleştirilmesi, bakteri sayısının burada fazla bulunması, uygulanan gübrelerin burada daha kolay ve hızlı şekilde mineralize olarak ortama sunulması olarak düşünülebilir.

AOB genel olarak, 16S rDNA ve *amoA* gen dizilerine göre en az 7 alt gruba ayrılmıştır [*Nitrospira*, alt grup 1-4; *Nitrosomonas*, alt grup 5-7] ve 2., 3. ve 4. alt grupta bulunan *Nitrospira* türlerinin toprakta baskın olduğu görülmüştür (Stephen vd. 1996; Prosser ve Embley 2002; Hayatsu vd. 2008). Ancak çeşitli araştırmalar sonucu elde edilen, bu alt gruplara ait oldukları değerlendirilen ve kültüre alınmış olan bu organizmaların çoğunun tam tanımlamaları yapılmadığından dolayı sadece cins ve suş adı ile birlikte anılmaktadırlar. Örneğin alt grup 2'de yer alan *Nitrospira sp.* NpAV (AF016003) ya da alt grup 4'de yer alan *Nitrospira sp.* 40KI bu duruma örnek verilebilir. Bu alt gruplar içerisinde üyeleri en çok çalışılmış olan alt grup ise alt grup 3'dür. *Nitrospira multiformis*, *Nitrospira tenuis* ve *Nitrospira briensis* bu grupta yer almaktadır. Yapılan moleküler ekolojik analizlere göre, genel olarak, *Nitrospira* alt grup 2 türlerinin asit topraklarda *Nitrospira* alt grup 3 türlerine göre sayıca daha fazla bulunduğu ve *Nitrospira* alt grup 3 ün genel olarak nötr topraklarda dominant durumda olduğu rapor edilmiştir (Prosser ve Embley 2002; Hayatsu vd. 2008; Junier vd. 2010). Denemenin yürütüldüğü toprak pH açısından nötr ve nötre yakın değerlere sahiptir. Elde edilen filogenetik analizlerde kullanılan *amoA* klonlarının ve bunlara en yakın tanımlanmış bakteri dizilerinin de büyük çoğunluğu *Nitrospira* alt grup 3'e ait dizilerdir. Dolayısıyla çalışmada elde edilen filogenetik veriler önceki çalışmaları destekler mahiyettedir. Kowalchuk vd. (2000) yaptıkları çalışmada *Nitrospira* alt grup 3'e ait türlerin nispeten yüksek amonyum konsantrasyonlarına sahip topraklardaki amonyum oksidasyonundan sorumlu olduğunu bulmuşlardır. Bruns vd. (1999) gübrelenmiş topraklarda *Nitrospira* alt grup 3 türlerinin sayılarının oransal olarak daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez kapsamında yapılan analizler doğrudan AOB alt grupların oransal sayılarını belirlemeye yönelik değildir. Ancak elde edilen klonların büyük bir kısmının *Nitrospira* alt grup 3'e benzer olmasından hareketle dolaylı bir çıkarım yapmak mümkündür. Bununla birlikte, tarla denemesinde herhangi bir gübreleme yapılmayan kontrol uygulamasından elde edilen klonlar da genel olarak *Nitrospira* alt grup 3'e benzer çıkmıştır. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen veriler Bruns vd. (1999)'ni destekler mahiyette değildir. Nitekim Avrahami vd. (2002) ve Schmidt vd.

(2007), düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda gübre uygulamalarına rağmen topraklarda *Nitrosospira* alt grup 3'ün dominant olmaya devam ettiğini gözlemlemişlerdir. Hastings vd. (1997) tarafından domuz gübresi ile yapılan bir çalışmada, gübre uygulanan ve uygulanmayan topraklarda *Nitrosospira* türleri tespit edilmiş iken *Nitrososomonas* türlerine sadece yüksek miktarda gübre uygulanmış topraklarda rastlanmıştır. Çalışmamız kapsamında topraklardan elde edilen klonlar *Nitrosospira* türlerine yakın olmuştur. Ancak sadece vermikompost ve çiftlik gübresinden elde edilen klonların bazıları *Nitrosomonas* türlerine benzer çıkmış ve filogenetik ağaçta belirgin olarak ayrı bir grup içinde yer almışlardır. Burdan yola çıkarak organik gübre uygulamalarının toprakta bakteri çeşitliliğini arttırdığı düşünülebilir. Fakat kimyasal gübre uygulamasının çeşitliliğe katkısı olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya uyumlu olarak He vd. (2008) yaptığı çalışmada organik gübre uygulamalarının bakteri çeşitliliğini artırırken, kimyasal gübre uygulamalarının toprak bakteri topluluk yapısı ve çeşitliliği üzerinde daha az etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu açıdan bakıldığında bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bahsedilen çalışma ile uyumlu olmuştur.

AmoA geni ile toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkilere bakıldığında birinci dönem normal toprakta (Çizelge 4.12) *amoA* ve nitrifikasyon bakteri sayısı arasında önemli düzeyde pozitif korelasyon görülmüştür. Aynı toprağın ikinci döneminde de istatistiksel olarak önemli fark görülmemiştir. Fakat 2. dönem rizosfer toprağında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Bu duruma rizosferdeki baskın grubun dönemsel değişiminin sebep olabileceği düşünülmüş bunun yanı sıra toprak pH'ının da etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. AOB topluluk yapısının, pH ve azot uygulamalarından etkilendiği bildirilmiştir (Avrahami vd. 2003 ; Kowalchuk ve Stephen 2001). Bunu destekler nitelikte amonyum oksidasyonunu kısıtlayan faktörlerden birisi toprak pH'ıdır ve AOB'in 6'nın altındaki pH değerlerinde gelişemediği bildirilmiştir (Allison ve Prosser 1991; Allison ve Prosser 1993). Buna rağmen asit topraklarda amonyum oksidasyonunun olduğu gözlenmiştir (Nicol vd. 2008). Hayatsu vd. (2017) asidik bir tarım toprağından izole edilen bir AOB suşunun pH 5-7,5 arasında gelişebildiğini ve yüksek asitli koşullarda (pH 2) hayatta kalabildiğini göstermişlerdir. Daha yakın zamanlarda, asidik bir orman toprağında ototrofik amonyum oksidasyonunun *Nitrosospira* 3a.2 alt grubu tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. (Huang ve diğerleri, 2018). Rizosfer toprağına pH'ının daha asidik olduğu düşünüldüğünde rizosfer toprağı ve *amoA* arasında bulunan negatif ilişki, Hayatsu vd. (2017) ve Huang vd. (2018)'nin yaptığı çalışmalarla örtüşmemektedir. Patriquin vd. (1993), inceledikleri toprak örneklerine ait bazı kimyasal değerler arasındaki ilişkide nitrat konsantrasyonu ve EC değerleri arasında pozitif korelasyon ve yine nitrat ile pH arasında negatif korelasyon olduğunu rapor etmiştir. Birinci dönem rizosfer toprağına ait korelasyon tablosuna (Çizelge 4.14) bakıldığında ise *amoA* ve pH arasında önemli seviyede negatif etki gözlenmiş bunun sebebinin yine yukarıda bahsedildiği gibi rizosfer toprağındaki pH düşüklüğünün sebep olabileceği düşünülmüştür. İkinci dönem normal toprağına ait korelasyon tablosu (Çizelge 4.13) ise N ile *amoA* arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişken aynı toprağın birinci döneminde negatif bir ilişki oluşmuştur. Rizosfer toprağına ait birinci dönemine ait korelasyon tablosunda (Çizelge 4.14) ise azot ve *amoA* arasında negatif bir ilişki varken ikinci dönem rizosfer toprağında pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür. Vejan vd. (2021), azot ile ilgili çalışmalarında, uygulanan N gübresinin hızlı ayrışmasının, kısa sürede nitrifikasyon işleminin bir substrat olarak amonyağı büyük ölçüde arttırabildiğini, bununla birlikte organik gübrelerin amonyağı yavaş ve sürekli olarak serbest bıraktığını

bildirmişlerdir. Bu bilgilerden yola çıkarak ikinci dönemde bu yüzden N artışı olabileceği sonucuna varılabilmektedir. İkinci dönem rizosfer toprağında *amoA* ve mezofilik bakteri sayısı arasında önemli seviyede negatif ilişki olduğu gözlenmiş ve bu dönemde bakteri sayısında pH kaynaklı bir azalmanın olabileceği düşünülmüştür (Çizelge 4.15). Yine aynı topraklarda *amoA* ve denitrifikasyon bakteri sayıları arasında da önemli derecede negatif korelasyon olduğu görülmüş ve bunun sebebinin de AOB'nin sayısındaki artışa neden olan proseslere bağlı olarak denitrifikasyon bakteri sayısının düşmesi olabileceği sonucuna varılmıştır. Çizelge 4.12'de üreaz aktivitesi ve *amoA* arasında negatif korelasyon görülmekte fakat aynı toprağın ikinci döneminde ve rizosfer toprağının birinci ve ikinci döneminde istatistiksel olarak önemli derecede bir fark görülmemiştir. Bunun sebebinin birinci dönem normal toprakta henüz ortama gübreler ile yerleşen bakterilerin enzim üretiminin kısıtlı olması ile alakalı olabileceği düşünülmüştür. Aynı dönemin rizosfer toprağında istatistiksel açıdan önemli derecede ilişki olmaması ise rizosfer bölgesinin bakteri ve besince zengin olması sebebiyle bu enzimin üretiminin daha fazla olabileceği ile açıklanabilir. Birinci ve ikinci dönem rizosfer toprağında istatistiksel açıdan önemli korelasyon olmaması da yine aynı sebep ile açıklanabilir ve 2. dönemde organik gübrelerin ortama sundukları bakterilerin popülasyonunda artış ve azalışlarla pozitif korelasyon görülebilir. Ayrıca üreaz toprakta birçok bitki, mantar ve bakteri tarafından üretilebilir ve üreaz mikrobiyal hücreler öldüğünde hücre dışı bir enzim olarak toprağa salınır ve böylece üreaz aktivitesi artar Fisher vd. (2017) ; Pinto-Vilar ve Ikuma, (2021). Aynı şekilde değişebilir NO_3^- 'e bakıldığında normal toprak ve rizosfer topraklarının birinci dönemlerinde *amoA* ile aralarında istatistiksel açıdan önemli fark yokken, ikinci dönemlerde negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Chun vd. (2023) yaptıkları çalışmada *amoA* geni ile üreaz, proteaz, amonyak oksidaz aktiviteleri, NO_3^- , N konsantrasyonu ve MBN içeriği arasında önemli ölçüde pozitif korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma, nitrat ile *amoA* arasında bulduğumuz negatif korelasyon ile uyumludur.

5.2. Denitrifikasyon Bakteri Topluluk Yapısı

Yapılan ön çalışmalar sırasında, normalde kullanılması planlanan ve denitrifikasyon bakterilerinde *nirK* genini hedefleyen PZR primer setinin bazı toprak örneklerinde PZR ürünü üretmediği görülmüştür. Bunun üzerine, yapılan bu tür çalışmalarda en fazla kullanılan diğer iki PZR primer seti test edilmiş ve tüm toprak örneklerinde PZR ürünü veren ve Wei vd. (2015) tarafından dizayn edilen primer setinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu araştırmacılar, tanımlanmış bakterilere ait *nirK* dizilerini analiz ederek denitrifikasyon bakterilerinin çeşitliliğinin bilinenden daha yüksek olduğunu belirlemişler ve denitrifikasyon bakterilerini 4 alt gruba ayırmışlar, her alt grup için ayrı primer setleri dizayn etmişlerdir. Daha önceden dizayn edilen ve kullanılagelen primerlerin de genel olarak alt grup 1'i hedeflediğini bildirmişlerdir. Bunun bir sonucu olarak kullanılmasına karar verilen primer seti bu yeni sınıflamaya göre alt grup 1'i hedeflemektedir. Bu primer seti çalışmada elde edilen tüm toprak örnekleri ve vermikompost gübresinde PZR ürünü oluşturmuş ama çiftlik gübresinde herhangi bir ürün vermemiştir. Bu durum çiftlik gübresinin *nirK* topluluk yapısının diğer örneklerden daha farklı olduğu anlamına gelmektedir. Bu çalışmada zamana ve toprak örneğinin kaynağına bağlı olarak *nirK* yapısında değişimler olduğu görülmekle birlikte bu değişimlerin hangi etmenlerce etkilendiği tam açık değildir. Bu konuda uluslararası literatürde de birbiriyle çelişen çalışmalar bulunmaktadır (Philippot vd. 2002; Henry vd.

2008; Kandeler vd. 2009; Bru vd. 2011; Rasche vd. 2011; Yu vd. 2014). Denitrifikasyon bir anaerobik solunum olayı olmasına rağmen bazı türlerin oksijenli koşullarda da bu işlemi yapabildiği bildirilmiştir (Patureau vd. 2000; Hayatsu vd. 2008).

Birinci dönem normal toprağa ait filogenetik ağaçda (Şekil 4.8) görüldüğü üzere vermikompost uygulanmış topraktan elde edilen klonlar ve vermikompost gübresinden elde edilen klonlar birbirine yakın *Sinorhizobium* grubuyla dallanmışken kontrol grubu ve kimyasal gübre uygulanmış topraktan elde edilen klonlar ise ayrı bir gruplaşma göstermişlerdir. Fakat vermikompost gübresinden elde edilen NC18 klonu ve çiftlik gübresi uygulanmış topraktan elde edilen NC3 klonları gammaproteobacteria grubunun bir üyesi olan *Aureimonas sp.* ile aynı dalda bulunmuştur. Gammaproteobacteria grubunda yer alan *Achromobacter xylosoxidans A8* ve betaproteobacteria grubunda yer alan *Pseudomonas xanthosomae nirK* klonları ile yakın dallar yapmışlardır. Ayrıca kontrol grubu klonu NC1, *Paracoccus* grubu ile dallanmıştır. Bu dallanmalar değerlendirildiğinde uygulanan çiftlik gübresi ve vermikompost gübrelerinde farklı gruplara üye çeşitli bakterilerin yetiştirme ortamına sunulduğu görülmüştür. Bunun yanında çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC3 klonlarının *Nitrospira* gruplarıyla dal oluşturduğu görülmüştür. Buradan anlaşılabileceği üzere betaproteobacteria grubu denitrifikasyonda da rol oynamaktadır. Koops vd. (2006) yaptıkları çalışmada karasal ekosistemlerde en fazla bulunan AOB cinsi olan *Nitrospira* grubunda hiçbir *nirK* gen dizisi tespit edememişlerdir. Fakat yaptığımız çalışmada çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen NC3 klonlarının *Nitrospira* gruplarıyla yakın dal oluşturması bu çalışmayla ters düşmektedir. Jason vd. (2006) yaptığı çalışmada ise bu tez kapsamında elde edilen sonuçları destekler nitelikte *Nitrosomonas* ve *Nitrospira* gruplarında *nirK* geni tespit etmişlerdir. İkinci dönem normal toprağa ait filogenetik ağaçda (Şekil 4.9) ise vermikompost uygulaması ve vermikompost gübresinden elde edilen klonların Alphaproteobacteria grubu ile yakın dal oluşturduğu görülmüştür. Genel olarak kontrol grubu ve kimyasal gübre uygulamasından elde edilen klonların kendi aralarında gruplaştığı, organik gübre uygulamalarından elde edilen klonların kendi aralarında dal oluşturduğu görülmüştür. İkinci dönem normal toprakta diğer önemli görülen dallanma ise çiftlik ve kimyasal gübre uygulamalarından elde edilen NC11 ve NC12 klonlarının betaproteobacteria grubuna ait *Achromobacter* ile yakın grup oluşturmasıdır. Burdan anlaşıldığı üzere çiftlik gübresi uygulanan topraklardaki topluluk yapısının her iki dönemde betaproteobacteria grubuna yakın dallanması çiftlik gübresinde bulunan bakteri gruplarının betaproteobacteria grubuna dahil olabileceğini göstermiştir. Bu düşüncüyü destekler nitelikte Kowalchuk vd. (1999)'nin çiftlik gübresi ile yaptıkları bir çalışmada betaproteobacteria grubuna ait nitrit okside edici bakterilere ait diziler tespit etmişlerdir. Birinci dönem rizosfer toprağına ait filogenetik ağaca bakıldığında ise (Şekil 4.10) vermikompost uygulamalarından elde edilen NC6 klonunun gammaproteobacteria grubuna ait *Aureimonas sp.* bakteri dizisine yakınlığı önemli bir detay olarak görülmüştür. Yine çiftlik gübresi uygulamasına ait NC7-11 klonunun betaproteobacteria grubu üyesi *Achromobacter* ile yakın dal oluşturması, çiftlik gübresinde bulunan bakteri topluluğunda betaproteobacteria grubuna ait organizmaların da bulunabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda *Nitrospira* grubu ile vermikompost gübresinden elde edilen NC6 klonunun dal oluşturması bu durumun yalnızca çiftlik gübresine özgü olmadığını da göstermiştir. İkinci dönem rizosfer toprağına ait filogenetik ağaçda (Şekil 4.11) ise genel olarak birbirinden daha uzak ve farklı dallanmalar tespit edilmiştir. Bu dönem farklı olarak vermikompost uygulamasından elde edilen NC14 ve kimyasal gübre

uygulamasından gelen NC16 klonunun betaproteobacter grubunun alt türü *Achromobacter*'e olan yakınlıkları tespit edilmiştir. Buradan anlaşılabileceği üzere normal toprakta çiftlik gübresi betaproteobacteria grubuna yakın topluluk yapısına sahipken rizosfer toprağında da aynı durum vermikomposttan elde edilen topluluk yapısı için söylenebilir. Bu dönemde yine vermikompost gübresinden elde edilen NC18 klonunun gammaproteobacteria grubunda bulunan *Aurimonas* bakteri dizisine benzerlik göstermesi dikkat çekicidir. Fakat ikinci dönem rizosfer toprağında *Nitrospira* grubuna yakın herhangi bir klon bulunamamıştır. Genel olarak bakıldığında denitrifikasyon bakterileri oldukça farklı gruplara sahiptir. Bunun yanı sıra vermikompost ve çiftlik gübresi uygulamalarından elde edilmiş klonlara yakın dallanan tanımlı dizilerin diğer uygulamalardan elde edilmiş klon dizilerine göre daha farklı gruplarla yakın grup oluşturdukları göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmada elde edilene benzer olarak gösterilecek bir çalışma ise; Yin vd. (2015) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, organik gübre uygulamasının, nirK denitrifikasyon bakteri topluluk yapısına net bir etkisinin olduğunu, ancak inorganik gübrelemenin ayırt edilebilir bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Aerobik denitrifikasyon işlemi yapan bakteri gruplarından biri *Paracoccus* türleridir. Çalışmamız kapsamında *Paracoccus* ile benzerlik gösteren nirK klonları elde edilmiş olup bunların zaman ve uygulamaya bağlı olarak değişebileceği görülmüştür. Birinci dönem normal toprakta kontrol, vermikompost ve kimyasal gübre uygulamalarından elde edilen bazı klonlar *Paracoccus* ile çok belirgin bir grup oluşturmuş iken birinci dönem rizosfer toprağı ve ikinci dönem hem normal hem rizosfer toprağında sadece çiftlik gübresinden elde edilen klonlar *Paracoccus* ile gruplaşmıştır. Dikkat çeken diğer bir bakteri grubu ise denitrifikasyon yapabilen AOB türleridir. Denitrifikasyon kabiliyetinin betaproteobacteria grubuna üye AOB türleri arasında yaygın bir özellik olduğu düşünülmektedir (Baggs 2011). Çalışmamız kapsamında birinci dönem normal toprakta çiftlik gübresi uygulamasından elde edilen bazı klonlar ve birinci dönem rizosfer toprağında sadece vermikompost uygulamasına ait bir klon AOB gruplarının içinde yer alan *Nitrospira* ile benzerlik göstermiş ve filogenetik ağaçlarda birlikte yer almışlardır. İkinci dönem de ise bu bakteriye benzerlik gösteren herhangi bir klon tespit edilememiştir. Bu durum, bu bakteri gruplarının da zaman içerisinde uygulamaya bağlı olarak toprakta değişebildiğini göstermektedir. Toplam 140 nirK gen dizisi ile yapılan bu çalışmada nirK denitrifikasyon bakterilerinin *Hyphomicrobiales* grupları başta olmak üzere *Burkholderiales*, *Rhodobacterales* ve *Nitrosomonadales* gibi birçok grup ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Fakat Yin vd. (2015) yaptığı çalışmada nirK gen gruplarının çoğunlukla *Rhizobiales* ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Genel olarak bakıldığında klonların en çok gruplaştığı taksonomik grubun alphaproteobacteria olduğu bunun yanı sıra betaproteobacteria ve gammaproteobacteria grupları ile de grup oluşturdukları anlaşılmıştır. Bu çalışmayı destekler nitelikte Tang vd. (2023) nirK tipi denitrifikasyon bakterilerinde, baskın bakteri sınıfının %9.3 ila %75.1 arasında değişen oranlarda alphaproteobacteria olduğunu tespit etmişlerdir. Yin vd. (2015) tarafından rapor edilen sonuçlar da bunu destekler niteliktedir. Bu çalışma ile denitrifikasyon kabiliyetine sahip bakterilerin nitrifikasyon yapan bakterilerden daha fazla çeşide sahip olduğu da tespit edilmiştir. Sonuçlarımız denitrifikasyon bakterilerinin taksonomik olarak çok çeşitli olduğunu belirten çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Knowles vd. 1982; Tiedje vd. 1988; Zumft vd. 1997).

NirK geni ile toprakta ölçülen parametreler arasındaki ilişkilere bakıldığında, ikinci dönem normal toprağa ait korelasyon tablosunda (Çizelge 4.13) nitrifikasyon aktivitesinin *nirK* ile aralarında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Toprağın ikinci dönem örneği olması, nitrifikasyon aktivitesi sonucu oluşan nitratın, denitrifikasyon için pozitif etki yapmasında etkili olmuş olabilir. Çizelge 4.13.'de amonyum ve *nirK* arasında pozitif ilişki oluşmuştur. Toprağın ikinci döneminde amonyum oksidasyonunun ara ürünü olan asitin pH'ı düşürmesi ile nitrifikasyonun durmuş olabileceği ve amonyumun birikebileceği düşünülmüştür. Nitrifikasyonun durması ile denitrifikasyonun artmış olabileceği düşünülmüştür. Fakat birinci dönem rizosfer toprağına ait korelasyon tablosunda (Çizelge 4.14) aralarında negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra NO_3^- ile *nirK* arasında tüm topraklar ve dönemlerde negatif korelasyon görülmüştür. Azot ile *nirK* arasında ise yalnızca ikinci dönemde negatif korelasyon görülmüştür. Buna benzer bir sonucu, Chun vd. (2023) *nirS* ve *nirK* gen bollukları, nitrat redüktaz aktivitesi ve NH_4^+ ile pozitif korelasyona sahipken, N konsantrasyonu ve NO_3^- konsantrasyonu ile negatif korelasyona sahip olduğunu rapor etmişlerdir. İkinci dönem rizosfer toprağına ait korelasyon tablosuna (Çizelge 4.15) bakıldığında ise *amoA* ve *nirK* arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. İkinci dönem rizosfer toprağında zamana bağlı olarak nitrifikasyon sonucu oluşan ürünlerin denitrifikasyon için yarar sağlaması ile pozitif ilişki olabileceği düşünülmüştür. Fakat denitrifikasyon bakterilerinin *nirK* ile aralarında istatistiksel olarak önemli derecede negatif ilişki olması düşünmemize sebep olmuştur. Ortamda oksijen varlığının olması da buna sebep olmuş ve denitrifikasyon bakterilerinin engellenmesine sebep olmuş olabilir. Fakat denitrifikasyonu sadece denitrifikasyon bakterilerinin yapmadığını destekleyen çalışmaların olması sebebi ile buna örnek olarak verilebilecek bir çalışma mevcuttur ve denitrifikasyon kabiliyetinin betaproteobacteria grubuna üye AOB türleri arasında yaygın bir özellik olduğu düşünülmektedir (Baggs 2011). Aynı zamanda oksijenli denitrifikasyon yapan *Paracoccus* türünde toprakta var olduğu bilindiğinden bu sonuç normal bulunmuştur. Aynı tabloda N ile aralarında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Genel olarak tüm dönemlere ve topraklara bakıldığında P ve *nirK* gen çeşitliliği arasında istatistiksel olarak önemli korelasyon olmadığı tespit edilmiştir. Fosforun mikroorganizmalar için hayati bir bileşen olduğu göz önüne alındığında He vd. (2008), Yin vd. (2012) Bättard vd. (2010) yaptıkları çalışmalarda da aynı sonucu bulmuşlardır. Bunu destekler nitelikte Enwall vd. (2010), O vd. (2008) Fosfor ile *nirK* denitrifikasyon bakteri topluluğu arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır.

6. SONUÇLAR

Yapılan moleküler analizler sonunda elde edilen filogenetik veriler, *amoA* ve *nirK* genleri bağlamında, amonyum okside eden bakteri ve denitrifikasyon bakteri topluluk yapısında zaman ve uygulamalara bağlı olarak değişimler olduğunu göstermiştir. Özellikle amonyum okside eden bakterilere ait değişimler filogenetik ağaç üzerinde daha rahatlıkla izlenebilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmaya ait topraklarda *Nitrosospira* alt grup 3 ün baskın olduğu ve uygulamalar sonunda oluşan değişimlerin de genel olarak bu grup içinde olduğu görülmüştür. Ayrıca çiftlik gübresi ve vermikompost gübresinin genel olarak benzer gruplarla dallandığı ve bu gübrelerin *amoA* içeren AOB çeşitliliğini arttırdığı görülmüştür. Organik gübre uygulamalarının *Nitrosomonas* grupları ile dallanmaları diğer uygulamadan farklı AOB gruplarını toprağa sunduklarını ve çeşitliliği arttırdıkları tespit edilmiştir. Kimyasal gübre uygulamasının, organik gübre uygulamalarına göre çeşitliliğe etkisinin daha az olduğu görülmüştür. Elde edilen *amoA* klonlarının genellikle betaproteobacteria ve gammaproteobacteria gruplarından olması yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca, aerobik denitrifikasyon yapabilen bakterilere ve denitrifikasyon yapabilen amonyum okside eden bakterilere benzer klonların tespit edilip bunların değişimlerinin izlenebilmesi de önemlidir. Bu çalışmaya ait topraklarda denitrifikasyondan sorumlu bakterilerin genelde alt grup 1 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca organik gübre uygulanan topraklardan elde edilen bazı klon dizilerinin AOB grubu *Nitrosospira* bakteri sekanslarına benzer olduğu tespit edilmiştir. Genelde amonyum oksidasyonundan sorumlu betaproteobacteria grubunun, denitrifikasyondan sorumlu *nirK* geni içeren klonlarla da benzer dizilere sahip olduğu görülmüştür. Vermikompost gübresinden elde edilen klonların farklı grupları içermesi, bu gübrenin toprakta bakteri çeşitliliğine önemli katkılar sağlayabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında *Paracoccus* ile benzerlik gösteren *nirK* klonları elde edilmiş olup bunların zaman ve uygulamaya bağlı olarak değişebileceği görülmüştür. Elde edilen filogenetik veriler bilimsel literatürde daha önce yapılmış çalışmalarla uyumluluk göstermiştir. Bununla birlikte, bu değişimlerin, çalışma kapsamında takip edilen diğer biyolojik ve kimyasal parametrelerle ilişkisi tam açık olmamıştır. Ancak, dönemlere göre farklılık göstermekle birlikte amonyum okside eden bakteri popülasyonunun nitrifikasyon bakteri sayısı ve toplam N ile olumlu etkileşim içinde olduğu, denitrifikasyon bakteri popülasyonunun ise nitrifikasyon aktivitesi, amonyum ve toplam N ile olumlu etkileşim içinde olduğu söylenebilir. Ayrıca *amoA* genleri üzerinde pH' ın etkili olduğu da görülmüştür. Yapılan bu çalışmada elde edilen en önemli sonuç organik gübrelerin özellikle vermikompost gübresinin topluluk yapısı ve çeşitliliğine önemli etkileri olduğudur.

7. KAYNAKLAR

- Ahn, J. H., Choi, M. Y., Kim, B. Y., Lee, J. S., Song, J., Kim, G. Y., & Weon, H. Y. (2014). Effects of water-saving irrigation on emissions of greenhouse gases and prokaryotic communities in rice paddy soil. *Microbial Ecology*, 68(2), 271-283.
- Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X., He, P., & Zhou, W. (2013). Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 30-42.
- Akiyama, H., Morimoto, S., Tago, K., Hoshino, Y. T., Nagaoka, K., Yamasaki, M., ... & Hayatsu, M. (2014). Relationships between ammonia oxidizers and N₂O and CH₄ fluxes in agricultural fields with different soil types. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(4), 520-529.
- Allison, S.M. and Prosser, J.I. 1991. "Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils", *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 45-51.
- Allison, S.M. and Prosser, J.I. 1993. "Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria", *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 935-941
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. "Basic local alignment search tool", *Journal Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Aparna, K., Pasha, M. A., Rao, D. L. N., & Krishnaraj, P. U. (2014). Organic amendments as ecosystem engineers: microbial, biochemical and genomic evidence of soil health improvement in a tropical arid zone field site. *Ecological Engineering*, 71, 268-277.
- Avrahami, S., Conrad, R. and Braker, G. 2002. "Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers", *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5685-5692.
- Bedard C, Knowles R (1989) Physiology, Biochemistry and Specific Inhibitors of CH₄, NH₄ and CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiological Review* 53, 68-84.
- Bergmann, D. J., Hooper, A. B., & Klotz, M. G. (2005). Structure and sequence conservation of hao cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: evidence for their evolutionary history. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5371-5382.
- Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: processes. *Players, and Human*.
- Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B.B. and Witzel, K.P. 2000. "Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments", *FEMS Microbiological Review*, 24, 673-690.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. and Tiedje, J.M. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5); 2096-2104.

- Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P.A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arouays, D. and Philippot, L. 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *The ISME Journal*, 5(3); 532-542.
- Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I. and Paul, E.A. 1999. "Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils", *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2994-3000.
- C., Fan, F., Song, A. ve ark. Farklı gübreleme rejimleri altındaki denitrifikasyon potansiyeli, siyah bir toprakta denitrifikasyon topluluğundaki değişikliklerle yakından bağlantılıdır. *Applied Microbiological Biotechnology* **99** , 5719–5729 (2015).
- Cabello, P., Roldan, M. D., & Moreno-Vivian, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*, 150(11), 3527-3546.
- Calvo, L. and Garcia-Gil, L.J. 2004. "Use of amoB as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria" *Journal of Microbiological Methods*, 57, 69-78.
- Castro, H., Newman, S., Reddy, K.R. and Ogram, A. 2005. "Distribution and stability of sulfate-reducing prokaryotic and hydrogenotrophic methanogenic assemblages in nutrient-impacted regions of the Florida Everglades", *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2695-2704
- Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Hristova, K., & Scow, K. M. (2008). Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 13-18.
- Cavigelli, M.A. and Robertson, G.P. 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology*, 81(5); 1402-1414.
- Chan, Y. K., McCormick, W. A., & Ma, B. L. (2013). Effects of inorganic fertilizer and manure on soil archaeal abundance at two experimental farms during three consecutive rotation-cropping seasons. *Applied Soil Ecology*, 68, 26-35.
- Chen, X., Wei, H., & Zhang, J. (2021). Nitrogen and Sulfur Additions Improved the Diversity of *nirK*- and *nirS*-Type Denitrifying Bacterial Communities of Farmland Soil. *Biology*, 10(11), 1191. <https://doi.org/10.3390/biology10111191>
- Chen, X.L., Wang, Y.F., Li, W.Q., Wang, Y., Wei, D., Wang, X.J. and Han, X.Z. 2015. "Impact of long-term continuous soybean cropping on ammonia oxidizing bacteria communities in the rhizosphere of soybean in Northeast China", *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 65, 470-478.
- Chen, Y., Xu, Z., Hu, H., Hu, Y., Hao, Z., Jiang, Y., & Chen, B. (2013). Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia. *Applied Soil Ecology*, 68, 36-45.
- Chen, Z., Ma, J., Liu, Y., Zhao, J., Ma, J., Yu, Q., ... & Wang, Q. (2023). Differential responses of soil *nirS*- and *nirK*-type denitrifying microbial communities to long-term application of biogas slurry in a paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 182, 104711.

- Chinnadurai, C., Gopalaswamy, G., & Balachandar, D. (2014). Long term effects of nutrient management regimes on abundance of bacterial genes and soil biochemical processes for fertility sustainability in a semi-arid tropical Alfisol. *Geoderma*, 232, 563-572.
- Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., & Zhang, J. (2007). Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2971-2976.
- Clark, I. M., Buchkina, N., Jhurrea, D., Goulding, K. W., & Hirsch, P. R. (2012). Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1235-1244.
- Demanèche, S., Philippot, L., David, M.M., Navarro, E., Vogel, T.M. and Simonet, P. 2009. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2); 534-537.
- Denk, T. R., Mohn, J., Decock, C., Lewicka-Szczebak, D., Harris, E., Butterbach-Bahl, K., ... & Wolf, B. (2017). The nitrogen cycle: A review of isotope effects and isotope modeling approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 121-137.
- Dias, A. C. F., Hoogwout, E. F., e Silva, M. D. C. P., Salles, J. F., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2012). Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 50, 85-95.
- Ersahin, Y.S., Haktanir, K. and Yanar, Y. 2009. "Vermicompost suppresses *Rhizoctonia solani* Kuhn in cucumber seedlings", *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116, 182-188.
- Fierer, N., Strickland, M.S., Liptzin, D., Bradford, M.A. and Cleveland, C.C. 2009. Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12(11); 1238-1249.
- Fu, P. J., Ji, H. K., He, Q. X., Tang, S. R., Wang, H. H., Wu, Y. Z., & Meng, L. (2021). Effects of Nitrogen Fertilizer Application Times and Nitrification Inhibitor on N₂ O Emission from Potted Maize. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 42(9), 4538-4547.
- Gai, X., Wang, H., Liu, J., Zhai, L., Liu, S., Ren, T., & Liu, H. (2014). Effects of feedstock and pyrolysis temperature on biochar adsorption of ammonium and nitrate. *PLoS one*, 9(12), e113888.
- Habteselassie, M. Y., Xu, L., & Norton, J. M. (2013). Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. *Frontiers in Microbiology*, 4, 326.
- Harter, J., Krause, H. M., Schuettler, S., Ruser, R., Fromme, M., Scholten, T., ... & Behrens, S. (2014). Linking N₂O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. *The ISME Journal*, 8(3), 660-674.

- Hastings, R. C., Ceccherini, M. T., Miclaus, N., Saunders, J. R., Bazzicalupo, M., & McCarthy, A. J. (1997). Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(1), 45-54.
- Hayatsu, M., Tago, K. and Saito, M. 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 33-45
- He, JZ., Zheng, Y., Chen, CR. *et al.* Kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yaklaşımların ortaya koyduğu gibi, uzun süreli gübreleme tedavileri altındaki yüksek arazi kırmızı toprağının mikrobiyal bileşimi ve çeşitliliği. *Journal Soils Sediments* 8 , 349–358 (2008).
- Head I.M. Hiorns W.D. Embley T.M. McCarthy A.J. Saunders J.R. (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal Genetic Microbiology* 139, 1147–1153.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. and Philippot, L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 5181-5189.
- Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J. and Boon, N. 2006. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 8, 2012-2021.
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., & Murrell, J. C. (1995). Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, 132(3), 203-208.
- Huang, L., Dong, H., Wang, S., Huang, Q., & Jiang, H. (2014). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in diverse Chinese paddy soils. *Geomicrobiology Journal*, 31(1), 12-22.
- Ishii, S., Ashida, N., Otsuka, S. and Senoo, K. 2011. Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1); 338-342.
- Jha, N. 2015. The influence of Soil Parameters and Denitrifiers on N₂O Emissions in New Zealand Dairy-Grazed Pasture Soils. PhD thesis, Massey University, Institute of Science, 284, Palmerston North New Zealand.
- Jorquera, M. A., Martínez, O. A., Marileo, L. G., Acuna, J. J., Saggar, S., & Mora, M. L. (2014). Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 99-107.
- Junier, P., Carú, M., & Witzel, K. P. (2009). Effect of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in soil previously cultivated with *Medicago sativa*. *European Journal Of Soil Biology*, 45(3), 252-258.
- Kandeler, E., Brune, T., Enowashu, E., Dörr, N., Guggenberger, G., Lamersdorf, N., & Philippot, L. (2009). Response of total and nitrate-dissimilating bacteria to

- reduced N deposition in a spruce forest soil profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 444-454.
- Kızıloğlu, F.T., 1999, Toprak Organizmalarının Azot Formları Arasındaki Dönüşümlere ve Çevreye Etkileri, *Ekoloji Dergisi*. 30, 27-30
- Kong, A. Y., Hristova, K., Scow, K. M., & Six, J. (2010). Impacts of different N management regimes on nitrifier and denitrifier communities and N cycling in soil microenvironments. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1523-1533.
- Kuenen, J.G. 2008. "Anammox bacteria: from discovery to application", *Nature Reviews Microbiology*, 6, 320-326.
- Lebedeva, E.V., Alawi, M., Maixner, F., Jozsa, P.G., Daims, H. and Spieck, E. 2008. "Physiological and phylogenetic characterization of a novel lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium, 'Candidatus Nitrospira bockiana', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 242-250.
- Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E., & Grayston, S. J. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 11-25.
- Levy-Booth, D.J. and Winder, R.S. 2010. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21); 7116-7125.
- Li, X., He, J. Z., Liu, Y. R., & Zheng, Y. M. (2013). Effects of super absorbent polymers on soil microbial properties and Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) growth. *Journal of Soils and Sediments*, 13(4), 711-719.
- Li, Y., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., & Kimura, M. (2014). Abundance and composition of ammonia oxidizers in response to degradation of root cap cells of rice in soil microcosms. *Journal of Soils And Sediments*, 14(9), 1587-1598.
- Liu, C. W., Sung, Y., Chen, B. C., & Lai, H. Y. (2014). Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 11(4), 4427-4440.
- Logsdon, G. 1994. "Worldwide progress in vermicomposting", *Biocycle*, 35, 63-65.
- Luo, X. Q., Chen, Z., Hu, R. G., Wu, M. N., Qin, H. L., & Wei, W. X. (2010). Effect of long-term fertilization on the diversity of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in paddy soil. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 31(2), 423-430.
- Luo, X., Zeng, L., Wang, L., Qian, H., Hou, C., Wen, S., ... & Chen, W. (2021). Abundance for subgroups of denitrifiers in soil aggregates associates with denitrifying enzyme activities under different fertilization regimes. *Applied Soil Ecology*, 166, 103983.
- Martir-Torres, M. C., & Bruns, M. A. (2013). Comparative diversity and abundance of ammonia monooxygenase genes in mulched and vegetated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 758-768.
- McCaig, A.E., Embley, T.M. and Prosser, J.I. 1994. "Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers", *Fems Microbiology Letters*, 120, 363-367.

- Meiri, H. and Altman, A. 1998. Agriculture and Agricultural Biotechnology: Development Trends Toward the 21st Century. In: "Agricultural Biotechnology", A. Altam (Ed.), Marcel Dekker, Inc., pp. 1-17. ISBN: 0-8247-9439-7, New York.
- Morales, S. E., Cosart, T., & Holben, W. E. (2010). Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *The ISME Journal*, 4(6), 799-808.
- Morley, N., Baggs, E. M., Dörsch, P. and Bakken, L. 2008. Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂⁻ and O₂ concentrations. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1); 102-112.
- Murugapiran, S. K., Huntemann, M., Wei, C. L., Han, J., Detter, J. C., Han, C., ... & Hedlund, B. P. (2013). *Thermus oshimai* JL-2 and *T. thermophilus* JL-18 genome analysis illuminates pathways for carbon, nitrogen, and sulfur cycling. *Standards in Genomic Sciences*, 7(3), 449-468.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonio Leeuwenhugue*, 73, 127-141
- Ndour, N.Y.B., Baudoin, E., Guisse, A., Seck, M., Khouma, M. and Brauman, A. 2008. "Impact of irrigation water quality on soil nitrifying and total bacterial communities", *Biology and Fertility of Soils*, 44, 797-803.
- Németh, D. D., Wagner-Riddle, C., & Dunfield, K. E. (2014). Abundance and gene expression in nitrifier and denitrifier communities associated with a field scale spring thaw N₂O flux event. *Soil Biology and Biochemistry*, 73, 1-9.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C. and Prosser, J.I. 2008. "The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria", *Environmental Microbiology*, 10, 2966-2978.
- Nicolaisen, M.H. and Ramsing, N.B. 2002. "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria", *Journal of Microbiological Methods*, 50, 189-203.
- Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y. and Klotz, M.G. 2002. "Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria", *Archives of Microbiology*, 177, 139-149.
- Oszust, K., Frąc, M., Gryta, A., & Bilińska, N. (2014). The influence of ecological and conventional plant production systems on soil microbial quality under hops (*Humulus lupulus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9907-9923.
- Ouyang, Y., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2018). Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: a meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 71-78.
- Palmer, K., Biasi, C. and Horn, M.A. 2012. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N₂O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra. *ISME Journal*, 6, 1058-1077.
- Paranychianakis, N. V., Tsiknia, M., Giannakis, G., Nikolaidis, N. P., & Kalogerakis, N. (2013). Nitrogen cycling and relationships between ammonia oxidizers and

- denitrifiers in a clay-loam soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5507-5515.
- Patriquin, D. G., Blaikie, H., Patriquin, M. J., & Yang, C. (1993). On-farm measurements of pH, electrical conductivity and nitrate in soil extracts for monitoring coupling and decoupling of nutrient cycles. *Biological Agriculture & Horticulture*, 9(3), 231-272.
- Patureau, D., Zumstein, E., Delgenes, J.P. and Moletta, R. 2000. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microbial Ecology*, 39(2); 145-152.
- Perotti, E.B.R. and Pidello, A. 2012. Plant-Soil-Microorganism Interactions on Nitrogen Cycle: Azospirillum Inoculation, Advances in Selected Plant Physiology Aspects, Dr. Giuseppe Montanaro (Ed.), ISBN: 978-953-51-0557-2.
- Philippot, L., Hallin, S., & Schloter, M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, 249-305.
- Prosser, J.I. and Embley, T.M. 2002. "Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers", Antonie Van Leeuwenhoek *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81, 165-179.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P. and Wagner, M. 2000. "Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys", *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5368-5382.
- Rachid, C. T., Piccolo, M. C., Leite, D. C. A., Balieiro, F. C., Coutinho, H. L. C., van Elsas, J. D., ... & Rosado, A. S. (2012). Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-11.
- Rahman, M. M., Nahar, K., Ali, M. M., Sultana, N., Karim, M. M., Adhikari, U. K., Rauf, M., & Azad, M. (2020). Effect of Long-Term Pesticides and Chemical Fertilizers Application on the Microbial Community Specifically Anammox and Denitrifying Bacteria in Rice Field Soil of Jhenaidah and Kushtia District, Bangladesh. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(6), 828–833. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02870-5>
- Rasche, F., Knapp, D., Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Zechmeister-Boltenstern, S., ... & Sessitsch, A. (2011). Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *The ISME Journal*, 5(3), 389-402.
- Rasigraf, O., Schmitt, J., Jetten, M. S., & Lüke, C. (2017). Metagenomic potential for and diversity of N-cycle driving microorganisms in the Bothnian Sea sediment. *Microbiology Open*, 6(4), e00475.
- Richardson, D. J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment 1999 Fleming Lecture (Delivered at the 144th meeting of the Society for General Microbiology, 8 September 1999). *Microbiology*, 146(3), 551-571.

- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. and Liesack, W. 1997. "The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations", *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4704-4712.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G. and Fierer, N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10); 1340.
- San-An, N. I. E., Hui-Juan, X. U., Shun, L. I., Hu, L. I., & Jian-Qiang, S. U. (2014). Relationships between abundance of microbial functional genes and the status and fluxes of carbon and nitrogen in rice rhizosphere and bulk soils. *Pedosphere*, 24(5), 645-651.
- Schmid, M.C., Hooper, A.B., Klotz, M.G., Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M.M., Pommerening-Roeser, A., op den Camp, H.J.M. and Jetten, M.S.M. 2008. "Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria", *Environmental Microbiology*, 10, 3140-3149.
- Schmidt, C.S., Hultman, K.A., Robinson, D., Killham, K. and Prosser, J.I. 2007. "PCR profiling of ammonia-oxidizer communities in acidic soils subjected to nitrogen and sulphur deposition", *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 305-316.
- Shen, Ju-Pei, Li-Mei Zhang, and Ji-Zheng He. "Contrasting response of nitrification capacity in three agricultural soils to N addition during short-term incubation." *Journal of Soils and Sediments* 14, no. 11 (2014): 1861-1868.
- Sher, Y., Zaady, E., Ronen, Z., & Nejidat, A. (2012). Nitrification activity and levels of inorganic nitrogen in soils of a semi-arid ecosystem following a drought-induced shrub death. *European Journal of Soil Biology*, 53, 86-93.
- Shi, Y., Liu, X., & Zhang, Q. (2019). Effects of combined biochar and organic fertilizer on nitrous oxide fluxes and the related nitrifier and denitrifier communities in a saline-alkali soil. *Science of the Total Environment*, 686, 199-211.
- Song, X. D., Xue, X. Y., Chen, D. Z., He, P. J., & Dai, X. H. (2014). Application of biochar from sewage sludge to plant cultivation: Influence of pyrolysis temperature and biochar-to-soil ratio on yield and heavy metal accumulation. *Chemosphere*, 109, 213-220.
- SONG, Y. N., & LIN, Z. M. (2014). Abundance and community composition of ammonia-oxidizers in paddy soil at different nitrogen fertilizer rates. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(4), 870-880.
- Stein, L.Y. ve Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle, *Current Biology*, 26(3), 94-98. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.021
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I. and Embley, T.M. 1996. "Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria" *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4147-4154.
- Sun, B., Wang, F., Jiang, Y., Li, Y., Dong, Z., Li, Z., & Zhang, X. X. (2014). A long-term field experiment of soil transplantation demonstrating the role of

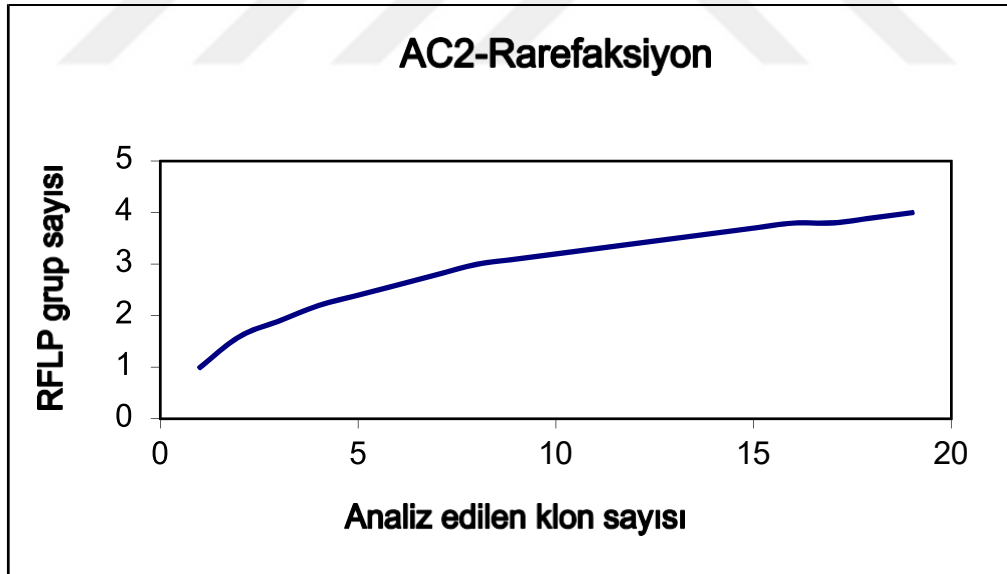
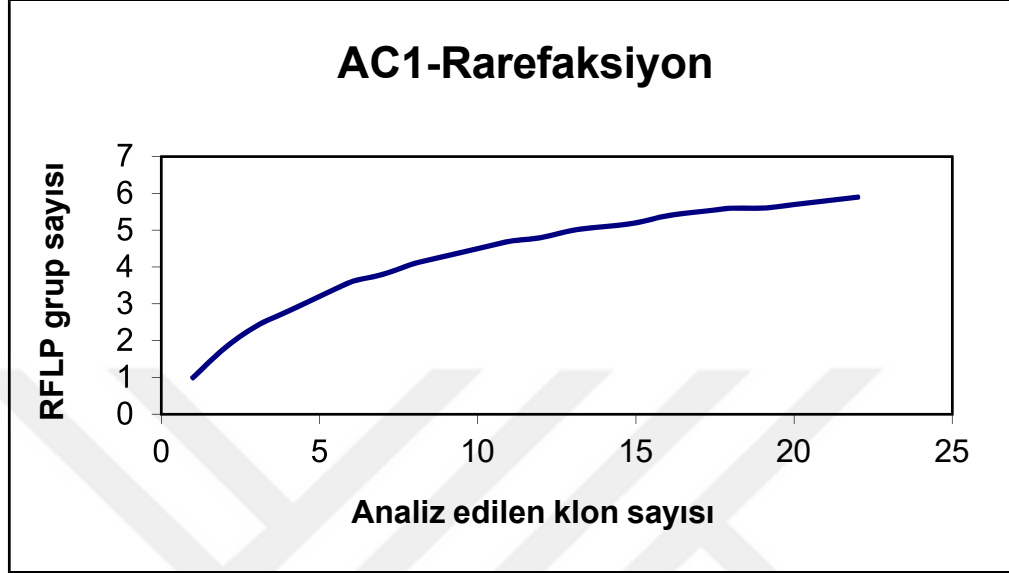
- contemporary geographic separation in shaping soil microbial community structure. *Ecology and Evolution*, 4(7), 1073-1087.
- Szukics, U., Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., & Sessitsch, A. (2009). Contrasting response of two forest soils to nitrogen input: rapidly altered NO and N₂O emissions and *nirK* abundance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(8), 855-863.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. 1994. "Evolutionary relationships among ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria", *Journal of Bacteriology*, 176, 6623-6630.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.
- Uz, I. and Ogram, A.V. 2006. "Cellulolytic and fermentative guilds in eutrophic soils of the Florida Everglades", *FEMS Microbiological Ecology*, 57, 396-408.
- Van de Peer, Y. and De Wachter, R. 1994. "Treecon for windows a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment", *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 569-570.
- Van de Peer, Y. and De Wachter, R. 1997. "Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites", *Computer Applications in the Biosciences*, 13, 227-230.
- Veraart, A.J., Dimitrov, M.R., Schrier-Uijl, A.P., Smidt, H. and de Klein, J.J. 2017. Abundance, activity and community structure of denitrifiers in drainage ditches in relation to sediment characteristics, vegetation and land-use. *Ecosystems*, 20(5); 928-943
- Viers, J.H., Liptzin, D., Rosenstock, T.S., Jensen, V.B., Hollander, A.D., McNally, A., King, A.M., Kourakos, G., Lopez, E.M., De La Mora, N., Fryjoff-Hung, A., Dzurella, K.N., Canada, H.E., Laybourne, S., McKenney, C., Darby, J., Quinn, J.F. and Harter, T. 2012. Nitrogen Sources and Loading to Groundwater. Technical Report 2 in: Addressing Nitrate in California's Drinking Water with a Focus on Tulare Lake Basin and Salinas Valley Groundwater, Report for the State Water Resources Control Board Report to the Legislature, Center for Watershed Sciences, University of California, Davis.
- Voytek, M.A. and Ward, B.B. 1995. "Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class proteobacteria in aquatic samples with the PCR", *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1444-1450.
- Wallenstein, M.D. and Vitgalys, R.J. 2005. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. *Pedobiologia*, 49, 665-672.
- Wang, H., Yang, S. H., Yang, J. P., Lv, Y. M., Zhao, X., & Pang, J. L. (2014). Temporal changes in soil bacterial and archaeal communities with different fertilizers in tea orchards. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 15(11), 953-965.
- Wang, J., Zhang, L., Lu, Q., Raza, W., Huang, Q., & Shen, Q. (2014). Ammonia oxidizer abundance in paddy soil profile with different fertilizer regimes. *Applied Soil Ecology*, 84, 38-44.

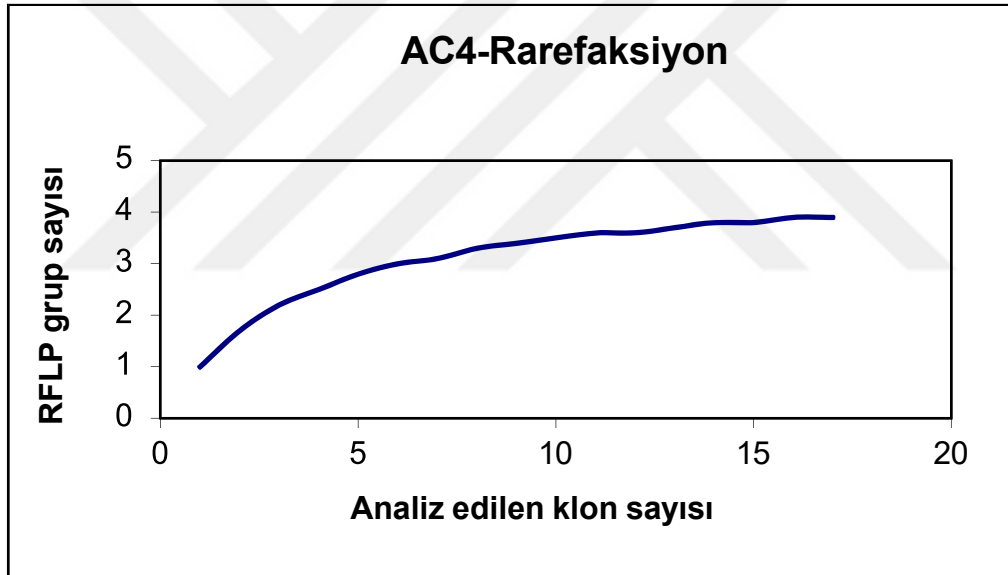
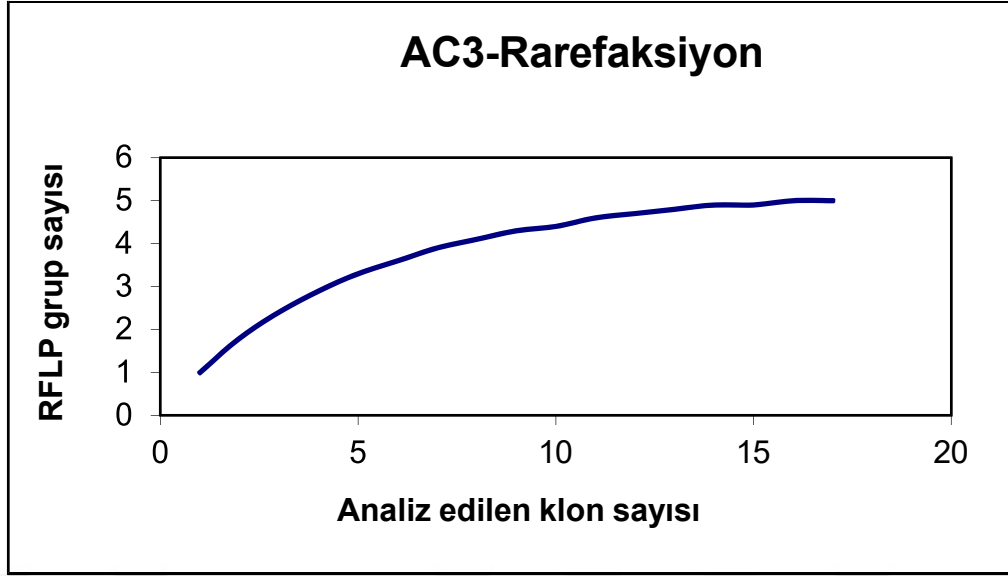
- Wang, Y., Ji, H., Wang, R., Hu, Y., & Guo, S. (2020). Synthetic Fertilizer Increases Denitrifier Abundance and Depletes Subsoil Total N in a Long-Term Fertilization Experiment. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2026.
- Wang, Y., Ke, X., Wu, L., & Lu, Y. (2009). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(1), 27-36.
- Wang, Y., Qi, L., Huang, R., Wang, F., Wang, Z., & Gao, M. (2020). Characterization of Denitrifying Community for Application in Reducing Nitrogen: a Comparison of *nirK* and *nirS* Gene Diversity and Abundance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(1), 22–41. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03250-9>
- Ward, B.B., Voytek, M.A. and Witzel, R.P. 1997. "Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification", *Microbial Ecology*, 33, 87-96.
- Whang, L.M., Chien, I.C., Yuan, S.L. and Wu, Y.J. 2009. "Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants", *Chemosphere*, 75, 234-242.
- White, J. D., & Scott, N. A. (2006). Specific leaf area and nitrogen distribution in New Zealand forests: Species independently respond to intercepted light. *Forest Ecology and Management*, 226(1-3), 319-329.
- Wolsing, M., & Priemé, A. (2004). Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2), 261-271.
- Xiao, R., Chen, B., Liu, Y., Wang, C., Gu, J. D., Feng, H., ... & Ma, X. (2014). Higher abundance of ammonia oxidizing archaea than ammonia oxidizing bacteria and their communities in Tibetan alpine meadow soils under long-term nitrogen fertilization. *Geomicrobiology Journal*, 31(7), 597-604.
- Yamamoto, N., Oishi, R., Suyama, Y., Tada, C., & Nakai, Y. (2012). Ammonia-oxidizing bacteria rather than ammonia-oxidizing archaea were widely distributed in animal manure composts from field-scale facilities. *Microbes and Environments*, 27(4), 519-524.
- Yamamoto, N., Otawa, K., & Nakai, Y. (2010). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting. *Microbial Ecology*, 60(4), 807-815.
- Yan, L., Li, Z., Wang, G., Gao, Y., Wang, Y., Gu, J. D., & Wang, W. (2016). Diversity of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in response to different aeration rates during cattle manure composting. *Ecological Engineering*, 93, 46-54.
- Yang, X., Tang, S., Ni, K., Shi, Y., Yi, X., Ma, Q., Cai, Y., Ma, L., & Ruan, J. (2022). Long-term nitrogen addition increases denitrification potential and functional gene abundance and changes denitrifying communities in acidic tea plantation soil. *Environmental Research*, 216(Pt 3), 114679. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114679>

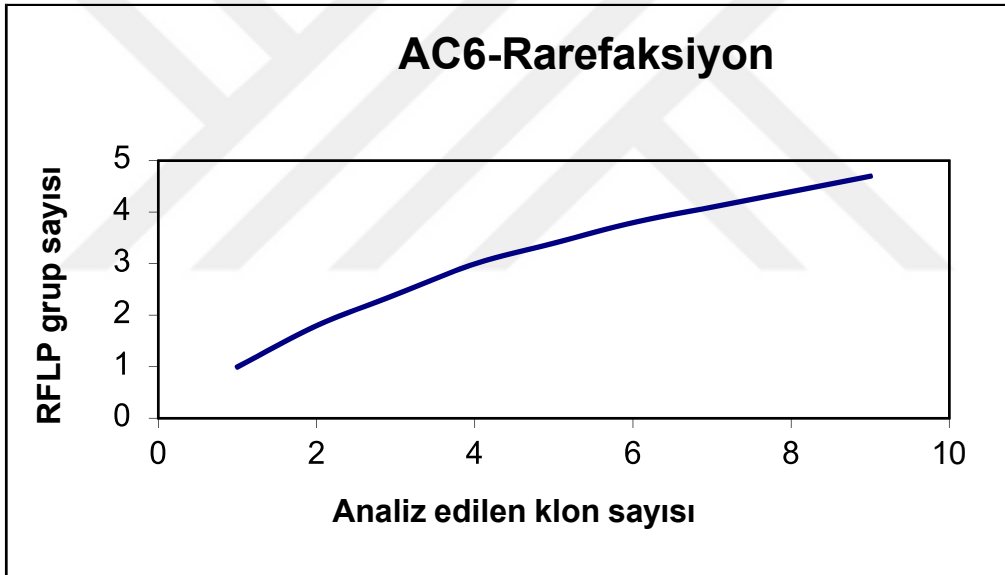
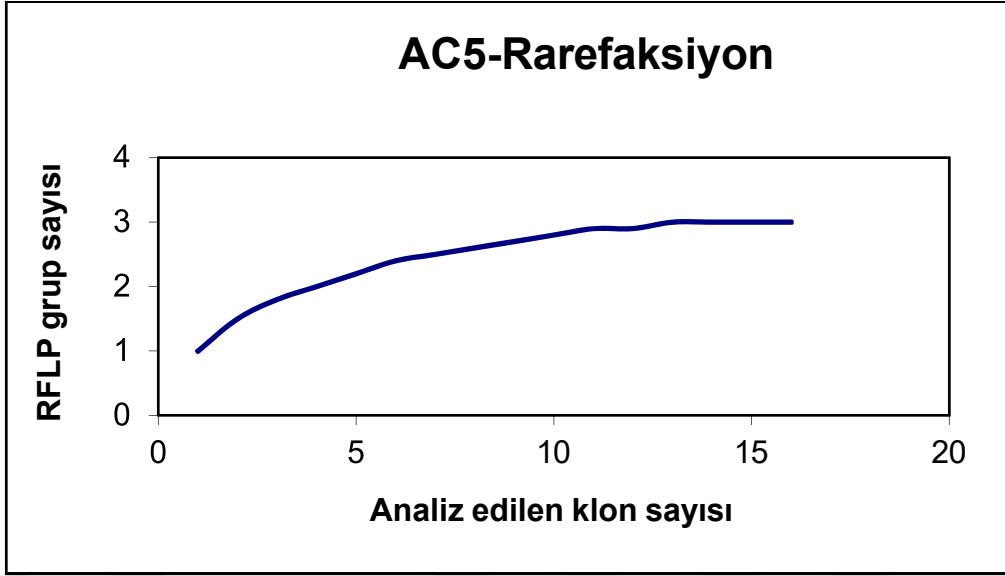
- Yin, M., Gao, X., Tenuta, M., Kuang, W., Gui, D., & Zeng, F. (2019). Manure application increased denitrifying gene abundance in a drip-irrigated cotton field. *Peer Journal*, 7, e7894.
- Zeng, X. B., Wang, Y. N., Wang, Y. Z., Bai, L. Y., Li, L. F., Duan, R., ... & Wu, C. X. (2014). Effects of different fertilization regimes on abundance and community structure of the *nirK*-type denitrifying bacteria in greenhouse vegetable soils. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 25(2), 505-514.
- Zhan, Y., Gao, D. D., Sheng, R., Wei, W. X., Qin, H. L., Zhang, W. Z., ... & Tang, Y. F. (2019). Differential responses of rhizospheric *nirK*-and *nirS*-type denitrifier communities to different phosphorus levels in paddy soil. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 40(7), 3304-3312.
- Zhang, C., Cao, K., Li, Y., Zhao, J., Peng, W., Cao, H., & Xiao, X. (2021). Long-term nitrogen fertilization shaped the *nifH*, *nirK*, and *nosZ* gene community patterns in red paddy soil in south China. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(4), 310–322. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0300>
- Zhang, J. B., T. B. Zhu, Z. C. Cai, S. W. Qin, and C. Müller. "Effects of long-term repeated mineral and organic fertilizer applications on soil nitrogen transformations." *European Journal of Soil Science* 63, no. 1 (2012): 75-85.
- Zhao, D., Luo, J., Wang, J., Huang, R., Guo, K., Li, Y., & Wu, Q. L. (2015). The influence of land use on the abundance and diversity of ammonia oxidizers. *Current Microbiology*, 70(2), 282-289.
- Zhou, H., Shi, H. B., Zhang, W. C., Wang, W. G., Su, Y. D., & Yan, Y. (2021). Effects of Combination of Organic and Inorganic Nitrogen on Nitrification and Denitrification in Two Salinized Soils. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 42(10), 5010-5020.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiologic Molecular Biolology Review*, 61(4); 533-536.

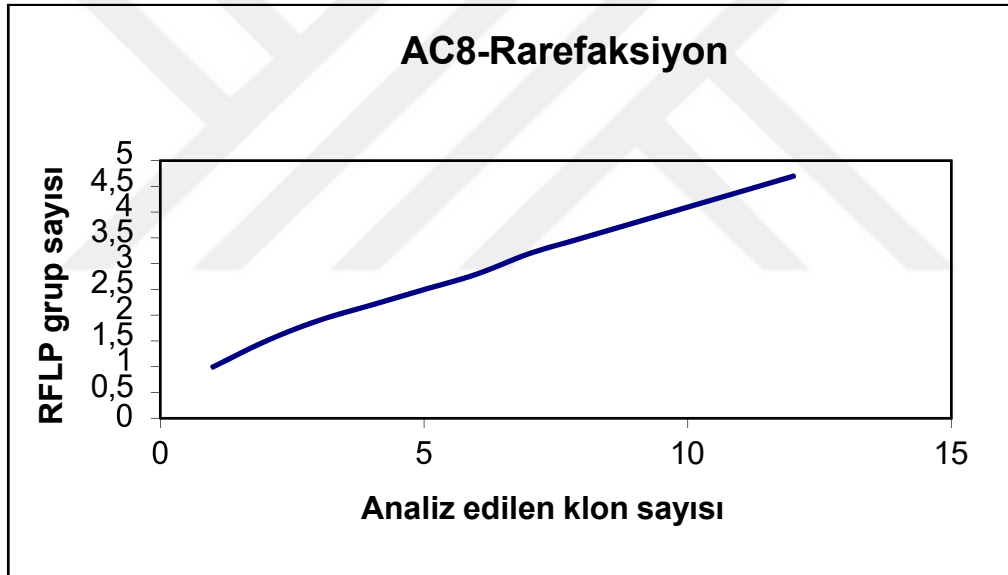
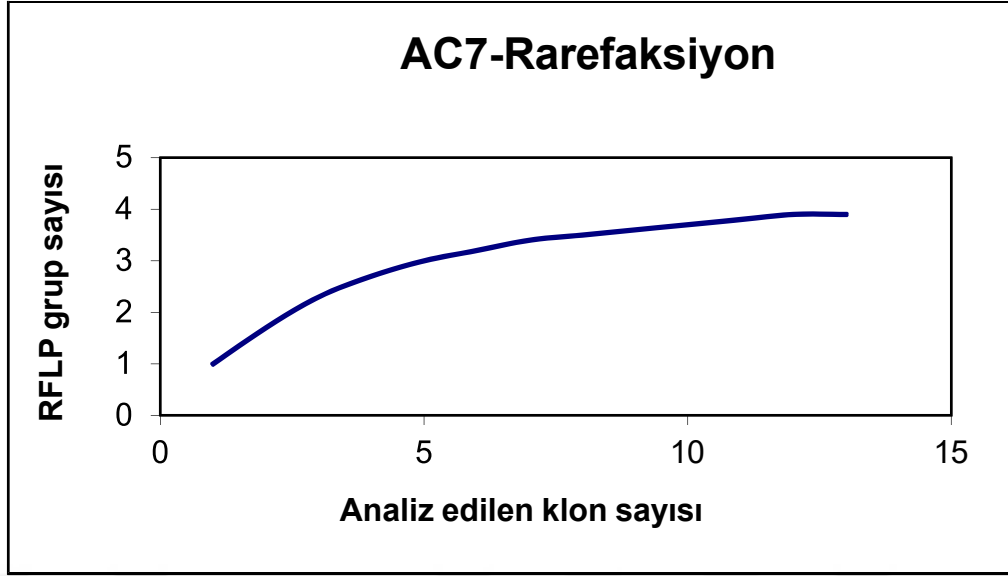
8. EKLER

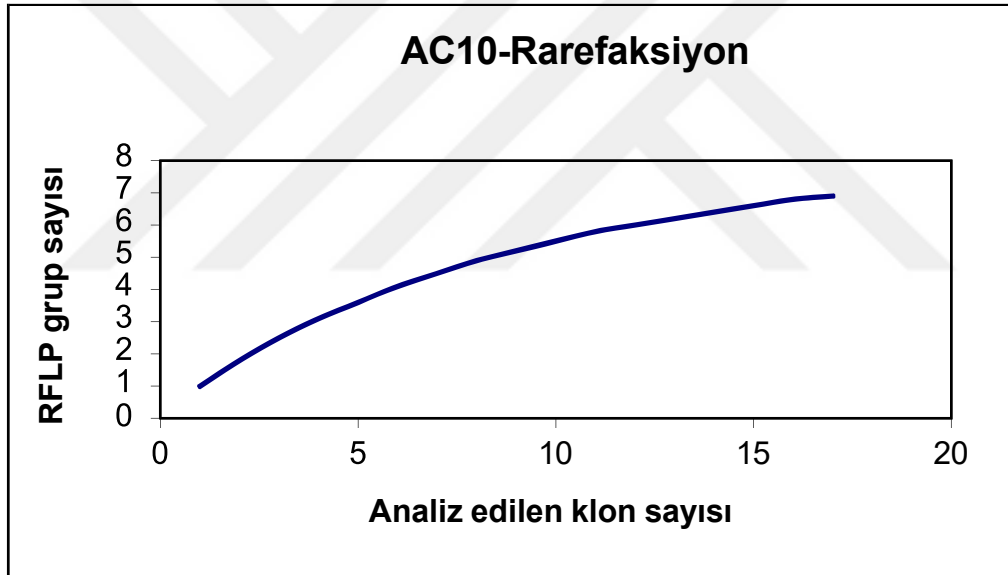
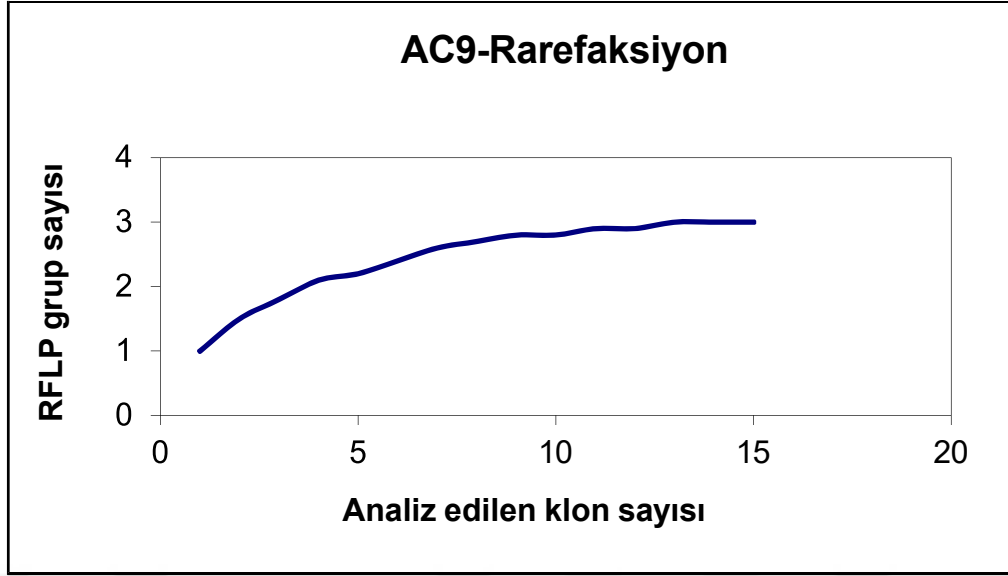
Ek. 1 Her toprak örneğinden elde edilen *amoA* klonlarına ait rarefaksiyon analiz sonuçları

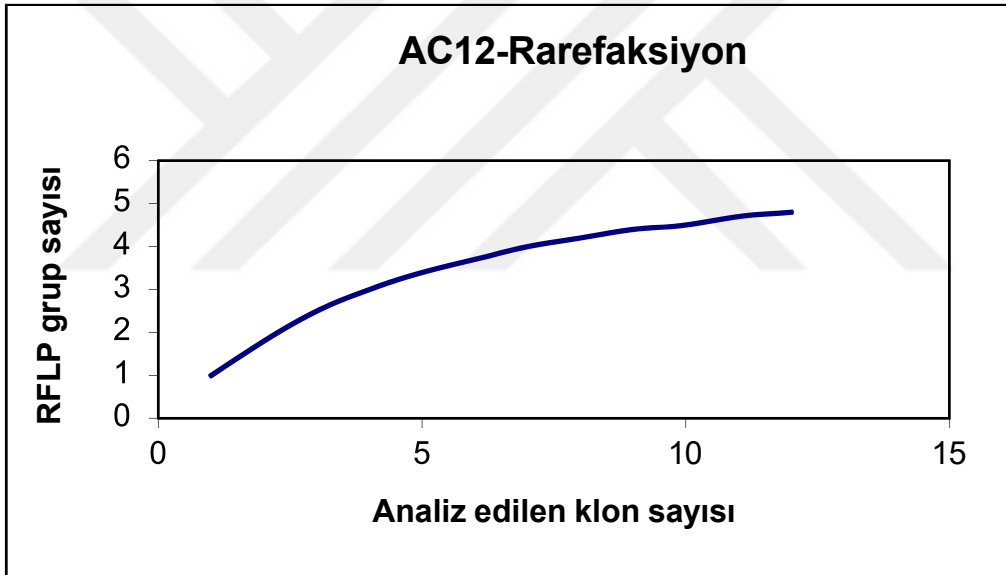
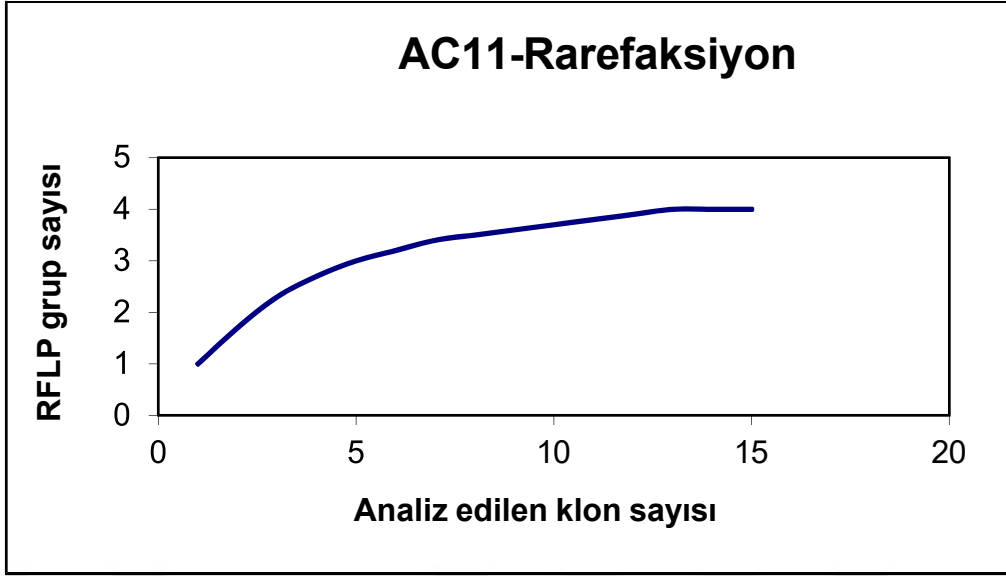


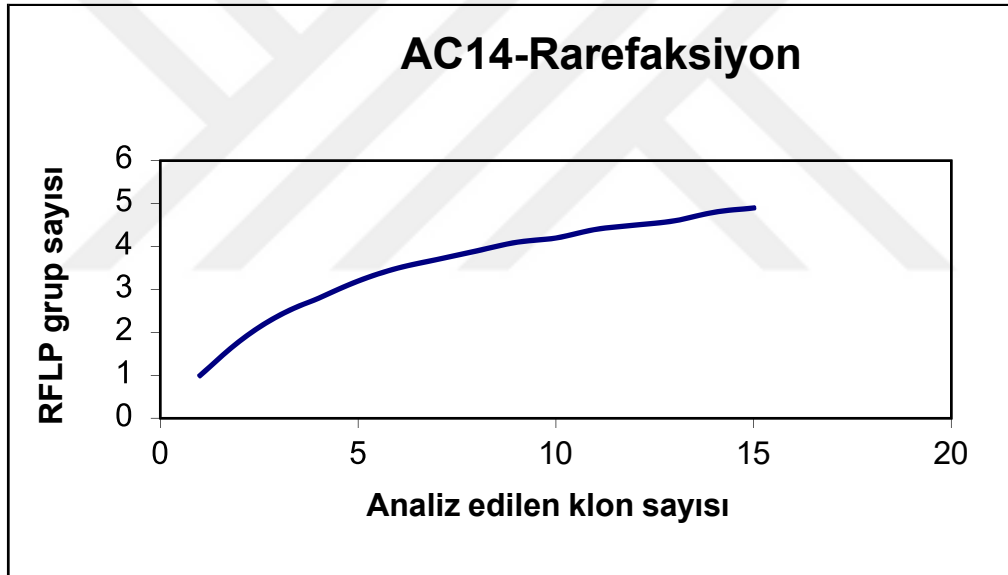
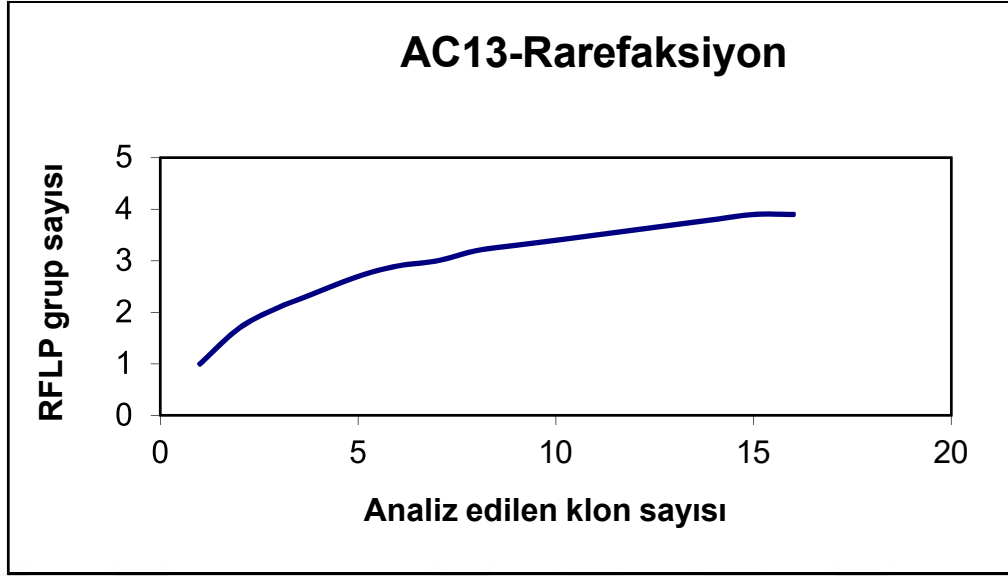


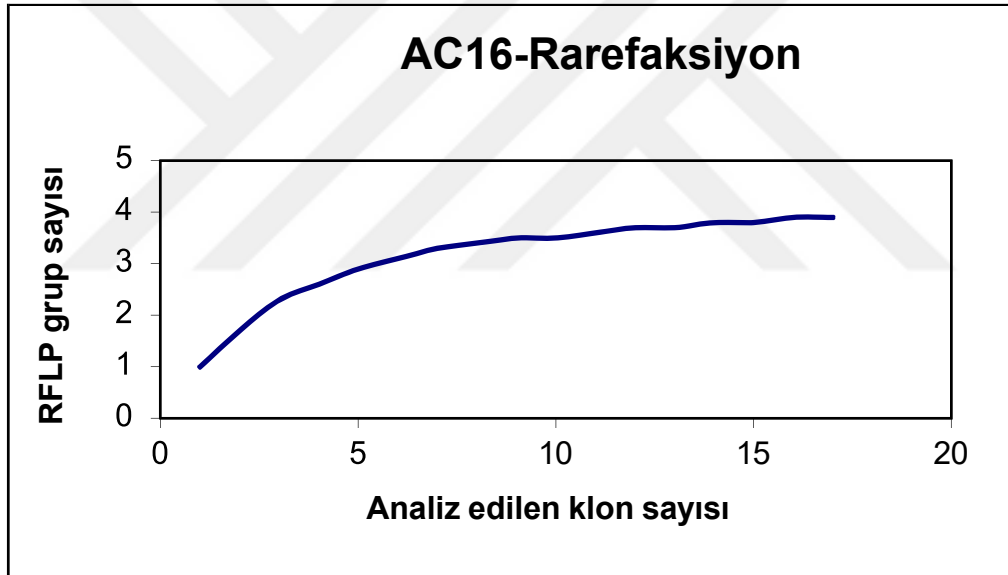
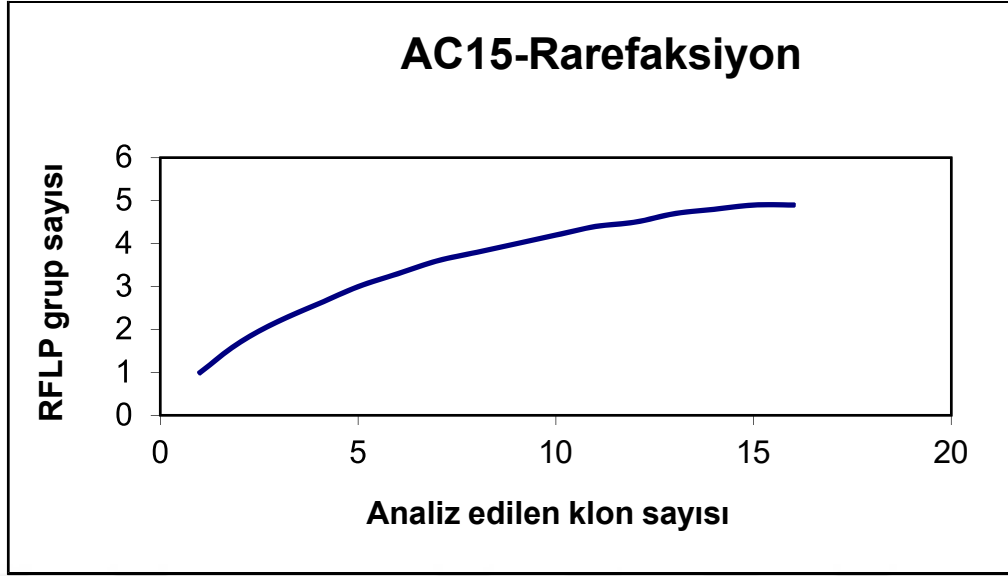


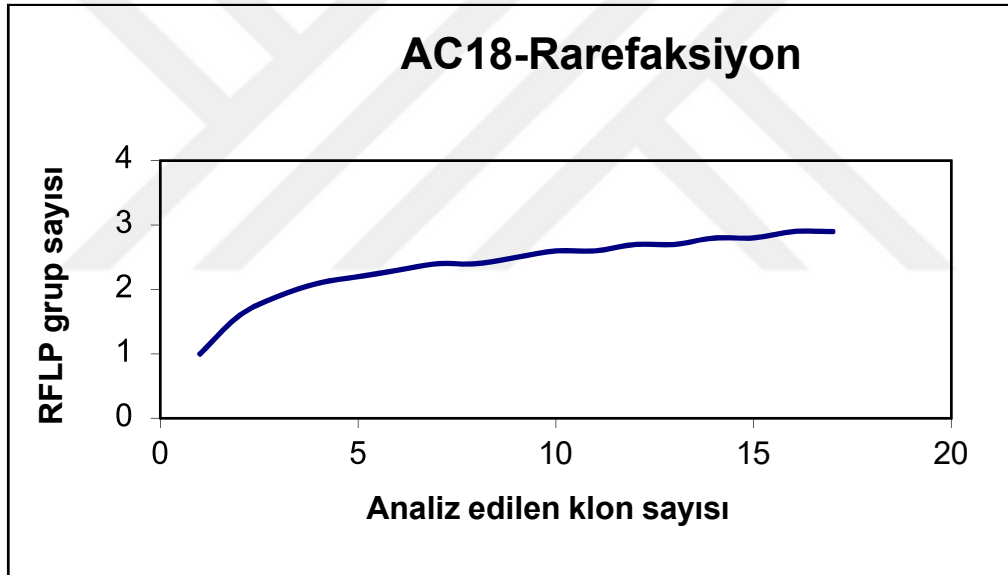
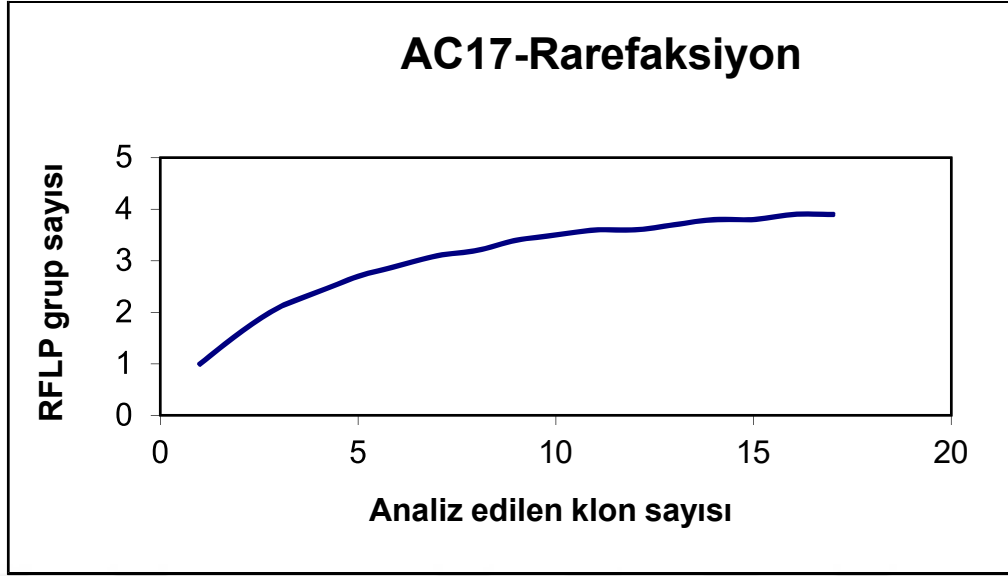




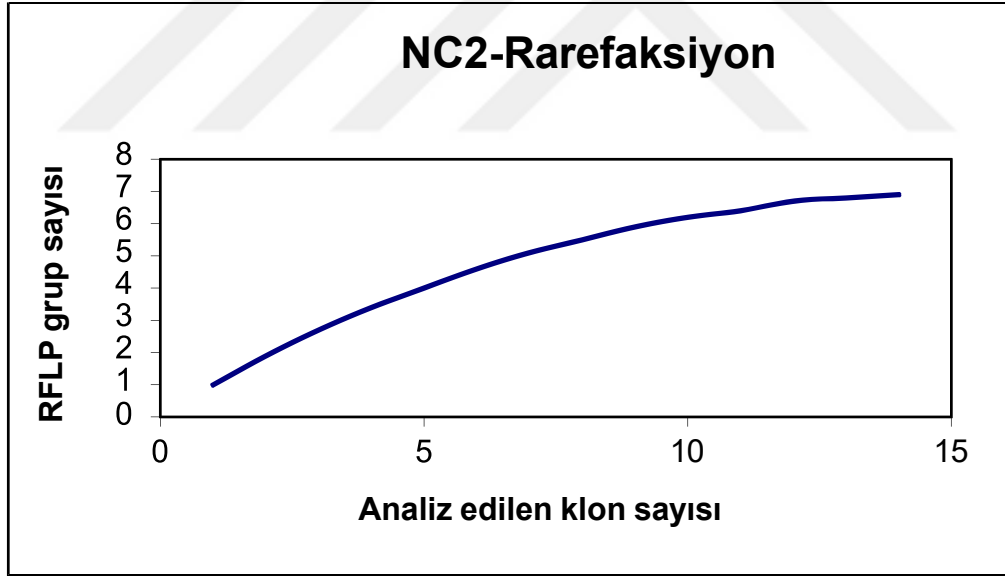
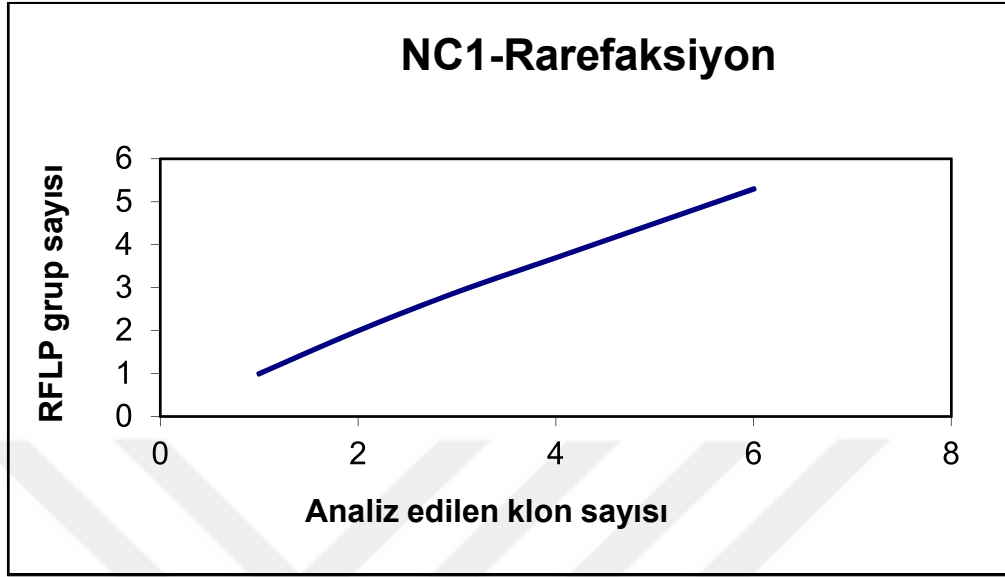


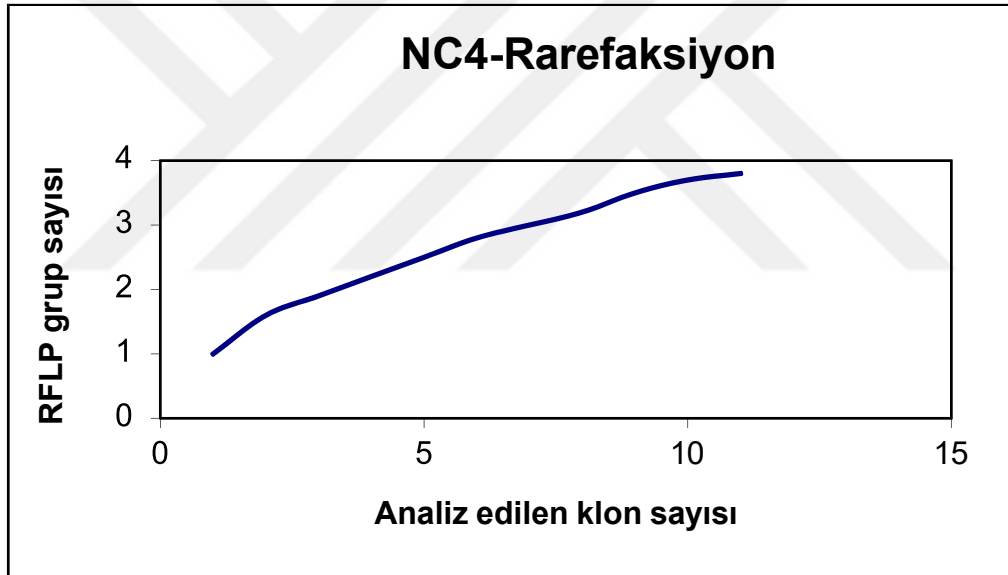
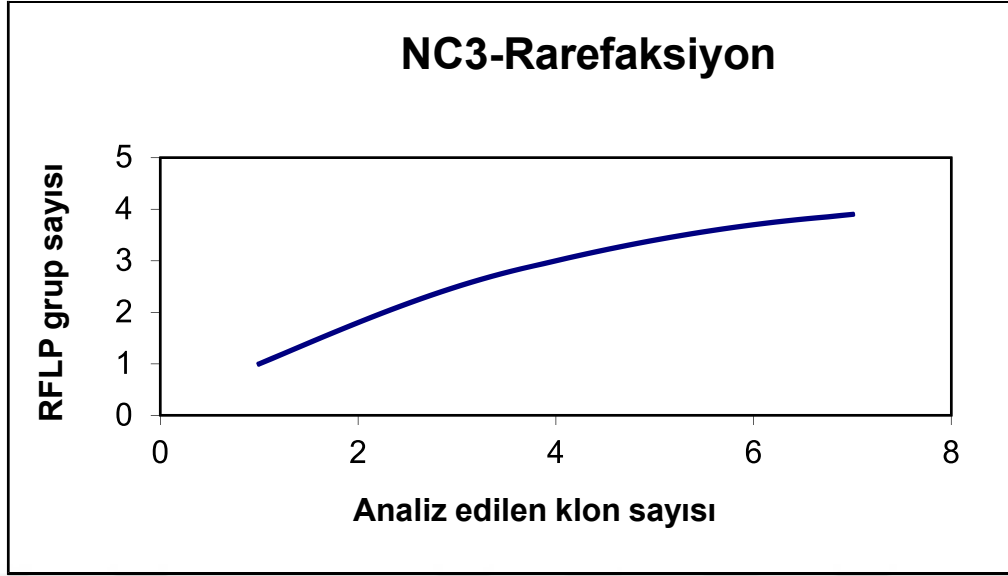


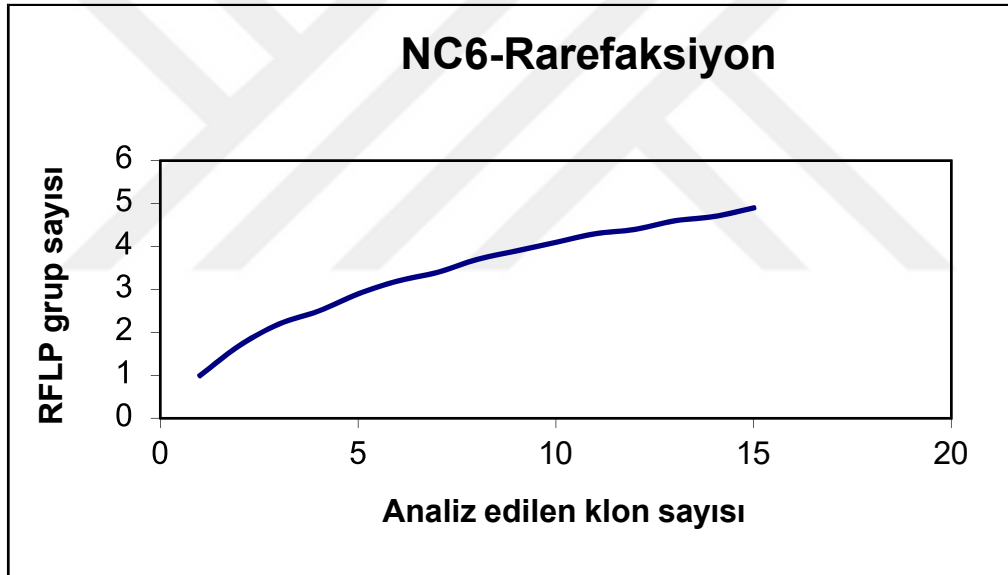
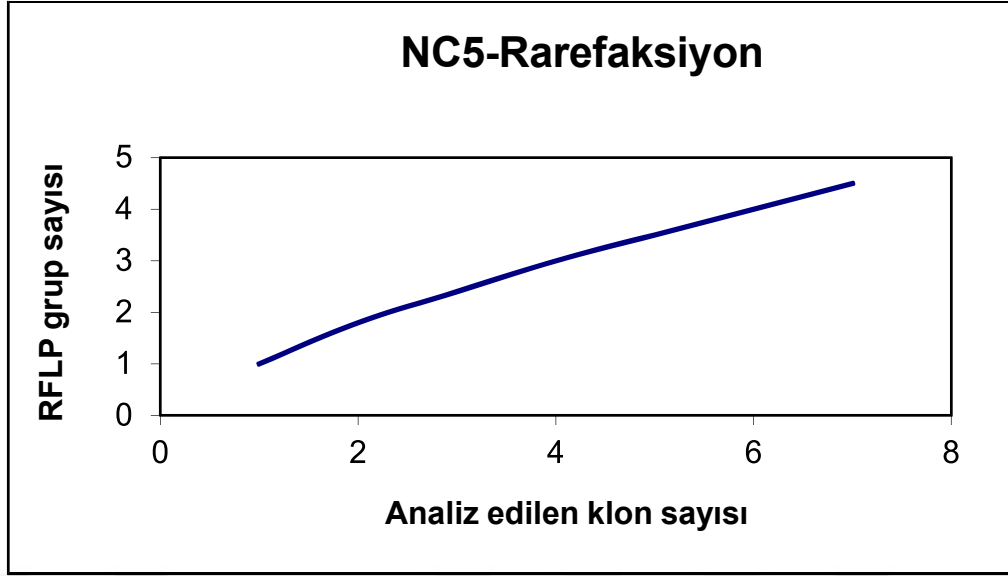


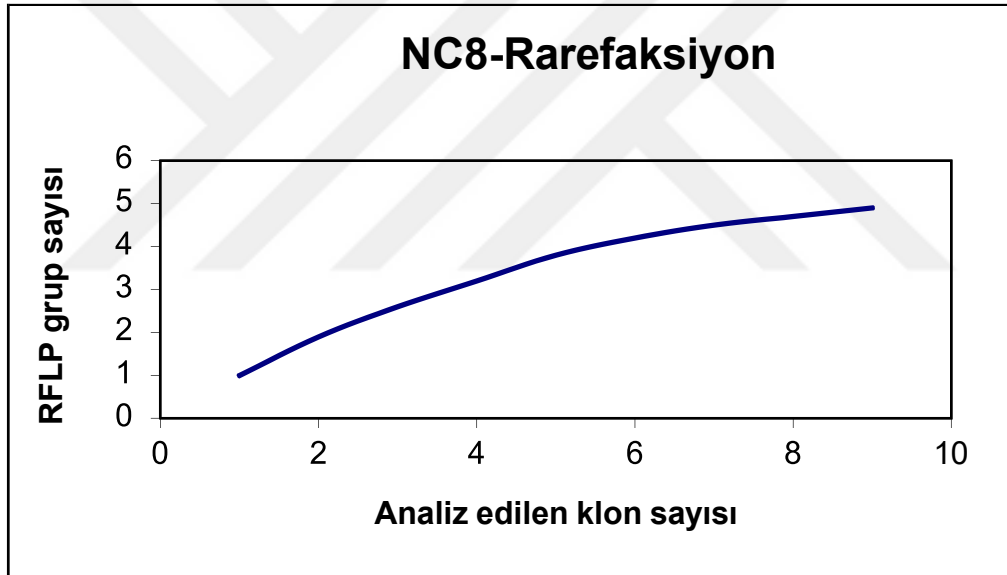
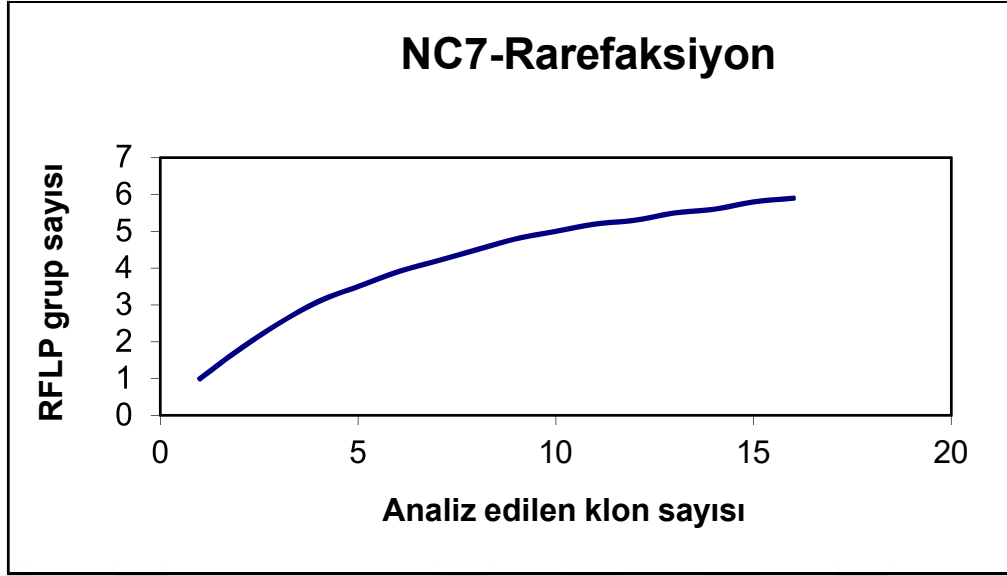


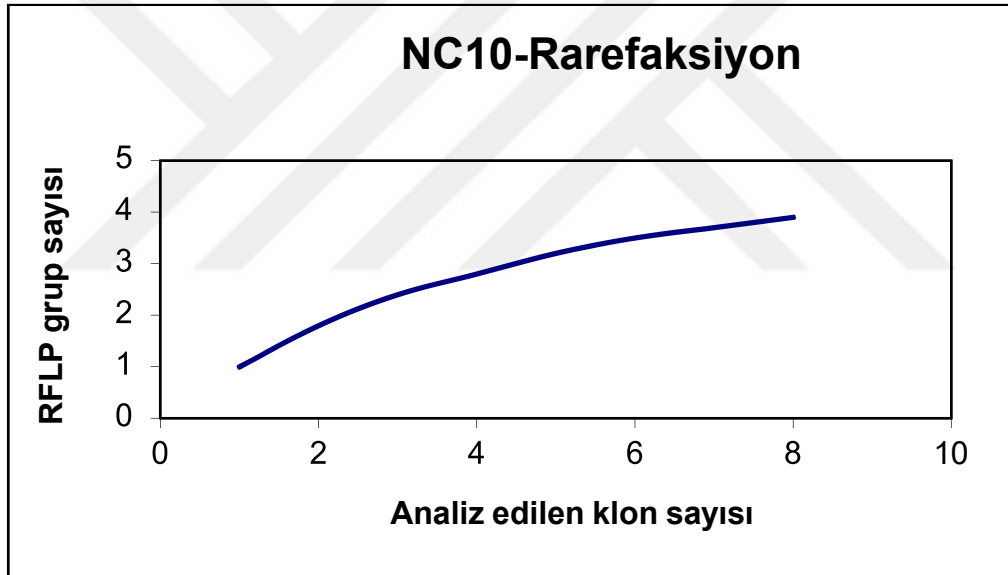
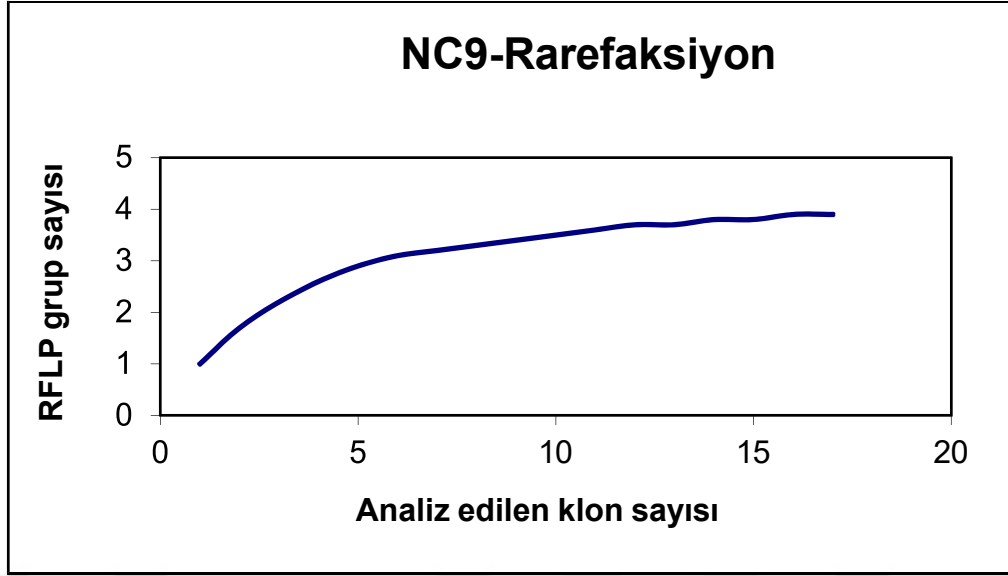
Ek. 2 Her toprak örneğinden elde edilen *nirK* klonlarına ait rarefaksiyon analiz sonuçları

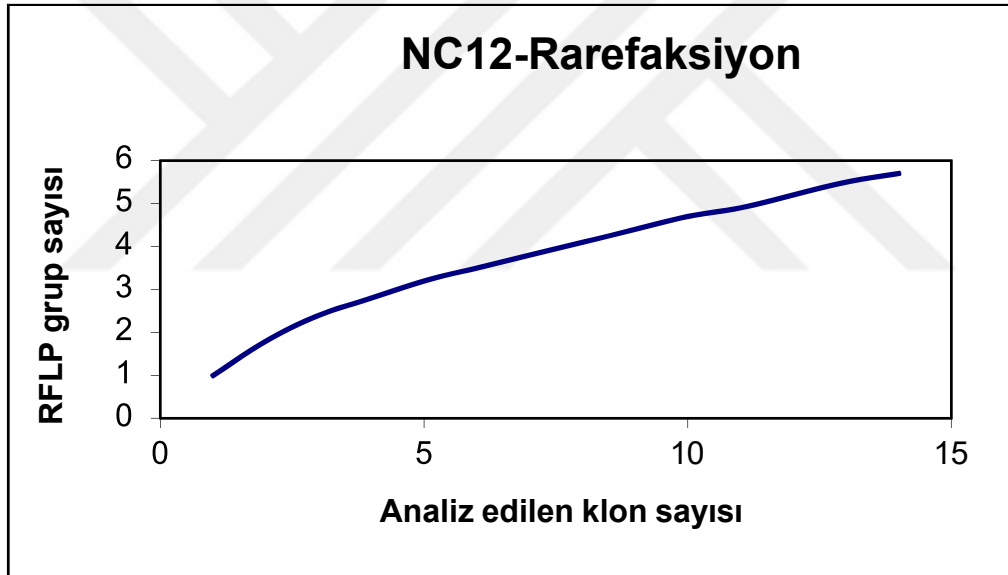
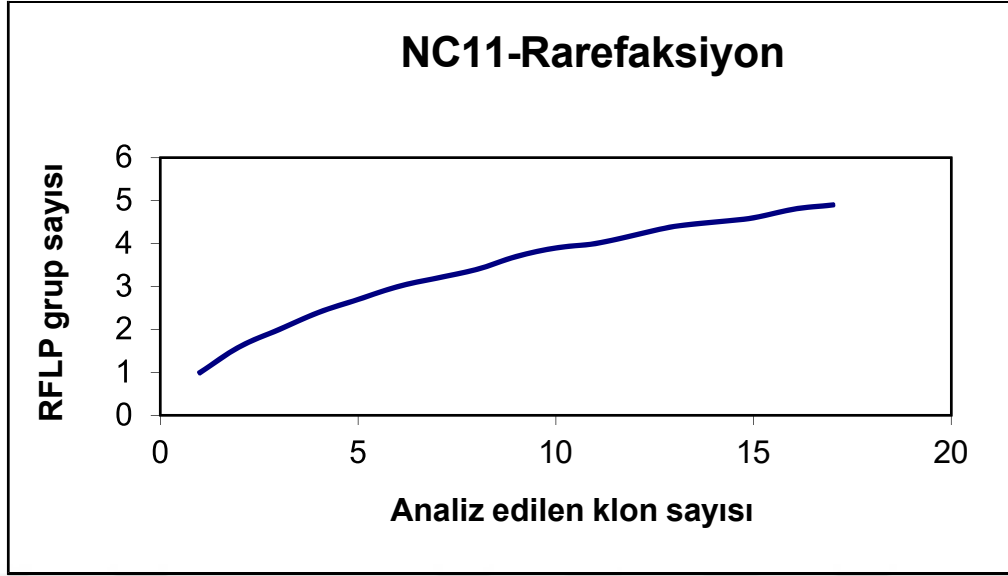


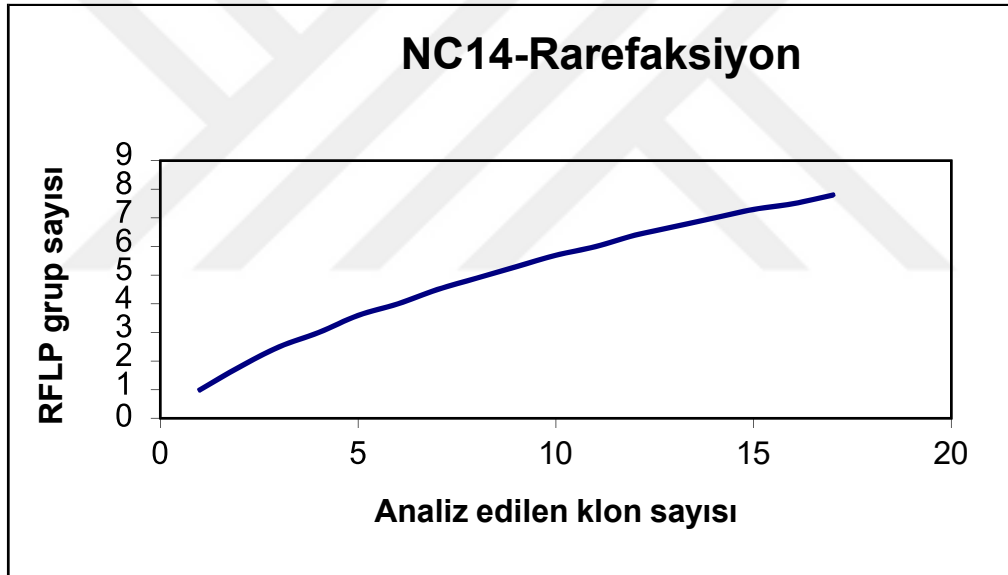
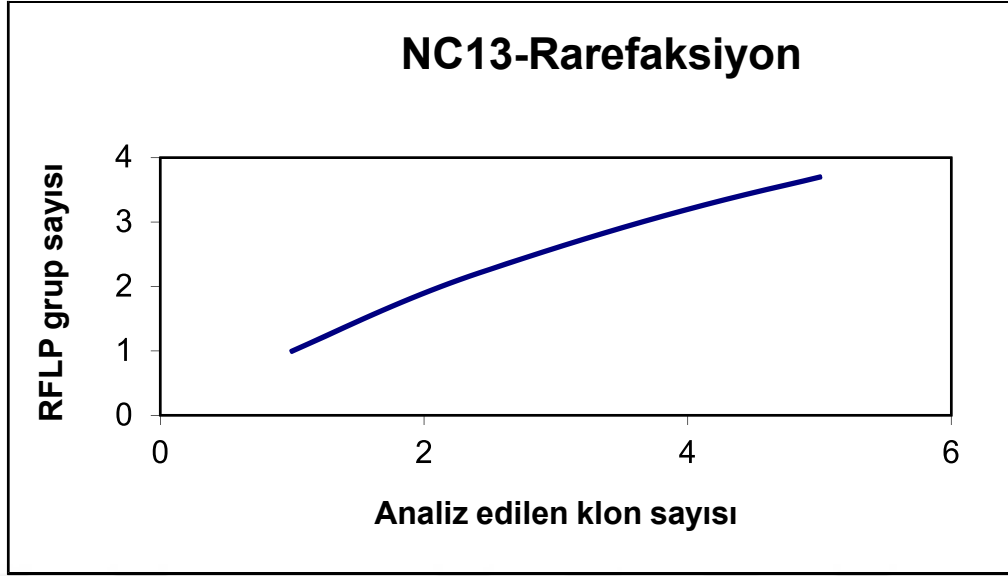


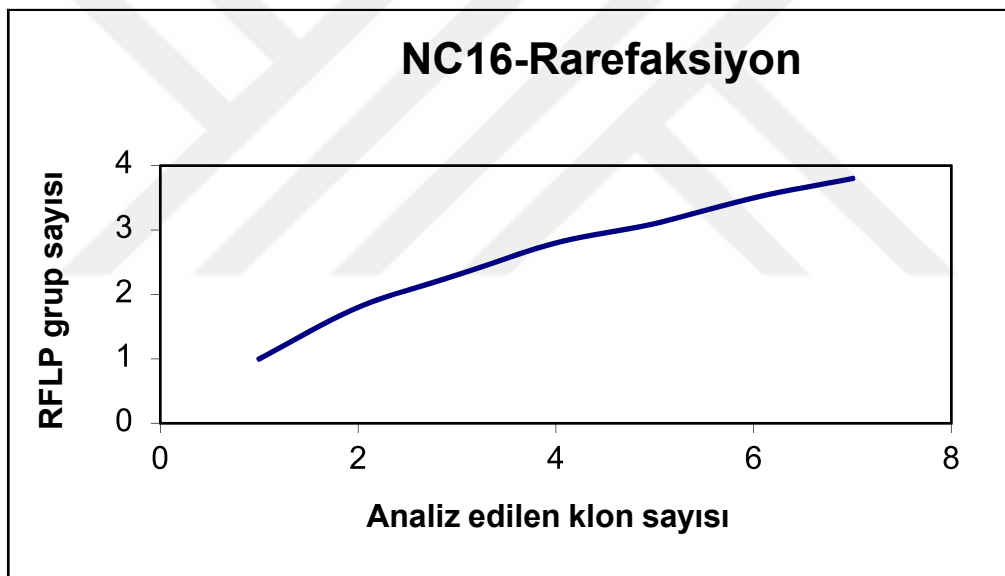
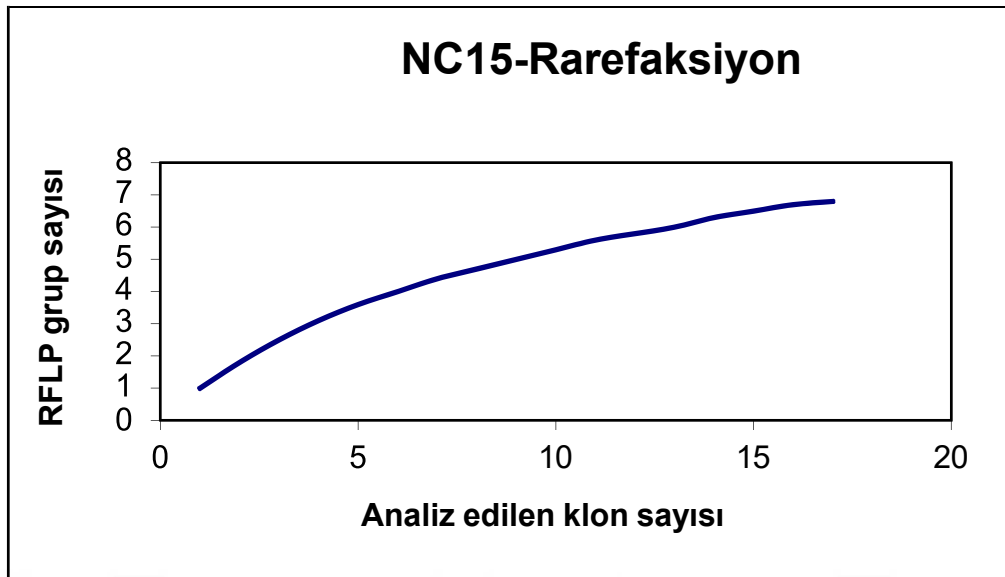


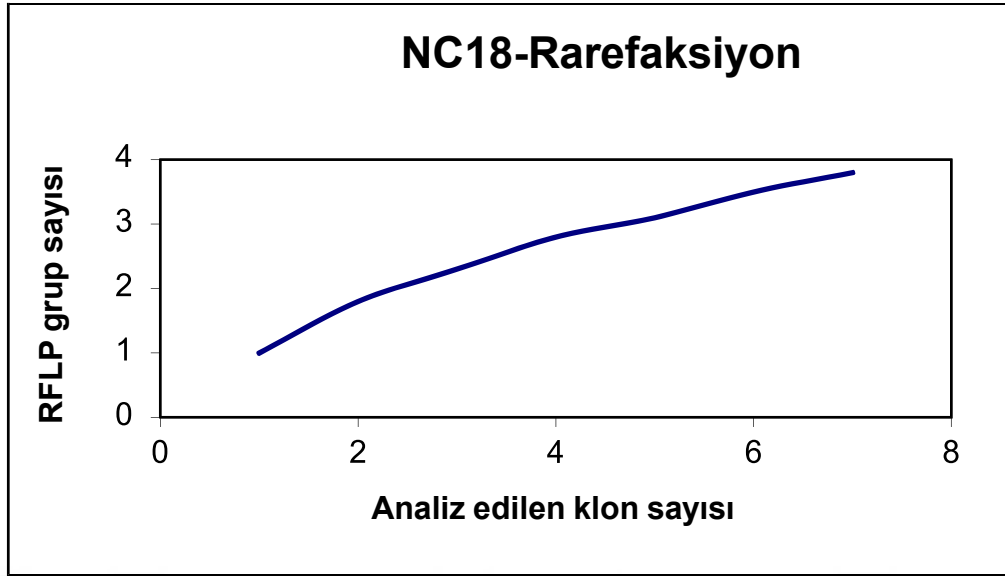












ÖZGEÇMİŞ

RAZİYE YILDIZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019-2023	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı Antalya
Lisans 2015-2019	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Aksoy, M., İlker, UZ, YILDIZ, R., & Kantar, F. Antalya Bölgesinden Soğuğa Toleranslı Bakterilerin İzolasyonu ve Büyüme Hızlarının Analizi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi* , 8 (3), 502-507.