

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY RİZOSFERİK TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN ACC
DEAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SÜMEYRA BAYRAK KOÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. MİNE GÜL ŞEKER

KASIM 2024

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY RİZOSFERİK TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN ACC
DEAMİNAZ ÜRETİCİSİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE
POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SÜMEYRA BAYRAK KOÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ.DR. MİNE GÜL ŞEKER

KASIM 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**ISOLATION AND EVALUATION OF THEIR POTENTIAL OF ACC
DEAMINASE PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM WHEAT
RHIZOSPHERIC SOILS**

SÜMEYRA BAYRAK KOÇOĞLU

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY VE
GENETICS

ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. MİNE GÜL ŞEKER

NOVEMBER 2024

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 29/07/2024 tarih ve 2024/42 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/ 11/ 2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Sümeyra BAYRAK KOÇOĞLU'nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Mine GÜL ŞEKER

ÜYE

: Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

:Prof. Dr. İbrahim Özer ELİBÜYÜK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



*Aileme
ve
biricik eşime*

ÖZET

İklim değışikliği ve çevre sorunları tarımsal faaliyetlere yönelik en büyük tehditlerden biri haline gelmiştir. Elverişsiz şartlara neden olan faktörlere ise stres denir. Bitkiler stres koşulları altında hayatta kalabilmek için bazı mekanizmalar kullanırlar. Bu mekanizmalardan biride bitki strese maruz kaldığında etilen seviyesini arttırmasıdır. Etilen seviyesinin aşırı üretimi stres etileni olarak adlandırılır ve bitkinin stres koşullarında hayatta kalmasını olumsuz etkiler. Bitki köklerinde simbiyotik olarak yaşayan bazı bitki büyümesini teşvik edici bakteriler ACC deaminaz enzimi üretirler. ACC deaminaz enzimi etilen hormonunun öncü maddesi olan 1-aminosiklopropan-1 karboksilat (ACC)'yi parçalayarak bitkideki stres etileni seviyesini düşürerek biyotik ve abiyotik stres koşulları altında bitki büyümesini teşvik eder.

Bu bilgiler doğrultusunda 1210649 no ile TÜBİTAK tarafından desteklenen proje kapsamında yaygın olarak 5 farklı bölgeden seçilen (Tekirdağ, Konya, Ankara, Sivas ve Diyarbakır) buğday tarlalarından rizosferik toprak örnekleri kullanılmıştır. İlgili topraklardan total DNA izolasyonu yapıldıktan sonra *acdS* gen varlığı özelliği polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle taranmıştır. Aynı rizosferik toprak örneklerinden toplam 347 adet bakteri izole edilmiştir. ACC deaminaz enzim aktivitesine sahip olduğu düşünölen izolatlar, klasik ve spektrofotometrik analizler ile taranarak en iyi aktiviteyi gösteren 3 izolat seçilmiş ve *acdS* primerleri kullanılarak gen varlığı gösterilmiştir. Potansiyellerin değeriendirilmesi için domateslerin çimlenmesine olan etkileri test edilmiştir. Testlere göre AT1A-22 izolatının negatif kontrolüne göre 200 ve 220 mM tuz sıcaklığında kök kuru kapasitesi önemli bir değışim olmadığı, DT2A-4 izolatının kontrolüne göre 180 mM tuz konsantrasyonunda kök kuru ağırlığının arttırdığı, ST1A-17 izolatının 200 mM tuz sıcaklığında kontrole göre kök kuru ağırlığı arttırıldığı gözlemlenmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal testlerinin ardından 16S rDNA analizi ile seçilen 3 izolat AT1A-22 izolatı %99.84; DT2A-4 izolatı %100; ST1A-17 izolatı %99.91 benzerlik oranı ile sırasıyla *Pseudomonas azotoforms*; *Niallia circulans*; *Achromobacter spanius* türlerine benzetilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ACC Deaminaz, Rizosferik Bakteri İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyon.

ABSTRACT

Climate change and environmental issues have become one of the greatest threats to agricultural activities. Factors causing unfavorable conditions are referred to as stress. Plants use certain mechanisms to survive under stress conditions. One of these mechanisms is the increase in ethylene levels when the plant is exposed to stress. Excessive production of ethylene is termed as stress ethylene, which negatively affects the plant's survival under stressful conditions. Some plant growth-promoting bacteria that live symbiotically in plant roots produce the ACC deaminase enzyme. The ACC deaminase enzyme breaks down 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), the precursor of the ethylene hormone, thereby reducing stress ethylene levels in plants and promoting plant growth under both biotic and abiotic stress conditions.

Based on this information, within the scope of a project supported by TÜBİTAK under the number 121O649, rhizospheric soil samples were collected from wheat fields in five different regions (Tekirdağ, Konya, Ankara, Sivas, and Diyarbakır). After the total DNA was isolated from these soils, the presence of the *acdS* gene was screened using the polymerase chain reaction (PCR) method. A total of 347 bacterial isolates were obtained from the same rhizospheric soil samples. The ACC deaminase enzyme activities of the isolates were screened through classical and spectrophotometric analyses, and three isolates showing the best activity were selected. The presence of the *acdS* gene in these isolates was confirmed using specific primers. To evaluate their potential, the effects of these isolates on the germination of tomatoes were tested.

According to the tests, it was observed that; the AT1A-22 isolate showed no significant change in root dry weight under 200 and 220 mM salt concentrations compared to the negative control. The DT2A-4 isolate increased root dry weight under 180 mM salt concentration compared to the control. The ST1A-17 isolate increased root dry weight at 200 mM salt concentration compared to the control. Following physiological and biochemical tests, the 16S rDNA analysis identified the selected isolates as follows: The AT1A-22 isolate showed 99.84% similarity to *Pseudomonas azotoformans*, the DT2A-4 isolate showed 100% similarity to *Niallia circulans*, the ST1A-17 isolate showed 99.91% similarity to *Achromobacter spanius*.

Keywords: ACC Deaminase, Isolation of Rhizospheric Bacteria, Molecular Characterization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisi, anlayışı, emekleri, tüm maddi ve manevi destekleri için öncelikle değerli danışman hocam Doç. Dr. Mine Gül Şeker'e, Benimle tecrübelerini paylaşan, her zaman yardımcı olmaya çalışan Doktora Adayı Nida Arslan'a,

Desteğini esirgemeyen, hem labaratuvar arkadaşım hemde dostum Sena Usta'ya, Beni bugünlere getiren her zaman daha iyi yerlerde olmam için çabalayan, desteklerini esirgemeyen çok kıymetli canım annem Sabriye Bayrak'a ve çok kıymetli canım babam Bayram Bayrak'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Her zaman her koşulda yanımda olup sabrıyla ve anlayışıyla desteğini hiç esirgemeyen, her tökezlememde elimden tutan, beni çok şanslı, değerli hissettiren çok kıymetli canım eşim Ubeydullah Koçoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince beni 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| ÖZET | vi |
| SUMMARY | vii |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | xii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiii |
| TABLolar DİZİNİ | xv |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği | 3 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ | 4 |
| 2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteri | 4 |
| 2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakterilerin Etki Mekanizması | 5 |
| 2.2.1. Dolaylı (İndirekt) Etki Mekanizması | 6 |
| 2.2.1.1 Patojen Baskılama | 6 |
| 2.2.1.2 Toprak pH'sını Düzenleme | 7 |
| 2.2.2. Doğrudan (Direkt) Etki Mekanizması | 7 |
| 2.2.2.3 Azot Fiksasyonu | 7 |
| 2.2.2.4 Mineral Çözünürlüğünün Arttırılması | 8 |
| 2.2.2.5 Fitohormon Üretimi | 8 |
| 2.2.3. Etilen Hormonu | 8 |
| 2.2.4. Etilen Hormonun Bitki Üzerinde Etkileri | 9 |
| 2.2.5. Bakteriyel ACC Deaminaz Enzimi | 10 |
| 2.2.6. ACC Deaminaz Enzimi Etki Mekanizması | 10 |
| 2.2.7. Stres Altındaki Bitkiye Bakteriyel ACC Deaminaz Enzimine Sahip Mikroorganizmanın Etkisi | 11 |
| 2.2.8. ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip Mikroorganizmalar ile Yapılan Çalışmalar | 11 |
| 3. MATERYAL | 13 |
| 3.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşları | 13 |
| 3.2. Kullanılan Bitki Materyali | 13 |
| 3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar | 13 |
| 3.4. Kullanılan Besiyerleri | 15 |
| 3.5. Kullanılan Kimyasallar | 16 |
| 3.6. Kullanılan Çözeltiler | 18 |
| 3.7. Kullanılan Kitler ve DNA Belirteçleri | 19 |
| 4. YÖNTEM | 20 |
| 4.1. Buğday Tarlalarından Toprak Örneklerinin Alınması | 20 |
| 4.2. Topraktan Total DNA İzolasyonu | 20 |
| 4.3. AcdS Gen Bölgesini Belirlemek İçin Primer Tasarımı ve PZR | 20 |
| 4.4. Topraktan Bakteri İzolasyonu | 21 |
| 4.5. Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi | 22 |
| 4.6. ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip İzolatların DF Besiyerinde Taranması | 22 |
| 4.7. ACC Deaminaz Aktivitesinin Tespiti İçin Standart Eğri Grafiğinin Hazırlanması | 22 |

| | |
|---|----|
| 4.8. ACC Deaminaz Aktivitesinin Belirlenmesi | 24 |
| 4.9. ACC Deaminaz Pozitif Olduğu Düşünülen İzolatlar için Ön Tanımlama Testleri | 26 |
| 4.9.1. Gram Boyama | 26 |
| 4.9.2. Katalaz Testi | 27 |
| 4.9.3. Oksidaz Testi | 28 |
| 4.9.4. Spor Boyama | 28 |
| 4.10. ACC Deaminaz Pozitif Olduğu Düşünülen En İyi Üç İzolat için Biyokimyasal Testler | 29 |
| 4.10.1. IMViC Testi | 29 |
| 4.10.1.1 İndol Testi | 29 |
| 4.10.1.2 Metil Kırmızısı (MR) Testi | 30 |
| 4.10.1.3 Voges-Proskauer (VP) Test | 31 |
| 4.10.1.4 Sitrat Testi | 32 |
| 4.10.2. Oksidasyon/ Fermantasyon Testi | 33 |
| 4.10.3. Karbonhidrat Kullanımı Testi | 34 |
| 4.10.4. Argininin, Lizin ve Ornitin Dekarboksilaz Testi | 35 |
| 4.10.5. Üreaz Testi | 36 |
| 4.10.6. Fenilalanin Deaminaz Testi | 37 |
| 4.10.7. ONPG Testi | 38 |
| 4.11. Genomik DNA İzolasyonu | 39 |
| 4.12. Seçilmiş izolatların 16S rDNA Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması | 41 |
| 4.13. Domates Tohumu Petri Deneyleleri | 41 |
| 4.13.1. Bakteri İzolatlarının Tuzlu Besiyerinde Büyütülmesi | 41 |
| 4.13.2. Domates Tohumlarının Sterilizasyonu | 41 |
| 4.13.3. Domates Tohumları ve İzolatların İnokülasyonu | 42 |
| 4.13.4. Domates Tohumlarının Çimlenme ve Büyüme Parametrelerine Seçilmiş İzolatların Etkisinin Takibi | 42 |
| 5. BULGULAR | 43 |
| 5.1. Total DNA İzolasyonu | 43 |
| 5.2. acdS Gen Varlığının PZR ile Gösterilmesi | 44 |
| 5.3. Topraktan Bakteri İzolasyonu | 44 |
| 5.4. Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi | 45 |
| 5.5. ACC Deaminaz Üreten Bakterilerin Kalitatif Tayini | 60 |
| 5.6. ACC Deaminaz Aktivitesinin Kantitatif Ölçüm Sonucu | 60 |
| 5.7. Seçilen İzolatların Ön Tanımlama Test Sonuçları | 63 |
| 5.8. Seçilen İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları | 66 |
| 5.9. Genomik DNA İzolasyonu | 69 |
| 5.10. 16S rDNA Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi | 70 |
| 5.11. Dizi Analiz Sonuçları | 71 |
| 5.12. Seçilmiş İzolatların Tuz Stresinde Domates Tohumlarının Çimlenmeye Etkisi | 71 |
| 5.12.1. Gövde Uzunluğu | 72 |
| 5.12.2. Kök Uzunluğu | 75 |
| 5.12.3. Gövde Kuru Ağırlığı | 78 |
| 5.12.4. Kök Kuru Ağırlığı | 81 |
| 6. TARTIŞMA VE SONUÇ | 84 |
| KAYNAKLAR | 89 |
| ÖZGEÇMİŞ | 95 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| % | : Yüzde |
| °C | : Santigrat Derece |
| µg | : Mikrogram |
| µl | : Mikrolitre |
| µm | : Mikrometre |
| µM | : Mikromolar |
| cm | : Santimetre |
| Kg | : Kilogram |
| M | : Molar |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| ng | : Nanogram |
| nm | : Nanometre |
| A | : Absorbans |
| ACC | : 1-aminosiklopropan-1 karboksilat |
| Bç | : Baz Çifti |
| Bkz | : Bakınız |
| CAS | : Chrome Azurol S |
| Dk | : Dakika |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| <i>E. coli</i> | : <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | : Etilen Diamin Tetraasetik Asit |
| FTS | : Fizyolojik Tuzlu Su |
| G | : Gram |
| HCl | : Hidrojen Klorür |
| KOH | : Potasyum Hidroksit |
| MR | : Metil Kırmızısı |
| NaCl | : Sodyum Klorür |
| ONPG | : o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid |
| <i>P. vulgaris</i> | : <i>Proteus vulgaris</i> |
| BBTE | : Bitki Büyümesini Teşvik Edici |
| pH | : Power of Hydrogen |
| Ppm | : Milyonda Bir Birim |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| Rdna | : Ribozomal Deoksiribonükleik Asit |
| Rpm | : Dakikadaki Devir Sayısı |
| S | : Saat |
| SAM | : S-adenozilmetionin |
| <i>S. aureus</i> | : <i>Staphylococcus aureus</i> |
| TAE | : Tris Asetat EDTA |
| UV | : Ultraviyole |
| V | : Volt |
| VP | : Voges-Proskauer |
| w/v | : Ağırlık/hacim |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1: ACC-Deaminaz bibliyografik veri haritası. | 4 |
| Şekil 2.2: Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin direkt ve indirekt etki mekanizması. | 6 |
| Şekil 2.3: ACC Deaminaz enzimi etki mekanizması. | 10 |
| Şekil 4.1: α -ketobütrat mikroplaka görüntüsü. | 23 |
| Şekil 4.2: α -ketobütrat standart eğri grafiği. | 24 |
| Şekil 4.3: A: AT1A-16 izolata ait Gram boyama (Gram pozitif), B: KT2B-12 izolata ait Gram boyama (Gram negatif) görüntüsü. | 27 |
| Şekil 4.4: İndol Testi; 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3, 4, 5: Negatif izolatlar. | 30 |
| Şekil 4.5: MR Testi; 1: Boş besiyeri, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 5: Pozitif izolat, 4-6 : Negatif izolatlar. | 31 |
| Şekil 4.6: Sitrat Testi; 1: Boş besiyeri, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 4,6: Pozitif izolatlar, 5 : Negatif izolat. | 32 |
| Şekil 4.7: O/F testi, 0: Boş besiyeri, 1-2: <i>P. aeruginosa</i> -aerob, 3-4: <i>E. coli</i> -fakültatif anaerob, 5-6: Fakültatif anaerob, 7-8-9-10: İnert izolat. | 33 |
| Şekil 4.8: Glukoz kullanımı testi, 1: Pozitif kontrol (<i>E. coli</i>), 3: Pozitif izolat, 2-4: Negatif izolatlar. | 34 |
| Şekil 4.9: Arjinin testi, 1: Boş, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif Kontrol, 4: Pozitif izolat, 5: Negatif izolat, 6: İnert izolat. | 36 |
| Şekil 4.10: Lizin testi, 1: Boş, 2-3: Pozitif kontrol (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>), 4-6: İnert izolat, 5: Negatif izolat. | 36 |
| Şekil 4.11: Üreaz testi, 1: Pozitif kontrol (<i>P. vulgaris</i>), 2: Negatif kontrol (<i>E. coli</i>), 3-4-5: Negatif izolatlar. | 37 |
| Şekil 4.12: Fenilalanin deaminaz testi, 0: Boş, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-4-5: Negatif izolatlar. | 38 |
| Şekil 4.13: ONPG testi, 1: Boş, 2: Pozitif kontrol (<i>E. coli</i>), 3-4-5: Pozitif izolatlar. | 39 |
| Şekil 5.1: Toprak total DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: DT1 Toprağı, 2: DT2 Toprağı, 3: TT1 Toprağı, 4: TT2 Toprağı, 5: AT1 Toprağı, 6: AT2 Toprağı, 7: ST1 Toprağı, 8: ST2 Toprağı, 9: KT1 Toprağı, 10: KT2 Toprağı, 11: 1kb dna ladder (biomassNEB). | 43 |
| Şekil 5.2: <i>acdS</i> pzs ürünlerinin jel görüntüsü. 1: 100bp ladder, 2: Negatif kontrol, 3: DT1 toprağı, 4: DT2 toprağı, 5: TT1 toprağı, 6: TT2 toprağı, 7: AT1 toprağı, 8: AT2 toprağı, 9: ST1 toprağı, 10: ST2 toprağı, 11: KT1 toprağı, 12: KT2 toprağı. | 44 |
| Şekil 5.3: Farklı koloni morfolojilerine sahip izolatlardan bazıları. | 45 |
| Şekil 5.4: ACC içeren DF minimal besiyerinde; A: büyüme gösteren; acc deaminaz pozitif olduğu düşünülen izolat, B: büyüme göstermeyen acc deaminaz negatif olduğu düşünülen izolat. | 60 |
| Şekil 5.5: Genomik DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: 100bp marker, 2: Negatif kontrol bakterisi, 3: Pozitif kontrol bakterisi 4-6: izolatlar. | 69 |

| | |
|--|----|
| Şekil 5.6: PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: 100 bp marker, 2: Negatif kontrol, 3-5: PZR ürünleri. | 70 |
| Şekil 5.7: ATA1-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin gövde uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 72 |
| Şekil 5.8: DT2A-4 izolatının tuz stresi koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin gövde uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 73 |
| Şekil 5.9: ST1A-17 izolatının tuz stresi koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin gövde uzunluğuna etkisi. . PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 74 |
| Şekil 5.10: ATA1-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 75 |
| Şekil 5.11: DT2A-4 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 76 |
| Şekil 5.12: ST1A-17 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 77 |
| Şekil 5.13: AT1A-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 78 |
| Şekil 5.14: DT2A-4 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 79 |
| Şekil 5.15: STA1A-17 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 80 |
| Şekil 5.16: AT1A-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 81 |
| Şekil 5.17: DT2A-4 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 82 |
| Şekil 5.18: ST1A-17 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları. | 83 |

TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| Tablo 3.1: Kullanılan alet ve cihazlar. | 14 |
| Tablo 3.2: Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışı | 15 |
| Tablo 3.3: Kimyasallar. | 16 |
| Tablo 3.4: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı. | 18 |
| Tablo 3.5: Kullanılan kitler ve DNA belirteçleri. | 19 |
| Tablo 4.1: Polimeraz Zincir Reaksiyon Karışımı. | 21 |
| Tablo 4.2: PZR koşulları. | 21 |
| Tablo 4.3: a-ketobütrat standart eğri grafiği verileri. | 23 |
| Tablo 4.4: Sülfür-İndol-Hareketlilik testleri için pozitif ve negatif kontrol. | 30 |
| Tablo 4.5: Polimeraz Zincir Reaksiyon Karışım Miktarları. | 40 |
| Tablo 4.6: PZR koşulları. | 40 |
| Tablo 5.1: Toprak total DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm sonuçları. | 43 |
| Tablo 5.2: İzolat Sayısı | 44 |
| Tablo 5.3: İzolatların koloni morfolojilerinin değerlendirilmesine ait sonuçlar. | 46 |
| Tablo 5.4: Seçilen izolatların ACC deaminaz aktivite değerleri. | 61 |
| Tablo 5.5: İzolatların ön tanımlama testi sonuçları. | 63 |
| Tablo 5.6: Seçilmiş 3 izolatın hareketlilik, H ₂ S üretimi, IMViC ve üreaz testi sonuçları. | 67 |
| Tablo 5.7: Seçilmiş 3 izolatın oksidasyon-fermantasyon, lizin, ornitin, arjinin dekarboksilaz, fenilalanin deaminaz ve ONPG testi sonuçları. | 67 |
| Tablo 5.8: Seçilen 3 izolatın karbonhidrat kullanımı testi sonuçları. | 68 |
| Tablo 5.9: g DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm sonuçları. | 69 |
| Tablo 5.10: İzolatların 16S rDNA analiz sonuçları. | 71 |

1. GİRİŞ

İklim değişikliği ve beraberinde getirdiği çevre sorunları tarımsal faaliyetlere yönelik en büyük tehditlerden biri haline gelmiştir. Toprak tuzluluğu da tarımda büyük bir sorundur çünkü yaşam döngüleri boyunca gerçekleşen kuraklık, tuzluluk, aşırı yağış, sıcaklık veya soğuk gibi iklimsel değişikliklere bağlı abiyotik stres koşulları mahsulün büyüme ve gelişmesini doğrudan etkiler [Taiz vd., 2010]. Bitkiler tuz stresine tepki olarak çeşitli tolerans stratejileri geliştirir. Su kayıplarını azaltarak ya da su alımını arttırarak kurtulmaya çalışırlar ve bitki daha fazla suya ulaşabilmek için gövde uzamasını yavaşlatıp kök gelişimini tetikler. Diğer taraftan, kurak koşulların uzun sürmesi durumunda hem gövde hemde kök gelişimi durur, yaprak ve yaprak sayısı azalır hatta bazı yapraklar sararak dökülür [Yılmaz vd., 2011]. Aynı zamanda kuraklık gibi stres faktörleri etkisiyle etilen üretiminin arttığıda gözlemlenmiştir [Jacksons vd., 1985].

Bitkilerde stres yolağının en önemli unsurlarından biri olan etilen üretimi, karmaşık biyokimyasal yollar ve düzenleyici mekanizmalar içerir. Etilenin sentezi, S-adenozilmetionin (SAM) ile başlar ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) üzerinden devam eder. Bu süreçte, ACC sentaz (ACS) ve ACC oksidaz (ACO) enzimleri rol oynar. Özellikle, ACS, etilen biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimidir ve fosforilasyon ve ubikitinasyon gibi çeşitli faktörlerle sıkı bir şekilde düzenlenir [Xu ve Zhang, 2015].

Etilen, bitki büyüme ve gelişmesinde oldukça geniş bir etkiye sahiptir. Bu etkiler arasında tohum çimlenmesinden birçok organın ölümüne kadar pek çok süreç bulunmaktadır. Ayrıca dormansi kırılması, kök ve fide gelişimi ve farklılaşması, yan kök oluşumu, yaprak ve meyve yaşlanması gibi temel bitki fizyolojisi süreçlerinde de önemli rol oynar. Bazı bitkilerde ise çiçek oluşumu ve meyve oluşumunda da etkili olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda etilen, çeşitli bitki fizyolojik süreçlerinde ve çevresel uyaranlara yanıt olarak kritik bir fitohormon olarak rol oynar. Stres yanıtlarını yönetmek için çeşitli bitki hormonlarıyla etkileşime girer. Kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık dalgalanmaları gibi abiyotik stresler sırasında, etilen, metabolik yolları yeniden programlayarak ve absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA) ve

giberellinler (GA) gibi hormonlarla etkileşime girerek stres yanıtlarını düzenler [Kapoor vd., 2021]. Örneğin, su stresi altında olan çeltik bitkilerinde nitrat, etilen üretimini ve kök kortikal parenkima oluşumunu artırır. Bu, bitkilerin su stresi gibi olumsuz koşullara adaptasyonunda önemli bir rol oynar [Gao vd., 2021]. Bitkilerde 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz enzimini kodlayan gen *acdS* genidir. Yukarıda da bahsedildiği gibi *acdS* tarafından kodlanan bu enzim, etilen üretimini düşürerek bitki büyümesini teşvik eder ve bitkilerin tuz, kuraklık gibi abiyotik streslere karşı direncini artırır. *acdS* geninin bozulması, bitkilerin büyüme teşvik edici aktivitelerini ve stres direncini azaltırken, aşırı ifade edilmesi ise çiçek ömrünü uzatır ve kadmiyum stresine karşı toleransı artırır [Peng vd., 2021; Naing vd., 2022]. Bu zararlı etkilere karşı koymak için, bitkiler bazen ACC'yi (tüm yüksek bitkilerde atilenin öncüsü) parçalayarak hareket eden ACC deaminaz enzimi içeren bakteriyel ortaklara sahiptir. ACC deaminazın enzimatik aktivitesi, ACC seviyesini düşürerek çeşitli stres koşulları altında etilen sentezindeki aşırı artışları önleyen ve tuz stresine karşı bitki toleransını indükleyen en etkili mekanizmalardan biri olan α -ketobutirat ve amonyak üretimi ile sonuçlanır [Orozco-Mosqueda vd., 2019].

Bu bakteriyel ortaklar, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler olarak bilinen faydalı bakterilerdir. Bu bakteriler olumsuz koşullarda bitki büyümesini arttırmak için farklı etki mekanizmaları ile bitki gelişimini birçok yönden desteklediği yapılan araştırmalar sonucu ortaya koymuştur. Böyle bakteriler 'Plant Growth Promoting Rhizoacteria' (PGPR) olarak adlandırılırlar [İmriz vd., 2014]. Hem doğal yollarla bitki gelişimini arttırabilmeleri hemde çevre dostu olmaları sebebiyle son yıllarda PGPR'lerin önemi literatürde sıklıkla vurgulanmakta ve gelecekte bu mikroorganizmaların sürdürülebilir tarım için son derece önemli araçlar olacağı öngörülmektedir [Jacoby vd., 2017]. Bu tez çalışması kuraklık stresinde buğday rizosferik topraklarında ACC deaminazın varlığı ve ilgili enzim üretimi açısından en iyi izolatların seçilmesi, domates tohumlarının (1 haftalık ilk büyüme evresinde) tuzluluk stresi altında çimlenme oranları, kök, gövde uzunluk ve kalınlıkları ile yaş ve kuru ağırlığına olan etkileri araştırılmıştır.

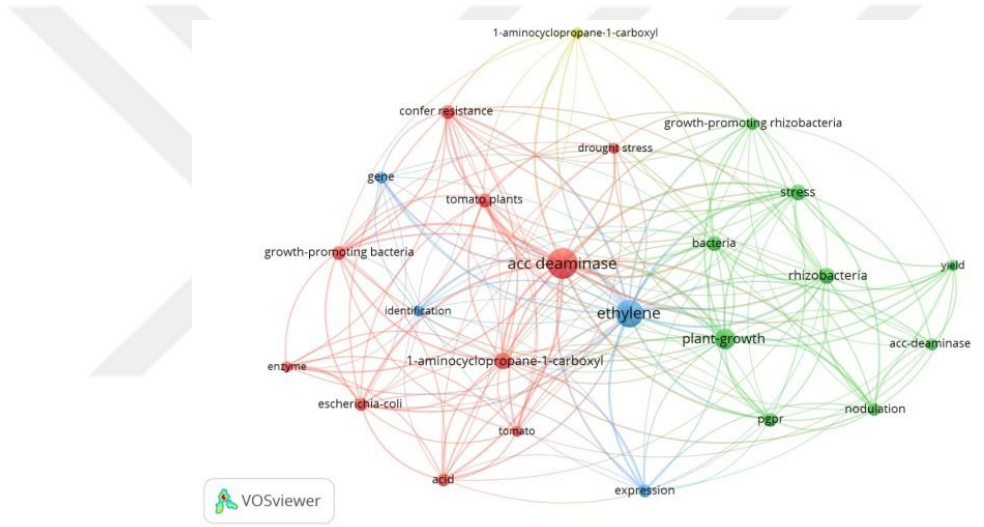
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tekirdağ, Ankara, Konya, Sivas ve Diyarbakır illerinde bulunan farklı buğday tarlalarından toplanan rizosferik toprak örneklerinden yeni bakteri izolatlarının ACC deaminaz üretebilme kabiliyetleri yönünden değerlendirilmesi yaklaşımıyla izolasyonlarının yapılması, saflaştırılması, ACC deaminaz aktivasyonları kantitatif ve kalitatif olarak belirlendikten sonra; en iyi aktivasyon gösteren en çok 3 bakteri izolatının seçilerek moleküler biyolojik yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanmasını ve *in vivo* düzeyde tuz stres koşulları altında domates tohumlarının çimlenme, kök ve gövde uzunlukları ile yaş ve kuru ağırlıklarına 1 hafta muameleden sonra etkilerinin değerlendirerek tarımda uygulanabilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmalar ile kuraklık stresi altında strese girerek verimi düşen bitkilerin verimini arttırmak için çevre dostu ve az maliyetli doğal gübre yapımı ya da var olan doğal gübre çalışmalarının geliştirilmesinde yerel izolatların kullanılması ile tarımda sürdürülebilirlik ve verimlilik artışı sağlanarak, kimyasal gübre kullanımının azaltılması için stratejilerinin oluşturulabilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yapılan tüm araştırmalar sonucunda VOSVIEWIR programı ile 1798 makale taranarak ACC deaminaz ile ilintili anahtar kelimeleri ve ana başlıkları inceleyerek bibliyografik veri haritası (şekil 2.1) hazırlanmıştır. ACC deaminazı merkeze almak koşuluyla literatürdeki ilişkili konu dağılımı etilen, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPR), ACC ve domates etrafında toplandığı ancak ACC deaminaz ile ilintili tuz stresi anahtar kelimesinin haritada yer almadığından dolayı tuz çalışmalarına literatürde bir boşluğu dolduracak şekilde tez çalışmasının literatüre katkı sağlanacağı düşünölmüştür.



şekil 2.1: ACC-Deaminaz bibliyografik veri haritası.

2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteri

Rizosfer, bitki kökleri etrafındaki birkaç santimlik toprak bölgesidir ve bitki ile toprak mikroorganizmaları arasındaki etkileşimleri içerir [Satar vd.,2022]. Bu bölgede, bitki kökleri etrafındaki toprakta bulunan mikroorganizma topluluğu rizosfer mikrobiyomu olarak ifade edilir. Bu topluluk, bakteri, mantar, protozoa ve diğer mikroorganizmalardan oluşur ve bitki kökleri ile yakın ilişki içinde yaşar [Qua vd.,2020]. En yaygın olarak bulunan türler ise bakterilerdir. Bu bölgede yaşayan bakterilerin; rizobakterilerin, varlığı bitki sağlığı ve büyümesi üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Bu etkiye sahip bakterilere bitki büyümesini teşvik eden

rizobakteriler (PGPR) denir. Bitki gelişimini artırmak ve bitkilerin genel sağlığını iyileştirmek amacıyla kullanılan faydalı mikroorganizmalardır. Bitki kökleriyle yakın ilişki içinde çalışarak bitki besin alımını kolaylaştırır. Aynı zamanda bitkilerin stres faktörlerine karşı direncini artırabilir, zararlı mikroorganizmalarla mücadelede yardımcı olabilir ve toprak yapısını iyileştirebilir. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler, tarımsal üretimde ve çevre dostu tarım uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Kazankaya, 2023]. Faydalı bakteriler genellikle toprak bakterileri ve endofitik bakteriler olarak sınıflandırılır [Meraklı vd., 2020]. Toprak bakterileri genellikle toprakta serbestçe hareket ederken endofitik bakteriler bitki içinde yaşar. Bunun yanı sıra, faydalı bakteriler ayrıca azot fiksasyonu, fosfat çözücü, siderofor üreten bakteriler gibi özelliklere göre de sınıflandırılabilir [Qlenska vd.,2020]. Bu sınıflandırma bitki-bakteri etkileşimlerini anlamak ve potansiyel uygulamalarını belirlemek için önemli bir temel oluşturur. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler arasında, azot fiksasyonu yapabilen bakteriler genellikle *Rhizobium*, *Azospirillum* ve *Azotobacter* gibi türleri içerir [Aasfar vd.,2021; Sumbul vd.,2020]. Bu bakteriler, atmosferik azotu bitkilerin kullanabileceği formda bağlayarak bitki besin maddelerinin alımını artırır.

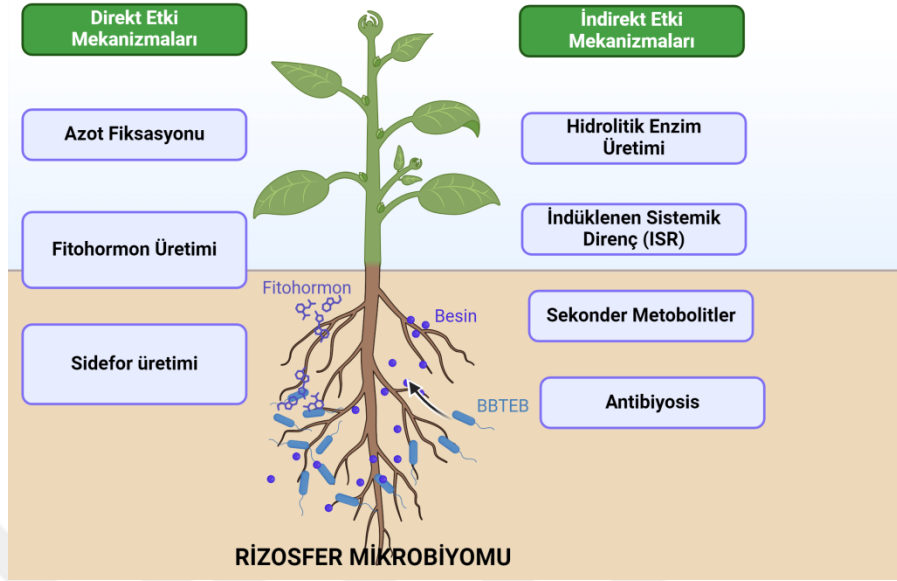
Aynı şekilde, fosfor çözücü bakteriler de topraktaki organik ve inorganik fosforu bitkiler için daha erişilebilir hale getirir. Bu tür bakteriler arasında *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas* sp. türleri bulunur [Aktan vd.,; Çobanoğlu, 2023]. Bu bakteriler, bitkilerin kök sistemleri etrafında fosforu çözer ve bitkilere sağlar, böylece bitki büyümesi ve gelişmesini destekler.

2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakterilerin Etki

Mekanizması

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin mekanizmaları doğrudan etki mekanizması ve dolaylı etki mekanizması olmak üzere iki ana kategoride incelenir. Bu mekanizmalar, bitki gelişimini teşvik eden ve bitki sağlığını olumlu yönde etkileyen unsurları içerir. Bakteriler, bitki kökleriyle doğrudan etkileşime geçerek besin alımını artırabilir, fitohormon üretimini teşvik edebilir ve patojenlere karşı bitkiyi koruyabilir [Wang vd.,2021]. Dolaylı etkileşim mekanizmaları ise toprak yapısını iyileştirerek bitki besin alımını artırabilir ve bitki stres toleransını artırabilir [Khan

vd.,2021]. Bu mekanizmaların anlaşılması, bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin tarımsal uygulamalardaki rolünü belirlemede önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.2: Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin direkt ve indirekt etki mekanizması.

2.2.1. Dolaylı (İndirekt) Etki Mekanizması

Bakterilerin bitki büyümesini teşvik etmek için dolaylı mekanizmalardan biri patojen baskılama işlemidir [Dimkic vd., 2022; Chakraborty vd., 2020]. Bu mekanizma, bitki kökleri üzerinde antagonistik etkiler oluşturarak patojen mikroorganizmaların büyümesini engeller [El-Saadony vd., 2022]. Diğer bir dolaylı etki mekanizması ise toprak pH'sının düzenlenmesidir. Bakteriler, toprakta bulunan mineralleri ayırarak bitkilerin pH dengesini düzenler ve bu sayede bitkilerin sağlıklı bir şekilde büyümesini sağlar. Ayrıca tozlaşma ve tohum verimliliği de bakterilerin dolaylı etki mekanizmalarından biridir. Bu mekanizma sayesinde bakteriler, bitkilerin tozlaşmasını ve tohum verimliliğini artırarak bitki büyümesini teşvik eder.

2.2.1.1 Patojen Baskılama

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerinin patojenlere karşı etkinlikleri, bitki köklerinde yaşayan bu yararlı bakterilerin patojenleri inhibe etme yeteneklerini ifade eder ve patojenlere karşı mücadele mekanizmaları çeşitli biyolojik, kimyasal ve

fiziksel yolları içerir. Bazı *Pseudomonas* türü bakterileri hidrojen siyanit sentezleme yeteneğiyle mantarların gelişiminin engellenmesi, mantar enfeksiyonunda enfekte eden zararlı bileşikleri enzim üretilip parçalayarak, bitki köklerinde mantar ile besin rekabatine girerek bitkinin kökünün korunmasını sağlayarak bitkilerin hastalıklara karşı direncinin artmasını sağlar [Çakmakçı., 2005].

2.2.1.2 Toprak pH'sını Düzenleme

Toprak pH'sının düzenlenmesi, bakterilerin bitki büyümesini teşvik etmek için kullandığı dolaylı etki mekanizmasıdır. Bakteriler, toprakta bulunan mineralleri ayırarak bitki köklerine yararlı olan besin maddelerini serbest bırakır ve toprak pH dengesini sağlar. Bu sayede bitkilerin besin alımı ve büyümesi için uygun bir ortam oluşturur ve toprak verimliliğini artırır. Bu mekanizma, bitki köklerinin sağlıklı bir şekilde büyümesini destekler.

2.2.2. Doğrudan (Direkt) Etki Mekanizması

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin doğrudan etki mekanizmaları, fitohormon üretimi, azot fiksasyonu ve mineral çözünürlüğünün artırılması gibi önemli süreçleri içerir [Etesami vd., 2020]. Bu mekanizmalar sayesinde bakteriler bitkilerin büyümesini ve gelişmesini destekler. Fitohormon üretimi, bakterilerin bitkilerin hormon dengesini düzenleyerek büyümelerini teşvik etmelerine yardımcı olur [Khan vd., 2020]. Azot fiksasyonu ise bakterilerin atmosferik azotu bitkilerin kullanabileceği formda bağlaması sayesinde bitkilerin beslenmesini sağlar [Bicek, 2021]. Ayrıca, bakterilerin mineral çözünürlüğünü artırması, bitkilerin kökleri tarafından daha kolay alınabilen mineral elementlere dönüştürülmesine yardımcı olur.

2.2.2.3 Azot Fiksasyonu

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin azot fiksasyonu mekanizması, azot fiksasyonu yapabilen mikroorganizmaların nitrojenaz enzimi ile atmosferik azotu bitkilerin kullanabileceği formda (NH_3) bağlamalarını içerir. Bu mekanizma sayesinde bakteriler, özellikle baklagiller gibi azot fiksasyonu yapabilen bitkilerin kökleriyle simbiyotik ilişki kurarak azotu amonyak ve diğer bitkiler tarafından

kullanılabilen bileşiklere dönüştürür [Pašmionka vd., 2021]. Bu sayede, bitkilerin azot ihtiyacını karşılayarak sağlıklı büyümelerini ve yeterli verim almalarını sağlar.

2.2.2.4 Mineral Çözünürlüğünün Arttırılması

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin mineral çözünürlüğünü artırma mekanizması, bitkilerin kökleri tarafından daha kolay alınabilen mineral elementlerin salınımını sağlar. Bu mekanizma sayesinde bakteriler, fosfor, demir, çinko gibi önemli elementlerin bitkiler tarafından kullanılabilir formda olmasını sağlar. Böylece, bitkilerin beslenmesi ve büyümesi için gerekli olan minerallerin daha etkili bir şekilde alınmasına yardımcı olur. Bitkiler için en önemli makroelementlerden ikincisi ise fosfordur. Bazı bakteri türleri özellikle *Pseudomonas* ve *Bacillus* gibi, fosforu çözünür formda bitkilere sağlama yetenekleriyle tanınır [Pantigoso vd., 2023]. Fosfor, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için temel bir besin maddesidir. Bu nedenle fosfat çözünürlüğünün arttırılması, bitki beslenmesini iyileştirir ve bitkisel ürün verimliliğini artırır. Ayrıca, bu bakteriler fosforun toprakta daha fazla kullanılabilir hale gelmesine yardımcı olarak toprak verimliliğini artırır [Tian vd., 2021].

2.2.2.5 Fitohormon Üretimi

Fitohormon üretimi, bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin en önemli etki mekanizmalarından biridir. Bu mekanizma, bakterilerin bitkilerin büyüme hormonları olan sitokinin, oksin, gibberellin ve etilen gibi hormonları üretmesini içerir. Bu fitohormonlar, bitkilerin kök gelişimini, çiçeklenmeyi, meyve olgunlaşmasını ve genel büyüme aktivitelerini düzenlemeye yardımcı olur [Fenn vd., 2021]. Ayrıca, bakterilerin ürettiği fitohormonlar, bitkilerin stres koşullarına karşı dirençlerini arttırarak bitki büyümesini teşvik eder [Fadiji vd., 2021].

2.2.3. Etilen Hormonu

Etilen, bitkilerde bir hormon olarak görev yapan gaz halinde bir bileşiktir. Bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Genellikle olgunlaşma, yaprak ve meyve dökümü gibi süreçler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca bitkilerin stres tepkileri ve savunma mekanizmalarında da etkili bir role sahiptir.

Biyotik; patojen enfeksiyonu ve abiyotik stres; toprakta metal birikmesi, kuraklık, mekanik yaralanmalar, toprağın tuz oranında artış gibi koşullarda bitkinin strese tepki vermesini sağlar bu nedenle stres hormonu olarakta bilinmektedir [Kaynak vd., 1997; Johnson vd., 1998)]. Bitkilerde etilen üretimi enzimatik tepkimeler sonucunda metionin ve birkaç diğer amino asitten türetilen S-adenozil metiyonin (SAM) gibi bileşikler, etilene dönüştürülür. Etilenin bitkilerde denge mekanizmaları, genellikle etilenin sentezlenmesini kontrol eden genlerin ifade düzeylerine ve etilenin hücre içinde yıkılmasına bağlıdır [Depaepe vd., 2020; Rather vd., 2023]. Bu denge mekanizmaları, bitki büyümesi, gelişmesi ve stres yanıtlarında kritik bir rol oynar.

2.2.4. Etilen Hormonun Bitki Üzerinde Etkileri

Etilen hormonunun bitkiler üzerinde etkisi incelendiğinde, tohum dormansisinin kırılması, köklerin oluşumu, uzaması ve farklılaşması, çiçeklenmenin sonlanması, yaprak ve meyve dökümü gibi mekanizmalarda etkilidir [Abeles vd., 1992]. Aynı zamanda etilen reseptörleri, bitki hücrelerinin çeşitli bölgelerinde bulunur ve bu reseptörler, etilen sinyal molekülünü algıladıklarında hücrel tepkileri başlatmak için bir dizi olayı tetikler [Fatma vd., 2022].

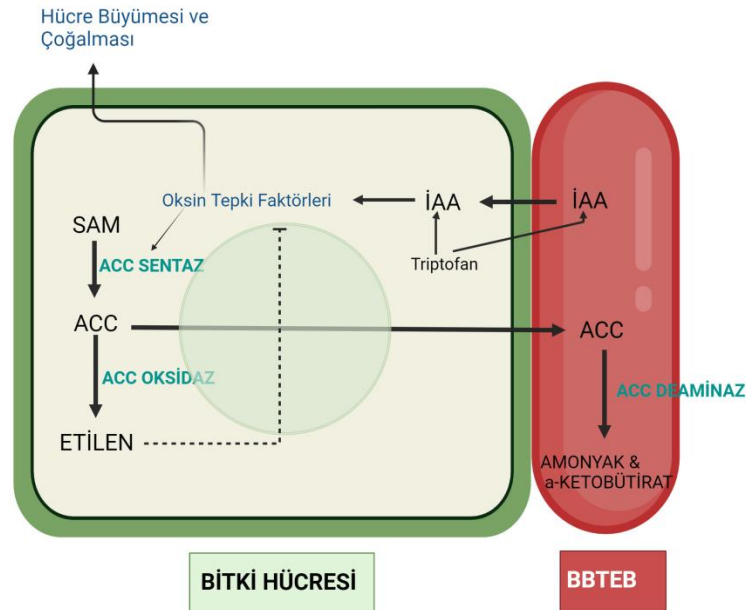
Etilen sinyal molekülünün algılanması genellikle plazma zarında gerçekleşir ve reseptörler, etilen bağlanmasının ardından sinyal iletim yollarını hızlandırarak hücrel yanıtları başlatır; gen aktivasyonu veya gen bastırılmasında görev alır. Düşük düzeyde etilenin kök gelişimini teşvik etmektedir. Etilen, bitki köklerinin uzamasını teşvik ederek kök hacmini artırır ve kök sistemini geliştirir. Bu da bitkinin besin ve su alımını artırarak genel büyüme ve gelişimini destekler. Ancak, hızlı bir şekilde gelişen köklerin yüksek miktarda etilen sentezine sebep olması kök uzamasını engellemektedir. Bu durumda bitki köklerinin büyüme potansiyeli azalır ve genel olarak bitki büyümesi olumsuz etkilenir [Mattoo vd., 1991; Ma vd., 1998]. Etilen hormonu bitki gelişiminde büyük bir öneme sahip olmasına rağmen stres koşullarındaki bir bitkinin stres tepkisinin bir parçası olarak kök uzamasını azaltması, nodülasyonu ve oksin taşınmasını engelleyerek bitki gelişimini olumsuz etki ederek bitki gelişimini engellemektedir [Arshad vd., 1991].

2.2.5. Bakteriyel ACC Deaminaz Enzimi

ACC deaminaz ilk olarak toprak mikroorganizmasında keşfedilmiştir. ACC deaminaz, alt birim moleküler kütlesi yaklaşık 35-42 kDa olan multimerik bir enzimdir. Bitkilerde etilen hormonunun öncü maddesi olan 2:1-aminosiklopropan-1 karboksilat (ACC)'yi amonyak ve α -ketobütirata dönüştürür [Honna vd., 1978]. Bakteriyel ACC deaminaz enziminin işleyişi Glick vd., (1998) tarafından bulunmuştur.

2.2.6. ACC Deaminaz Enzimi Etki Mekanizması

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler tarafından indol asetik asit (İAA) tohum kabuğu ve kök eksüdatlarında bulunan triptofan ve diğer küçük moleküllere yanıt olarak üretilir. Yeni sentezlenen İAA'nın bir kısmı bitki tarafından alınır ve bitki sitoplazmasında içsel İAA ile birleşir [Hong vd., 1991; Fallik vd., 1994]. Bu durumda bitki büyümesi ve çoğalması indüklenir. Alternatif olarak İAA, SAM molekülünü ACC'ye dönüştürmek için ACC sentaz enziminin aktivasyonunu uyarabilir. Dönüştürülen ACC'nin bir kısmı tohum kabuğu ya da bitki köklerinden dışarı atılarak bakteri tarafından alınır. ACC molekülü ACC deaminaz enzimi ile ACC'yi amonyak ve α -ketobütirata hidrolize eder [Glick vd., 1998].



Şekil 2.3: ACC deaminaz enzimi etki mekanizması.

2.2.7. Stres Altındaki Bitkiye Bakteriyel ACC Deaminaz Enzimine Sahip Mikroorganizmanın Etkisi

ACC deaminaz, bitkilere abiyotik stres altında yardımcı olarak, bitkinin büyümesini ve hayatta kalması üzerinde olumsuz etkisi olan bir stres hormonu olan etilen seviyelerini düzenler. Çeşitli bitki büyümesini teşvik eden bakteriler tarafından üretilen bu enzim, etilen öncüsü ACC'yi (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) amonyak ve α -ketobutirata dönüştürerek etilen sentezini azaltır. Bu süreç, stres etkilerini hafifletir ve olumsuz koşullar altında bitki büyümesini teşvik eder. Örneğin, ısı stresine maruz kalan mısır bitkilerinde, ACC deaminaz üreten bakteriler fizyolojik aktiviteleri artırmış, biyokütleyi çoğaltmış ve süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimatik işlevleri iyileştirmiştir [Rafi vd., 2022]. Ayrıca, ACC deaminaz, etilen seviyelerini sınırlayarak ve bir stres modülatörü olarak hareket ederek tuz stresi, su kıtlığı, aşırı sıcaklıklar ve ağır metal kontaminasyonu gibi çeşitli abiyotik stresleri hafifletmede etkilidir [Shahid vd., 2023].

2.2.8. ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip Mikroorganizmalar ile Yapılan Çalışmalar

Bakteriyel ACC deaminaz, bitkilerde etilen seviyelerini düzenleyerek stresin azaltılmasında önemli bir rol oynar. Bu, çeşitli stres koşullarında bitki büyümesini ve dayanıklılığını artırmada önemli rol oynar.

Herpell vd., (2023) tarafından yapılan çalışma, *Paraburkholderia dioscoreae*'nin domates yapraklarını kolonize ederek ACC deaminaz üretimi ile büyümeyi teşvik edebileceğini göstermektedir. Bu, bitki stres direncini artırmada yaprak uygulamaları için bir potansiyel olduğunu işaret etmektedir [Herpell vd., 2023]. Shahid vd., (2023), ACC deaminazın biyokimyası ve genetiği hakkında ayrıntılı bilgiler sağlayarak, çeşitli çevresel stresler altında bitki büyümesini ve ürün verimliliğini artırmadaki rolünü vurgulamaktadır [Shahis vd., 2023].

Rafi vd., (2022) ise, ACC deaminaz üreten bakterilerin ısı stresindeki mısır bitkilerine uygulanmasının fizyolojik aktiviteleri ve biyokütleyi önemli ölçüde artırdığını göstermektedir [Rafi vd., 2022]. Roy Choudhury vd., (2023), ACC deaminaz üreten endofitik bakterilerin kırmızı biberde tuz stresi altında büyümeyi ve stres toleransını artırdığını, etilen aracılı PR sinyalizasyonunu aşağı regüle ederek gösterdiğini ortaya koymaktadır [Roy Choudhury vd., 2023].

Baltacı Kadioğlu (2013), farklı bitki rizosferlerinden soğuğa karşı dirençli ve ACC deaminaz üreten bakterilerin izolasyonunu ve karakterizasyonlarını yaparak soğuk stresinde bitkilerin büyümesinin teşvik edici izolatlar elde etmiştir [Baltacı Kadioğlu vd., 2013]. Ateş (2017), Eskişehir ve çevresindeki tuzlu topraklarda yetişen buğday bitkilerinin köklerinden, ACC deaminaz enzimi içeren bakteri türlerini izole etmiş ve tür tanımlamalarını gerçekleştirmiştir. Sonraki aşamada, izole edilen bakteri türlerinin tuzlu koşullarda etkinliklerini değerlendirmiştir. Etkinliği yüksek olan bakteri izolatları için saksı denemeleri düzenlemiştir. Çalışma sonucunda, ACC deaminaz içeren bakterilerle aşılana buğday bitkilerinde, kontrol grubuna kıyasla saksı başına verim, biyokütle, karotenoid miktarı, membran stabilite indeksi ve potasyum değerlerinde artış göstermektedir [Ateş ., 2017].

Son olarak, Gupta vd., (2022), ACC deaminaz üreten PGPR'nin *Pisum sativum*'daki ozmotik ve tuz streslerini hafifletmek için kullanımını araştırarak, büyüme ve antioksidan aktivitelerinde iyileşme sağladığını göstermektedir [Gupta vd., 2022].

3. MATERYAL

Bu bölümde deney boyunca kullanılan mikroorganizmalar, bitki materyali, alet ve cihazlar, besiyerleri ve hazırlanışı, kimyasallar, çözeltiler ve hazırlanışı, kullanılan kitler listelenmiştir.

3.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Bacillus cereus DSMZ 4312, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas putida* KT244, *Enterococcus faecalis* ATCC 8213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* (laboratuvar izolatu), *Proteus vulgaris* (laboratuvar izolatu), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kontrol soyları, Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyota Laboratuvarı stoklarından temin edildi.

3.2. Kullanılan Bitki Materyali

Seçilmiş izolatların domates tohumlarında tuz stresine maruz bırakılarak çimlenmeye etkilerinin incelenmesi deneylerinde alyanak F1 (E-Z Tohumculuk) cinsi domates kullanıldı.

3.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tez çalışması boyunca Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyota Laboratuvarının aşağıda sıralanan alet ve cihazları kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Kullanılan alet ve cihazlar.

| Cihaz | Marka |
|------------------------|---|
| +4,-20 °C Buzdolabı | Vestal |
| -80 °C Derin Dondurucu | Thermo Scientific, Forma 86°C ULT Freezer |
| Biyogüvenlik Kabini | Thermo Electron Co. |
| Çalkalayıcı | Orbital Shaker-Incubater |
| Çeker Ocak | Tezsan |
| Etüv | Vwarincu-Line |
| Etüv | Heraeus |
| Güç Kaynağı | Cleaver Scientific Ltd |
| Hassas Terazı | Kern Ew |
| Jel Tankı | Bio-Rad |
| Nefhelometer Cihazı | Becton Dickinson |
| Manyetik Karıştırıcı | WiseStir |
| Mikrodalga | BlueSky |
| Mikroplaka Okuyucu | VarioSkan |
| Mikrosantrifüj | Beckam Coulter Microfuge 18 Santrifüj |
| Mikroskop | Nikon Elipse E100 |
| Otoklav | Hirayama 110L |
| pH Metre | Hanna Ins |
| Santrifüj | Gyrozen 124BR |
| UV Görüntüleme Cihazı | Vilber Laurmat Infinity-3026WL/26M |
| Vortex | Dihan Scientific |

3.4. Kullanılan Besiyerleri

Deneyleerde kullanılan besiyeri ve hazırlanışı Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışı.

| Besiyeri | Hazırlanışı |
|------------------------------------|---|
| Christensen Üre Agar | 1 gram pepton, 1 gram glukoz, 5 gram NaCl, 2 gram KH ₂ PO ₄ ve 0,012 gram fenol kırmızısı, 100 ml distile suda çözülerek karışımın pH'ı 6.7'ye ayarlandı. 0,22 µm gözenek çaplı bir filtreden geçirildi. 15 gram agar, 900 ml distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlandı. Soğuduktan sonra karışım karıştırılarak yatay bir pozisyonda katılaşması sağlandı. |
| DF Minimal Tuz Besiyeri (modifiye) | Glikoz 2 g Glukonik asit 2 g Sitrik asit 2 g KH ₂ PO ₄ 4 g Na ₂ HPO ₄ 6 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0.2 g FeSO ₄ .7H ₂ O 1 mg HBO ₃ 10 µg MnSO ₄ .2H ₂ O 11,19 µg ZnSO ₄ .7H ₂ O 124,6 µg CuSO ₄ .7H ₂ O 78,22 µg MoO ₃ 10 µg, ACC 0,3 g Agar 12 g. Besiyeri içeriği ACC eklenmeden 950 ml dH ₂ O ile çözdürülüp pH 7,2±0,2 ye ayarlandıktan sonra 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. ACC 50 ml dH ₂ O ile çözdürüldükten sonra 0,2 µm filte ile steril hale getirildi. Ardından ılımış olan 950 ml besiyeri üzerine eklendi. |
| LB Agar (MILLER) | 40 gr LB Agar 1L dH ₂ O ile çözdürülüp, 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. |

Tablo 3.2: Devam.

| | |
|---|---|
| LB Sıvı Besiyeri (MILLER) | 25 gram LB sıvı besiyeri 1 litre dH ₂ O'da çözüldü. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. |
| Metil Kırmızısı-Voges Proskauer (MR-VP) Sıvı Besiyeri (Biolife) | 17 gram MR-VP sıvı besiyeri 1 litre dH ₂ O'da çözüldü. Tüplere bölünerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. |
| Moeller Dekarboksilaz Sıvı Besiyeri (BD) | 10,5 gram Moeller dekarboksilaz sıvı besiyeri 1 litre dH ₂ O'da çözüldü. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. |
| ONPG Sıvı Besiyeri (Himedia) | 13,10 gram ONPG tozu 1 litre saf su içinde çözüldü. Karışım, manyetik bir karıştırıcı kullanılarak ısıtıldı ve kaynatıldı. Daha sonra, steril cam tüplere 1 mililitre olacak şekilde aktarıldı ve kullanıma hazır hale getirildi. |

3.5. Kullanılan Kimyasallar

Deneyleerde kullanılan kimyasallar Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Kimyasallar.

| Kimyasal Adı | Markası |
|------------------------------------|---------------|
| Alkoller | |
| Etil Alkol | Düzey Lab |
| Gliserol | Sigma Aldrich |
| Ayırıcılar | |
| Bromtimol Mavisi | Sigma Aldrich |
| Fenol Kırmızısı | Neofroxx |
| Kovac's Ayıracı | Biolife |
| Metil Kırmızısı | Merck |
| N'N'N'N'-tetrametil-pfenilendiamin | Sigma Aldrich |
| 2,2 Dinitrofenil hidrazin | Sigma Aldrich |
| Bileşikler | |
| ACC | TCI |

Tablo 3.3: Devam.

| | |
|---|----------------------|
| Agaroz | Prona |
| Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Merck |
| Çinko sülfat heptahidrat (ZnSO ₄ .7H ₂ O) | Sigma |
| Demir II sülfat heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O) | Sigma |
| Dipotasyum Fosfat (K ₂ HPO ₄) | Merck |
| Disodyum Fosfat (Na ₂ HPO ₄) | Merck |
| Glikoz | Riedel de Hain |
| Glukonik Asit | TCI |
| Hidroklorik asit (HCl) | Sigma |
| Hidrojen Borat (HBO ₃) | Sigma |
| Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) | Sigma Aldrich |
| İndol-3-asetik Asit | Sigma Aldrich |
| Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O) | Tekkim |
| Molibden Trioksit (MoO ₃) | Merck |
| Pepton Water | Merck |
| Sitrik Asit | Sigma |
| Sodyum Hidroksit (NaOH) | Sigma Aldrich |
| Tris | Sigma Aldrich |
| α-ketobütirat | Santa Cruz |
| Boyalar | |
| 6X Jel Yükleme Boyası | Thermo Scientific |
| Gram Boyama Seti | Sigma Aldrich |
| Kristal Viyole | Merck |
| Malaşit Yeşili | Merck |
| Safe Red Jel Boyası | Intron Biotechnology |

3.6. Kullanılan Çözeltiler

Deneyde kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

| Çözelti | Hazırlanışı |
|---|---|
| %0,1 Kristal Viyole | 0,1 gram kristal viyole 10 ml %95 etanolde çözüldü. Üzerine 90 ml dH ₂ O eklendi. Filtre edildi. |
| %0,5 Bromtimol Mavisi | 5 mg bromtimol mavisi 1 ml dH ₂ O'da çözülüp son hacim 0.2 M KOH ile 10 ml'ye tamamlandı. |
| %40 (w/v) KOH | 20 gram KOH 50 ml dH ₂ O'da çözüldü. |
| %1 (w/v) Malaşit Yeşili | 1 gram malaşit yeşili 100 ml dH ₂ O'da çözüldü. |
| %1 (w/v) N'N'N'N'-tetrametil-pfenilendiamin | 0,1 gram N'N'N'N'-tetrametil-pfenilendiamin 10 ml dH ₂ O'da çözüldü. |
| %3 H ₂ O ₂ | 3 ml H ₂ O ₂ üzerine 97 ml dH ₂ O eklendi. |
| %0.8 (w/v) | 0.8 g w/v tartıldı. 1X TAE tamponunda mikrodalga fırınında eritildi. 50°C'ye kadar soğuşunca 3µl Red Safe eklendikten sonra jel tarağı yerleştirilmiş jel tepsisine dökülerek donması beklendi. |
| 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6)/ 1L | 12.114 g tris 600 ml distile çözdürülüp, sonrasında çözelti 1000 ml' e tamamlandı. 0,1 M HCl ile pH 7.6' ya ayarlandı. |
| 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5)/ 1L | 12.114 g tris 600 ml distile suda çözdürülüp, sonrasında çözelti 1000 ml' e tamamlandı. 0,1 M HCl ile pH 8.5'e ayarlandı. |
| 0,56 M HCl | 4,67 ml %37'lik HCl 50 ml distile suya eklendi ve iyice karıştırılarak üzeri 100 ml' ye tamamlandı. |
| 1X TAE Buffer | 20 ml 50X TAE buffer üzerine 980 ml dH ₂ O eklendi. |
| 50X TAE Buffer | 242 gram Tris-base 700 ml dH ₂ O'da çözüldü. 57,1 ml %100 asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklendi. dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı. |

Tablo 3.4: Devam.

| | |
|-------------------------------|---|
| 2 N NaOH | 8 g NaOH 100 ml dH ₂ O ile çözüldü. |
| Dinitrofenil Hidrazin Ayıracı | 16.5 ml HCl distile suya eklendi ve 100 ml' e tamamlandı. 0,2 g DNFH boyası eklenip yarım saat karıştırılarak çözdürüldü. |
| Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) | 8,5 gram NaCl 1 litre dH ₂ O'da çözüldü. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. |

3.7. Kullanılan Kitler ve DNA Belirteçleri

Kullanılan kitler ve DNA belirteçleri Tablo 3.5' de verilmiştir.

Tablo 3.5: Kullanılan kitler ve DNA belirteçleri.

| Adı | Markası |
|---|-------------------|
| DreamTaq Green DNA Polymerase | Thermo Scientific |
| Quick-DNA Fungal/Bakteriyel Miniprep Kiti | ZymoBiomics |
| ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit | ZymoBiomics |
| PureLink RNA Mini Kit | Life Technologies |
| 100 bp ladder plus | Fermentas |
| 1 kb ladder | Biolabs |

4. YÖNTEM

4.1. Buğday Tarlalarından Toprak Örneklerinin Alınması

1210649 no'lu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında toprak örnekleri coğrafi konum, mesafe, toprak yapısındaki farklılıklar dikkate alınarak buğday ekimi yapılan; Tekirdağ, Ankara, Konya, Sivas, Diyarbakır illerinden 12 mikrobölge seçilerek 0-15 santimetre derinliklerinden 500 gramdan aşağı olmayacak şekilde toplanan toprak örnekleri izolasyon için kullanılmıştır [Acet ., 2023].

4.2. Topraktan Total DNA İzolasyonu

Rizosferik toprak örneklerinde *acdS* geninin tespiti amacıyla, topraktan total DNA izolasyonu ZymoBiomics DNA Miniprep Kiti kullanılarak üretici talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen total DNA örneklerinden 3 µl alınarak 1 µl yükleme boyası ile karıştırıldı ve %0,3 agaroz jel üzerinde 90 V'ta 30 dakika süreyle elektroforez tankında yürütüldü. Yürütme işleminin ardından, DNA'nın varlığı UV görüntüleme sistemi ile doğrulandı. Ayrıca, DNA örneklerinin miktarı ve saflığı NanoDrop Lite (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak analiz edildi.

4.3. *acdS* Gen Bölgesini Belirlemek İçin Primer Tasarımı ve PZR

Jaya vd., (2019), stres altındaki ananasın rizosferinden izole ettikleri rizobakterileri tanımlamak için NCBI'da depolanan tanımlanmış sekansları kullanarak *acdS* geninin biyoinformatik bir çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada *P. putida* UW4 (AY823987), *P. fluorescens* KACC 10070 (JQ646055), *P. entomophila* PS-PJH (FJ882923), *P. oryzae* LP11 (JF741959) ve *Pseudomonas* sp. ACP (M73488) gibi beş farklı *Pseudomonas* suşunun sekansları MEGA yazılımına entegre edilmiş ve MUSCLE 7.0 programıyla hizalanmıştır. Daha sonra bu hizalanmaları kullanarak korunmuş ve benzersiz bölgelere dayalı olarak 105F-*acdS* (5'-TGCCAAGCGTGAAGACTGC-3') ve 244R-*acdS* (5'-

GGGTCTGGTTCGACTGGAT-3') primerlerini tasarlamışlardır. Tasarlanan bu primerlerle gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) yöntemini kullanarak erime tepe grafiği analizi yapmışlar ve bu sayede 4 farklı bakteri izolatının *acdS* gen bölgesinin varlığını göstermişlerdir [Jaya vd., 2019]. Literatürden faydalanarak Genoks firmasından primer siparişi verilerek polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1: Polimeraz Zincir Reaksiyon Karışımı.

| Reaktif | Miktar (1X örnek) |
|-------------------------------|-------------------|
| 10X DreamTaq Buffer | 2 µL |
| dNTP Mix 10 µM | 0.4 µL |
| Forward primer 25 µM | 0,4 µL |
| Reverse primer 25 µM | 0,4 µL |
| Kalıp DNA | 50 ng |
| DreamTaq DNA Polymerase 5U/ul | 0,1 µL |
| Apirojen Su | 15,7 µL |

Tablo 4.2: PZR koşulları.

| Aşama | Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü |
|--------------|---------------|-------|-------|
| Denatürasyon | 95 | 3 dk | 35 |
| | 95 | 30 sn | |
| Bağlanma | 58 | 1 dk | |
| Uzama | 72 | 1 dk | 1 |
| Son Uzama | 72 | 10 dk | |

4.4. Toprakta Bakteri İzolasyonu

Toprakta bakteri izolasyonu için +4°C'de saklanan 5 adet rizosferik toprak örneklerinden (2 tekrarlı) birer gram tartılarak mikroorganizmaların canlanması amacıyla 9 ml peptonlu su içeren uzun cam tüplere aktarıldı. Düşük derecede vortex ile karıştırıldıktan sonra toprak örneklerinin peptonlu su içinde çözünmesi sağlandı. Her bir toprak örneği için iki kültür hazırlanarak farklı sıcaklıklarda üreme sağlayan (30°C ve 37°C) mikroorganizmaların canlanabilmesi amacıyla 24, 48 ve 72 saat olmak üzere inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında cam tüplerdeki

örneklerden 1 ml alınarak steril fizyolojik tuzlu su ile 10^{-1} - 10^{-8} seri dilüsyonları gerçekleştirildi. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlarından 100 µl alınarak Luria Bertani (LB) katı besiyerine steril cam Drigalski spatülü ile yayma ekim yapıldı. Petriler 30 ve 37°C; 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından gelişim gösteren koloniler stereo mikroskop altında koloni morfolojileri incelenerek yeni LB katı besiyerine ekim yapılarak saflaştırıldı.

4.5. Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi

Katı besiyerine yayma ekim yapılan izolatların inkübasyonu sonrası koloni rengi, şekli, yüksekliği, kenarı, yüzeyi, optik özelliği ve boyutları incelenerek özellikleri kaydedildi.

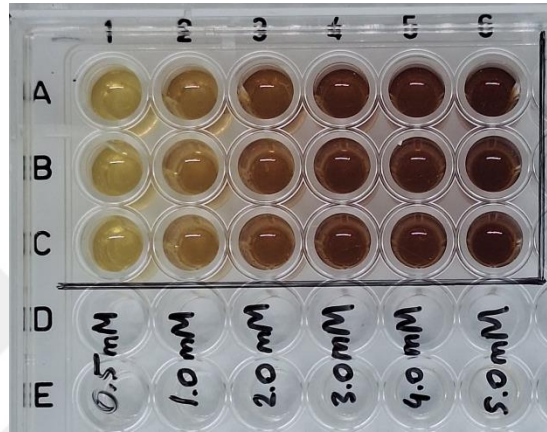
4.6. ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip İzolatların DF Besiyerinde Taranması

Farklı koloni morfolojilerine göre seçilen izolatların ACC deaminaz enzim aktivitesini kalitatif olarak analiz etmek için farklı azot kaynağı içeren ve içermeyen 2 farklı DF besiyerleri kullanıldı. Bu besiyerler sırası ile azot kaynağı olarak amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), ACC kullanıldı. Diğer iki besiyerine ve azot kaynağı bulunmayan katı DF minimal besiyerine (negatif kontrol) steril kürdan ile nokta ekim yapıldı. Ardından ekim yapılan Petri kutuları farklı sıcaklık (30 ve 37 °C); 24, 48 ve 72 saat gerektiren zaman sürelerinde inkübatörlerde inkübasyona bırakıldı.

4.7. ACC Deaminaz Aktivitesinin Tespiti İçin Standart Eğri Grafiğinin Hazırlanması

İzolatlarda ACC deaminaz aktivitesinin kantitatif tayini için kullanılacak standart eğri grafiğinin oluşturulabilmesi için, ilk aşamada ACC deaminaz enziminin katalizlediği ACC yıkım ürünlerinden olan 100 mM α-ketobütrat ana stok solüsyonu Tris-HCl pH: 8.5 tamponu kullanarak hazırlanmıştır. 100 mM α-ketobütrat ana stok solüsyonu yine aynı tamponla 25 mM'a seyreltilmiştir. Sonrasında 25mM α-ketobütrat solüsyonu Tris-HCl pH: 8.5 tamponu ile 0.5mM- 5.0mM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

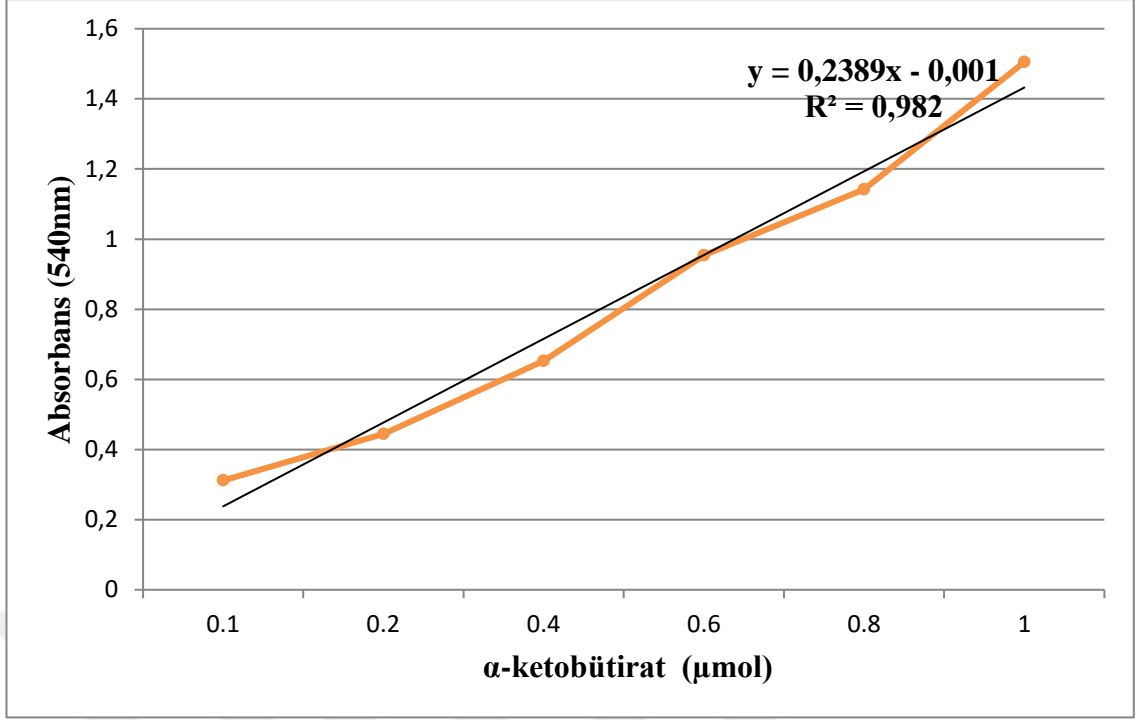
Hazırlanan konsantrasyonlar Tablo 4.3'te verilmiştir. Hazırlanan solüsyonların üzerine 300 µl 2,4-dinitrofenilhidrazin eklenerek 30°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 2ml 2N NaOH eklenerek renk değişimi gözlemlenmiş ve 540 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapılarak sonuçlar kaydedilmiş ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır. 0-1.0 µmol aralığındaki α-ketobütrat, 540 nm'de 0-1.6 arasında değişen absorbans değerleri göstermiştir (Şekil 4.1; Tablo 4.3).



Şekil 4.1: α-ketobütrat mikropilaka görüntüsü.

Tablo 4.3: a-ketobütrat standart eğri grafiği verileri.

| Stok 25 mM | Tris-HCl pH: 8.5 | Konsantrasyon (mM) | Miktar (µmol) | OD 540 Abs Sonuçları |
|------------|------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| 4 µl | 196 µl | 0.5 | 0.1 | 0,31 |
| 8 µl | 192 µl | 1.0 | 0.2 | 0,44 |
| 16 µl | 184 µl | 2.0 | 0.4 | 0,65 |
| 24 µl | 176 µl | 3.0 | 0.6 | 0,95 |
| 32 µl | 168 µl | 4.0 | 0.8 | 1,14 |
| 40 µl | 160 µl | 5.0 | 1.0 | 1,50 |



Şekil 4.2: α -ketobütirat standart eğri grafiği.

4.8. ACC Deaminaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Azot kaynağı olarak ACC ve amonyum sülfat içeren, ve azot kaynağı içermeyen DF minimal tuz besiyerlerinde izolatlarının inkübasyonu sonucunda, ACC içeren besiyerde büyüme gösterip azot içermeyen DF minimal tuz besiyerinde büyüme göstermeyen izolatlar; ACC deaminaz aktivitesi olduğu öngörüsü ile diğer izolatların arasından seçildi. Seçilen izolatlar için LB sıvı besiyerinde taze kültür hazırlandı. ACC deaminaz enzim aktivitesini kantitatif olarak ölçmek için ACC deaminasyonundan üretilen α -ketobütirat miktarının tayinine dayanan bir test uygulandı. Bu nedenle taze kültürlerin ACC deaminaz aktivasyonunu tetiklemek için aşağıda yazılı olan protokol uygulandı:

- Seçilen izolatlar 15 ml LB sıvı besiyerine ekilerek kendi optimum koşullarında 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından 4000 rpm hızda 20 dk 4°C'de santrifüj ile çöktürüldü.
- Elde edilen supernatant atılarak besiyeri pelletten uzaklaştırıldı.

- Ardından pelletler 5 ml DF minimal tuz besiyeri vortex ile karıştırarak çözdürüldü ve tekrar 4000 rpm hızda 20 dk 4°C'de yıkama işlemi gerçekleştirilerek santrifüj ile çöktürüldü.
- Yıkama işleminin ardından 7,5 ml DF Minimal tuz besiyeri ile tekrar pellet çözdürüldü; 0,5 M ACC den 45 µl eklenerek 200 rpm hızda 24 s inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin amacı bakterilerin ACC deaminaz aktivitesini tektiklemektir.
- İnkübasyonun ardından 4000 rpm hızda 20 dk 4°C'de santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant atılarak iki kez 5 ml 0.1 M Tris-HCl (pH:7.6) tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemleri gerçekleştirilirken süpernatant atılmıştır.
- Pelletler 1,5 ml'lik ependorflara alınarak üzerine 0,1 M 1 ml Tris-HCl (pH:7,6) tamponu eklenerek hafifçe vorteks ile karıştırılmıştır.
- 16000 g hızda 5 dk santrifüj ile çöktürüldü süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 600 µl 0,1 M Tris-HCl (pH:8,5) eklenip tekrar vorteksile karıştırılmıştır.
- Hücre duvarını parçalamak için 30 µl toluen ilave edilip 30 saniye boyunca yüksek devirde vortekslenmiştir. Toluene eklenmiş hücrelerden 200 µl alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 20 µl 0,5 M ACC eklenip kısa süreli vorteks ile karıştırılmıştır.
- 30 derecede 15 dakika inkübe edildikten sonra, 1 ml 0.56 M HCl eklenip vorteks ile karıştırılmıştır.
- 16000g hızında 25°C'de 5 dakika boyunca santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatanttan temiz cam bir tüpe 1 ml alınmıştır.
- Sonrasında 800 µl 0,56 M HCl eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 300 µl 2,4-dinitrofenilhidrazin eklenerek vorteksile karıştırılmıştır ve örneklerden 100 µl mikropalakalara eklenerek ilk spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.
- Ardından tüpler 30°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, üzerine 2 ml 2M NaOH eklenerek spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüm yapılmış ve izolatların ACC deaminaz aktiviteleri belirlenmiştir.

4.9. ACC Deaminaz Pozitif Olduğu Düşünülen İzolatlar için Ön Tanımlama Testleri

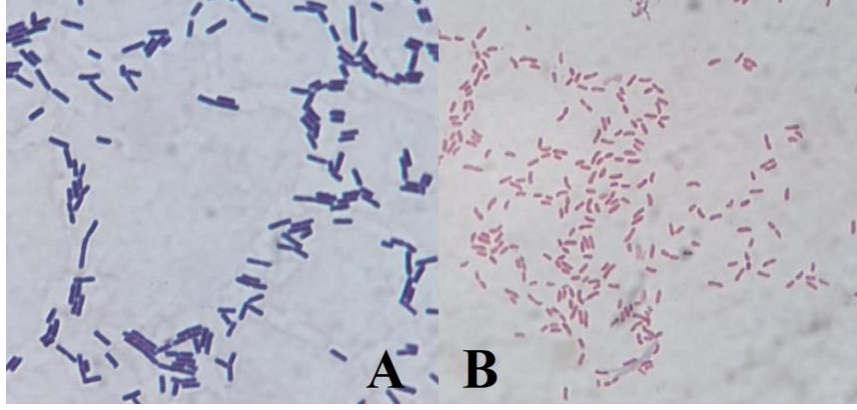
ACC deaminaz enzimi ürettiği düşünülen toprak izolatlarının ön tanımlama testleri gerçekleştirildi.

4.9.1. Gram Boyama

Gram boyama, bakterileri mikroskop altında hücre duvarlarındaki kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre ayırmak için kullanılan önemli bir laboratuvar tekniğidir. Bu teknik, bakteri hücre duvarlarının farklı yapısal özelliklerini vurgulayarak Gram pozitif ve Gram negatif olarak sınıflandırır. Gram pozitif bakteriler, kalın bir peptidoglikan tabakasına sahip olan bakterilerdir. Bu tabaka, kristal viyole ve iyot ile oluşturulan kompleksi hücre içine alarak tutar. Renksizleştirme aşamasında kullanılan alkol, Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan yapısının su kaybetmesine ve büzülmesine neden olur, bu da kristal viyole-iyot kompleksinin hücre içinde konsantre kalmasını sağlar ve mor renge boyanmalarını sağlar.

Diğer yandan, Gram negatif bakterilerin hücre duvarı daha kompleks bir yapıya sahiptir. İnce bir peptidoglikan tabakası ve bu tabakanın dışında lipit yapıda bir dış zar bulunur. Alkol uygulaması sırasında bu lipit tabaka çözünür, bu da peptidoglikan tabakasının porlu hale gelmesine ve içerdikleri boya kompleksinin dışarı atılmasına yol açar. Bu nedenle, Gram negatif bakteriler ilk boyama işleminden sonra renksizleşirler. Son aşamada uygulanan ikinci boya olan safranin, bu bakterileri pembe-kırmızı renkte boyar, bu da onların mikroskop altında belirgin şekilde görünmelerini sağlar[Madigan vd., 2004].

Gram boyama işlemi genellikle taze kültürlerden hazırlanan örnekler üzerinde yapılır. Örnekler, lam üzerine yayıldıktan ve sabitlendikten sonra kristal viyole ile işlem görür, ardından lugol ile sabitlenir ve alkol ile renksizleştirilir. Son olarak safranin ile boyanarak mikroskop altında incelenirler. Bu yöntem, bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında önemli bir adımdır, özellikle tıbbi ve mikrobiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılır.



Şekil 4.3: A: AT1A-16 izolata ait Gram boyama (Gram pozitif), B: KT2B-12 izolata ait Gram boyama (Gram negatif) görüntüsü.

4.9.2. Katalaz Testi

Katalaz, mikroaerofilik ve anaerobik mikroorganizmalarda bulunmayan bir enzim olup, H_2O_2 'nin su ve oksijene parçalanmasından sorumludur. Bu enzim genellikle aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerde bulunur çünkü bu organizmalar oksijeni kullanabilir durumdadır ve metabolizmaları sonucunda H_2O_2 üretirler. Katalaz enzimine sahip mikroorganizmalar, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak gaz açığa çıkarırlar. Bu gaz çıkışı gözle görülebilir ve şiddetine bağlı olarak derecelendirilir. Bu gaz kabarcıkları derecelendirilmesi (+) zayıf, (++) orta, (+++) iyi, (++++) çok iyi şeklinde yapılır.

İzolatların 24 saatlik saf katı kültürlerinden alınan örnekler lam üzerine yayılarak %3 hidrojen peroksit damlatılır, hidrojen peroksiti parçalayarak gaz kabarcıkları oluşturan mikroorganizmalar katalaz pozitif bakteriler olarak değerlendirilir [Maehly vd., 1954].

Bu test için pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve negatif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 8213 suşları kullanıldı.

4.9.3. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, bakterilerin elektron taşıma zincirinin sonunda bulunan sitokrom c oksidaz enziminin varlığını belirlemek için kullanılan bir testtir. Bu enzim, oksijeni kullanarak H₂O₂'ye indirgeyerek oksidatif metabolizmayı sağlar. Oksidaz testi için izolatların ve kontrol olarak kullanılacak bakteri suşlarının 24 saatlik taze kültürleri katı izolasyon besiyerlerine ekilerek hazırlandı. Ayıraç olarak %1 w/v N'N'N'N'-tetrametil-p-fenilendiamin kullanıldı. Bu boya, sitokrom c oksidaz varlığında mavi renk oluşturur [Alexander vd., 2001]. Kontrollerden negatif (örneğin *Escherichia coli*) ve pozitif (örneğin *Pseudomonas aeruginosa*) suşlarıyla yapılan testlerde negatif kontrol beyaz kalırken pozitif kontrol koyu mor-mavi bir renk alır. İzolatların testi için, steril kürdan yardımıyla 24 saatlik taze katı kültürlerinden örnek alınarak ayıraç emdirilmiş filtre kağıdına yayıldı. İlk 20 saniye içinde mavi renk oluşturan izolatlar oksidaz pozitif olarak değerlendirilirken, beyaz renk oluşturan ya da 20 saniyeden sonra mavi renk oluşturan izolatlar oksidaz negatif olarak değerlendirildi. Bu test, hızlı bir şekilde sitokrom c oksidaz enziminin varlığını gösterir ve bakterilerin tanımlanmasında kullanılır. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 ve negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları kullanıldı.

4.9.4. Spor Boyama

Spor boyama, bakterilerde endosporların varlığını, konumunu ve şeklini gözlemlemek için kullanılan bir diferansiyel boyama yöntemidir. Endosporlar, vejetatif hücrelere kıyasla çok daha korunaklı bir yapıya sahip oldukları için basit boyama yöntemleriyle boyanmazlar. Bu amaçla, Schaeffer-Fulton metodu en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde, endosporlar malaşit yeşili ile boyanır ve ardından safranin ile karşıt boyama yapılır [Leboffe vd., 2011]. Hazırlanan kültürler oksidaz testinin ardından 5 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilerek yaşlanmaları ve spor oluşturmaları sağlandı. Yaşlanan kültürlerden alınan örnekler, lam üzerine yayılarak malaşit yeşili ile boyandı. Boyama esnasında malaşit yeşili boyasının sporlara iyi işleyebilmesi amacıyla lamın kaynayan su buharı üstünde tutuldu, distile su ile yıkandıktan sonra safranin ile karşıt boyama yapıldı. Preparatlar kurutulduktan sonra immersiyon yağı ile 100X'te incelendi ve sonuçlar kaydedildi.

4.10. ACC Deaminaz Pozitif Olduğu Düşünülen En İyi Üç İzolat için Biyokimyasal Testler

ACC deaminaz enzimi ürettiği düşünülen toprak izolatları için biyokimyasal testleri gerçekleştirildi.

4.10.1. IMViC Testi

IMViC testi, bakterilerin biyokimyasal özelliklerini belirlemek için kullanılan bir birleşim testidir. IMViC, indol üretimi, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer testi ve sitrat kullanımını testlerinden oluşur. Bu testlerin sonuçları, belirli bakteri türlerinin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında önemli bir rol oynar.

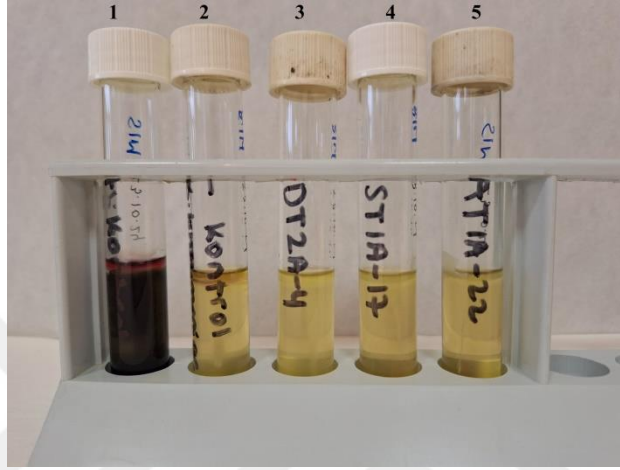
4.10.1.1 İndol Testi

Bu testte, bakterilerin triptofanı indole dönüştürme yeteneği ölçülür. Kovac's reaktifi kullanılarak indol üretimi gözlemlenir [Leboffe vd., 2021]. Pozitif test sonucu, indol üreten bakterileri gösterir ve Kovac's ayırıcı içeren ortamda oluşan indol, yüzeyde kırmızı renkli bir halka veya tabaka oluşturur. Bu reaksiyon, ayırıcının içindeki para-dimetilaminobenzaldehit ile indol arasındaki kimyasal reaksiyondan kaynaklanır. Para-dimetilaminobenzaldehit, indol ile reaksiyona girerek indolün yüzeyde kırmızı renkte bir bileşik oluşturmasını sağlar.

İndol testi için kullanılan SIM agar (Sülfür-İndol-Hareketlilik agar), bakterilerin belirli biyokimyasal özelliklerini değerlendirmek için kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyeri, üç önemli özelliği aynı anda değerlendirmeye olanak tanır: H₂S üretimi, indol üretimi ve hareketlilik testi. İzolatların katı besiyerinde hazırlanmış 24 saatlik kültürleri iğne öze ile alınarak tek bir ekim hattı olacak şekilde SIM agara ekim yapıldı. Tüplerin kapakları hafifçe gevşetilecek 37°C'ta 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüpler önce H₂S oluşumu (tüpte siyah renk görülmesi) ve hareketlilik yönünden incelendi. Ardından Kovac's ayırıcından 5'er damla tüplere damlatılarak indol üretimi yönünden incelendi. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *Proteus vulgaris* ve *Klebsiella pneumoniae* laboratuvar suşları kullanıldı.

Tablo 4.4: Sülfür-İndol-Hareketlilik testleri için pozitif ve negatif kontrol.

| | Pozitif Kontrol (<i>P.vulgaris</i>) | Negatif Kontrol (<i>K.pneumoniae</i>) |
|--------------------------|--|--|
| H ₂ S Üretimi | + | - |
| Hareketlilik | + | - |
| İndol Üretimi | + | - |

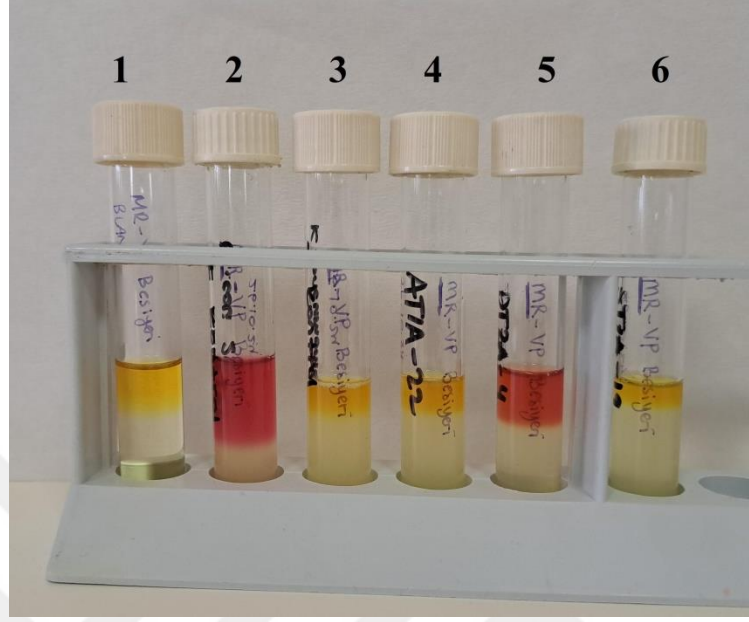


Şekil 4.4: İndol Testi; 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3, 4, 5: Negatif izolatlar.

4.10.1.2 Metil Kırmızısı (MR) Testi

Bu testte, bakterilerin glukozu aseton dönüştürme yeteneği ölçülür. Metil kırmızısı eklenir ve asit koşullarda kırmızı renk oluşumu pozitif bir test sonucu olarak yorumlanır. Bu test, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolağı ile glukozun pirüvik aside metabolizması sonrasında, bakterilerin pirüvik asidi karışık asit yolları aracılığıyla laktik asit, formik asit ve asetik aside dönüştürebilen (metabolize edebilen) özelliklerini tespit etmek amacıyla yapılır. İzolatların LB besiyeri içinde 24 saatlik taze sıvı kültürü hazırlandı. Hazırlanan bu kültürden 100 µl alınarak MR-VP (Metil Kırmızısı-Voges-Proskauer) sıvı besiyerine ekim yapıldı. 30°C'ta 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, her bir MR test tüpüne %0,02 w/v metil kırmızısı solüsyonundan 10 damla damlatıldı. Metil kırmızısının eklenmesinden sonra tüpler belirli bir süre bekletildi (genellikle 30 dk). Bu süre içinde, pozitif bakteriler glukozu pirüvik aside metabolize ederek asidik ürünler oluştururlar. Bu asidik ortam metil kırmızısı ile reaksiyona girer ve tüp kırmızı renge dönenler pozitif; rengi değişmeyenler negatif olarak değerlendirildi [Alexveer vd.,

2021]. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* suşları kullanıldı.



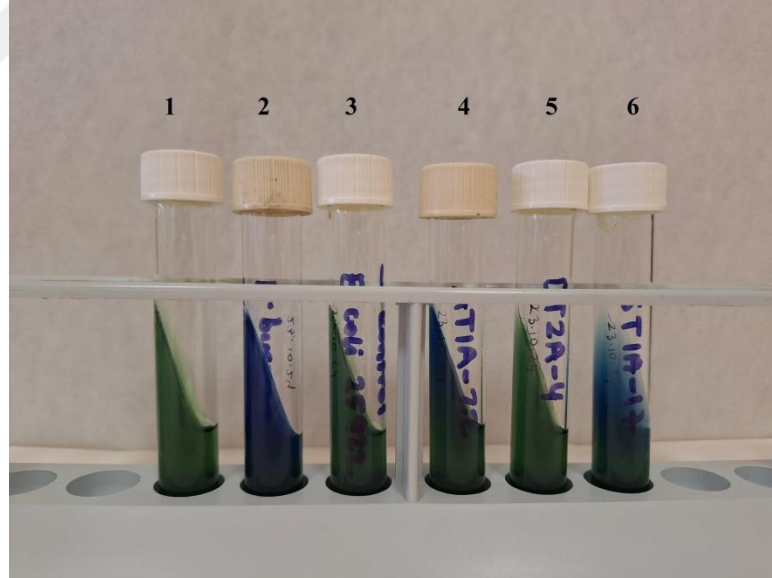
Şekil 4.5: MR Testi; 1: Boş besiyeri, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 5: Pozitif izolat, 4-6 : Negatif izolatlar.

4.10.1.3 Voges-Proskauer (VP) Test

Bu testte, bakterilerin asetonu 2,3-bütveiol olarak fermantasyon etme yeteneği incelenir. Alfa-naftol ve KOH eklenerek reaksiyon sonucunda kırmızı renk oluşumu pozitif bir Voges-Proskauer test sonucunu gösterir. İzolatlar LB sıvı besiyerinde 24 saatlik taze kültürlerinden MR-VP besiyeri ile tekrar taze kültür hazırlandı ve 30°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı, inkübasyonun ardından 12 damla %5 α -naftol ve 4 damla %40 KOH eklenmesinin ardından 30 saniye kuvvetlice çalkalanarak karışımın homojen hale getirildi ve 1 saat bekletildi. Pozitif bakterilerde, α -naftol ve KOH reaksiyona girerek aseton ve diğer türevlerin oluşumuna neden olur. Bu reaksiyon sonucunda tüpün üst kısmında kırmızı renk oluşumu gözlenir. Negatif bakterilerde ise bu reaksiyon olmaz ve tüpün renginde değişiklik gözlenmez. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *K. pneumoniae* ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı.

4.10.1.4 Sitrat Testi

Bu testte, bakterilerin sitrati karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını belirlemek için yapılan bir biyokimyasal testtir. Sitrataz, bir karbon kaynağı olarak kullanıldığında, sitrataz enzimi aracılığıyla metabolize edilir ve bu süreçte bazik yan ürünler oluşur. Test için özel olarak formüle edilmiş besiyerinde sitrat ve pH indikatörü olarak bromtimol mavisi bulunur. Başlangıçta besiyeri pH 6.9' da yeşil renkte olup, sitrat metabolizması sonucunda pH 7.6' nın üzerine çıkar ve besiyerinin rengi maviye döner [Alexveer vd., 2001]. Bu renk değişimi, sitratin karbon kaynağı olarak kullanılabilen bakterilerin varlığını gösterir. İzolatlar LB agar besiyerinde 24 saatlik taze katı kültür hazırlandı. Hazırlanan kültürden, steril bir iğne öze yardımıyla Simon sitrat agar besiyerinin yatık kısmına çizgi ekim yapıldı. Tüplerin kapakları hafifçe gevşetildi ve kültürler 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Deneyde pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* suşu, negatif kontrol olarak ise *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

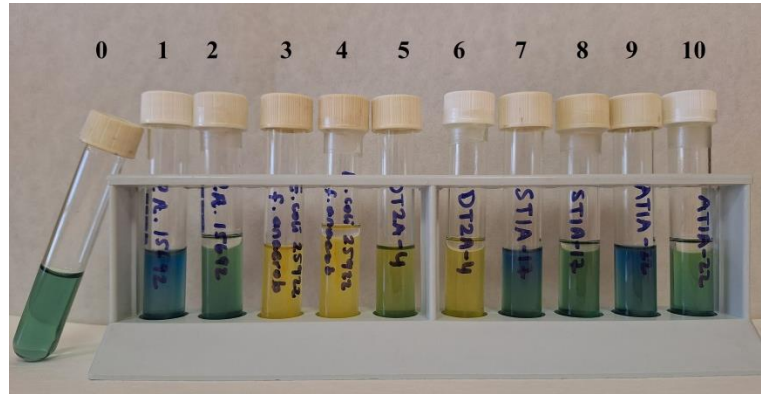


Şekil 4.6: Sitrat Testi; 1: Boş besiyeri, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif kontrol, 4,6: Pozitif izolatlar, 5: Negatif izolat.

4.10.2. Oksidasyon/ Fermantasyon Testi

Bu test, bakterilerin karbonhidratları oksidasyon yoluyla aerobik mi yoksa fermantasyon yoluyla anaerobik mi asidik ürünlere dönüştürdüklerini belirlemek için kullanılır. Oksidasyonu tercih eden bakterilere aerop (A), fermantasyonu tercih edenlere ise fakültatif anaerop (FA) denir. Besiyerindeki düşük pepton miktarı, alkalın ürünlerin sınırlı olmasını sağlar, böylece oluşan asit nötralize edilmez. Besiyeri, yüksek şeker konsantrasyonlarıyla karıştırılarak karbonhidrat kullanımı teşvik edilir, pH düşer ve besiyeri sarıya döner. Brom timol mavisi pH belirteci olarak kullanılır; pH 7.1'de yeşil olan besiyeri, pH 6.0'da sarıya döner [Alexveer vd., 2001]. Test edilecek mikroorganizmalardan aynı besiyerine iki farklı şekilde ekim yapılır ve bu kültürlerden biri aerobik, diğeri ise anaerobik koşullarda inkübe edilir. Her iki tüptede renk değişiyorsa (sarı) bakterinin karbonhidratları fermantasyon yoluyla metabolize edip asidik yan ürünler oluşturduğu, sadece aerob koşullardaki tüpte renk değişikliği görülüyorsa oksidasyonu tercih eden bakteriler belirlenir.

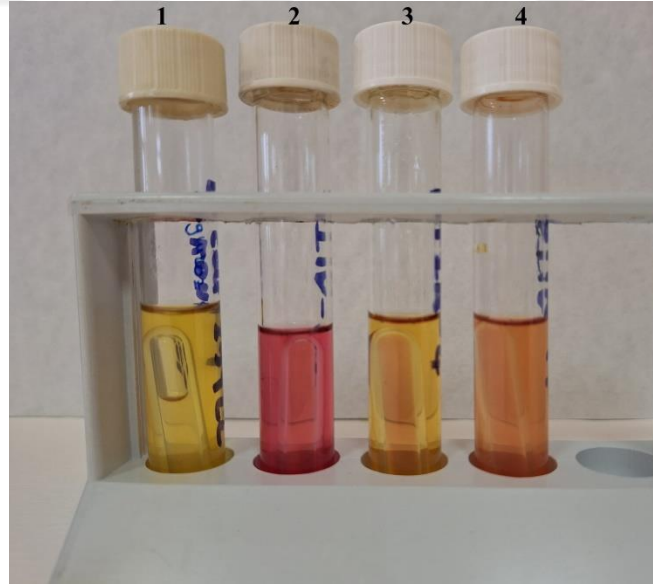
Bu test için izolatlar LB agarda 24 saatlik katı kültürleri hazırlanmış olup steril iğne öze ile Hugh-Leifson agara her izolat için 2 ayrı tüp olacak şekilde ekim yapıldı. Tüplerden birine 1 ml steril mineral yağ damlatılıp kapakları parafilmlelenerek (anaerob ortam); diğeri tüplerin kapağı hafifçe gevşetilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *P. aeruginosa* ATCC 15692 (A) ve *E. coli* ATCC 25922 (FA) kontrol suşları kullanıldı.



Şekil 4.7: O/F testi, 0: Boş besiyeri, 1-2: *P. aeruginosa*-aerob, 3-4: *E. coli*-fakültatif anaerob, 5-6: Fakültatif anaerob, 7-8-9-10: Inert izolat.

4.10.3. Karbonhidrat Kullanımı Testi

Karbonhidrat kullanım testi, bir mikroorganizmanın çeşitli karbonhidratları fermante edip etmediğini belirlemek için yapılan bir testtir. Fermantasyon sonucunda ortaya çıkan asit veya asit ile birlikte gaz üretimi, besiyerindeki pH değişikliğini gösterir [Alexveer vd., 2001]. Gaz oluşumunu belirlemek için Durham tüpü kullanılır. Bu testte fenol kırmızısı sıvı besiyeri kullanıldı. İzolatların karbonhidrat kullanımı için glukoz, mannitol, ksiloz, trehaloz, fruktoz, sükroz, sellobiyoz, mannoz ve laktoz olmak üzere dokuz farklı şeker test edildi. Test edilecek şekerler distile suda çözülerek 0,22 µm'lik filtreden geçirildi ve besiyerine %1 (w/v) son hacim oranında eklendi. Aynı zamanda glukozdan gaz oluşumu da değerlendirildi. Glukoz içeren besiyerine ise Durham tüpü yerleştirildi. İzolatlar LB besiyeri içinde 24 saatlik kültürlerden hazırlanmıştır ve fenol kırmızısı sıvı besiyerine 100 µl ekim yapıldı. Kültürler 37°C'de inkübasyonun ardından ve 24 ve 48 saat sonra sonuçlar kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 glukoz, mannitol, ksiloz, trehaloz ve laktoz testleri için; *Bacillus cereus* (DSMZ 4312) fruktoz testi için; *K. pneumoniae* ise mannoz, sellobiyoz ve sükroz testleri için kullanılmıştır.



Şekil 4.8: Glukoz kullanımı testi, 1: Pozitif kontrol (*E. coli*), 2-4: Negatif izolatlar, 3: Pozitif izolat.

4.10.4. Argininin, Lizin ve Ornitin Dekarboksilaz Testi

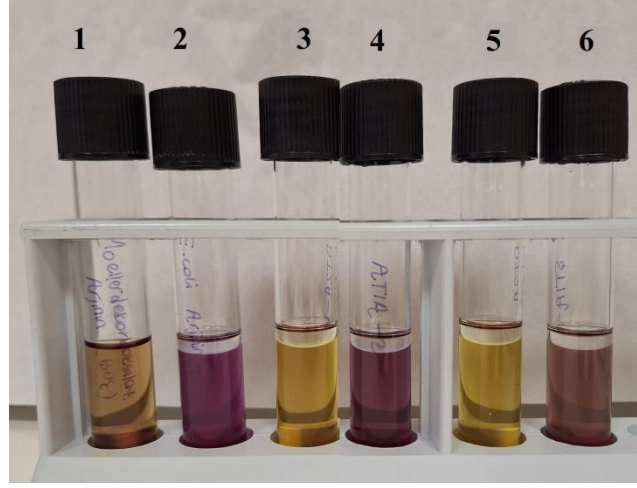
Dekarboksilazlar, amino asit metabolizmasının bir parçası olan dekarboksilasyon sürecini katalizleyen bakteriyel enzimlerdir. Bu süreçte, amino asitlerden karboksil grubu uzaklaştırılır ve son ürün olarak aminler üretilir. Her amino asit için özgül bir dekarboksilaz enzimi bulunur, ancak lizin, ornitin ve arjinin dekarboksilazları özellikle enterik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılır. Test için kullanılan dekarboksilaz sıvı besiyeri, test edilecek amino asidin yanı sıra pepton (büyümeyi teşvik edici), glukoz (karbonhidrat kaynağı) ve brom krezol moru (pH indikatörü) içerir. Bu indikatör, pH 6.8'in üzerindeyken mor, 5.2'nin altındayken sarı renk gösterir [Leboffe, 2011]. Test edilen mikroorganizmanın davranışına göre besiyerinde renk değişiklikleri gözlemlenir:

Glukozu fermente edemeyen ve dekarboksilaz enzimini üretemeyen mikroorganizmalar için besiyerinin rengi değişmez (dekarboksilaz negatif).

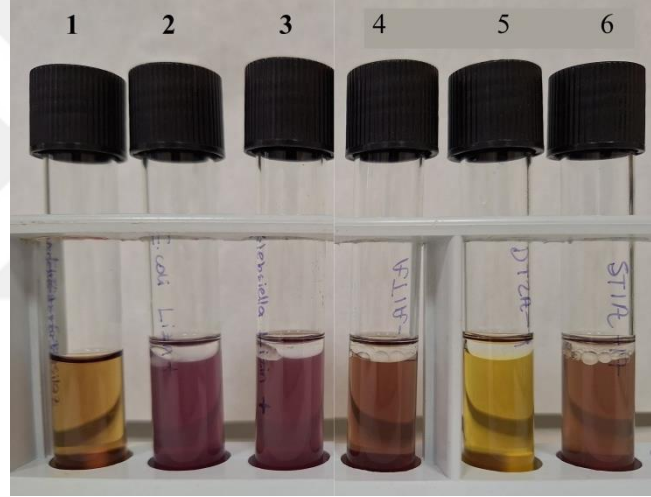
Glukozu fermente edebilen ancak dekarboksilaz enzimini üretemeyen mikroorganizmalar için besiyerinde asidikleşme ve sarı renk oluşur (dekarboksilaz: negatif).

Dekarboksilaz enzimini üreten mikroorganizmalar ise aminler üretir, besiyerinde bazikleşme ve mor renk görülür (dekarboksilaz: pozitif).

Bu testte Moeller dekarboksilaz sıvı besiyeri kullanıldı. Aminoasitlerden arjinin (%1), lizin (%2) ve ornitin (%1) ilave edildi nihai pH 6.0'a ayarlandı. Besiyerleri otoklavlanarak steril edildi ve mikroorganizmalar LB besiyerine 24 saatlik kültürlerden hazırlandı ve bu kültürlerden dekarboksilaz sıvı besiyerine 100 µl ekim yapıldı ardından tüplere 500 µl steril mineral yağ eklendi. Hazırlanan kültürler 37°C'de 72 saat inkübasyon sonucunda sonuçlar değerlendirildi. Kontrol mikroorganizmaları olarak *E. coli* ATCC 25922 [lizin: (+), ornitin: (+), arjinin: (+)], *K. pneumoniae* [lizin: (+), ornitin: (-), arjinin: (-)] ve *P. aeruginosa* ATCC 15692 [lizin: (-), ornitin: (-), arjinin: (+)] kullanıldı.



Şekil 4.9: Arjinin testi, 1: Boş, 2: Pozitif kontrol, 3: Negatif Kontrol, 4: Pozitif izolat, 5: Negatif izolat, 6: İnert izolat.

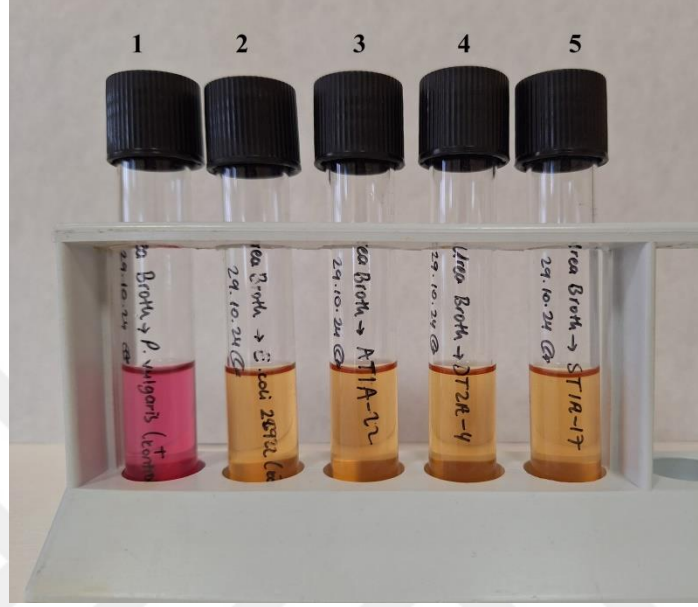


Şekil 4.10: Lizin testi, 1: Boş, 2-3: Pozitif kontrol (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*), 4-6: İnert izolat, 5: Negatif izolat.

4.10.5. Üreaz Testi

Bu test, üreaz enzimi aracılığıyla ürenin hidroliz edilebilmesini sağlayan bakterilerin belirlenmesi amacıyla yapılan bir testtir. Üre, amino asit metabolizmasının bir ürünü olup üreaz enzimi tarafından NH_3 (amonyak) ve CO_2 (karbondioksit) parçalanır. Üreaz testi için kullanılan besiyeri %2 oranında üre ve pH indikatörü olarak fenol red içerir. Bu indikatör, pH 8.4'ün altındayken sarı veya turuncu, üzerindeyken kırmızı veya pembe renk gösterir [Leboffe, 2011]. Üre hidrolizi sonucunda ortam bazikleşir ve besiyerinin rengi kırmızı veya pembe olur. Üreaz testi için Urea Broth kullanıldı.

İzolatlar, LB besiyerinde 24 saatlik taze kültürlerinden alınarak 100 µl ekim yapıldı. Tüplerin kapakları hafifçe gevşetilerek kültürler 37°C'de 24 saat boyunca inkasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak *P. vulgaris*, negatif kontrol olarak ise *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanılmıştır.



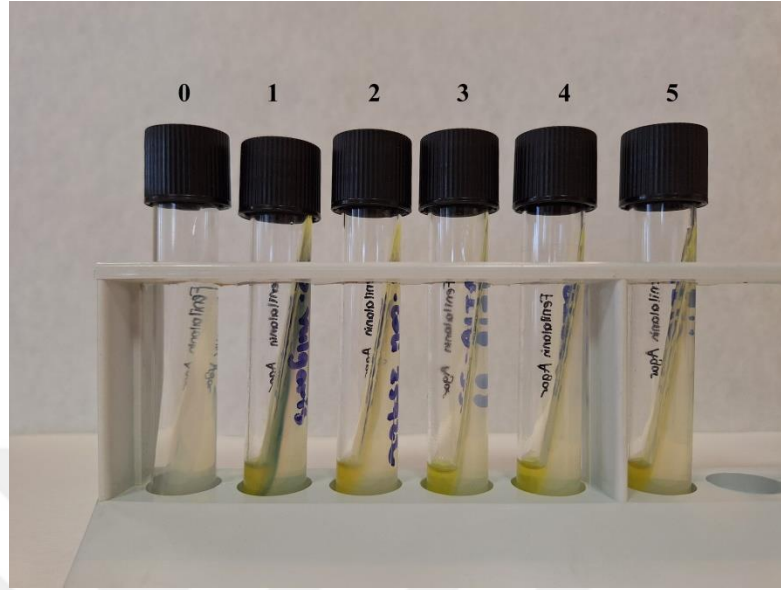
Şekil 4.11: Üreaz testi, 1: Pozitif kontrol (*P. vulgaris*), 2: Negatif kontrol (*E. coli*), 3-4-5: Negatif izolatlar.

4.10.6. Fenilalanin Deaminaz Testi

Fenilalanin deaminaz testi, bakterilerin fenilalanin aminoasidini fenil pirüvik asit ve amonyak (NH₃) ürünlerine dönüştürebilen fenilalanin deaminaz enzimini üretebilme kapasitesini belirlemeye yönelik bir testtir. Fenil pirüvik asit, FeCl₃ (demir klorür) ile reaksiyona girerek koyu yeşil bir renk oluşturur [Leboffe, 2011]. Bu renk değişimi, fenil pirüvik asidin ve dolayısıyla fenilalanin deaminaz enziminin varlığını gösterir.

İzolatların katı besiyerinde hazırlanmış 24 saatlik taze kültürlerinden alınan örnekler, fenilalanin agarın yatık kısmına ekildi. Tüplerin kapakları hafifçe gevşetilerek kültürler 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, tüplere 5 damla %10 FeCl₃ çözeltisi eklendi. Eğer fenilalanin deaminaz enzimi mevcutsa, besiyerinde koyu yeşil bir renk oluşur. Renk değişimi gözlenmemesi ise negatif sonucu gösterir. Bu test için pozitif kontrol olarak

genellikle *P. vulgaris* suşu kullanılırken, negatif kontrol olarak ise *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.



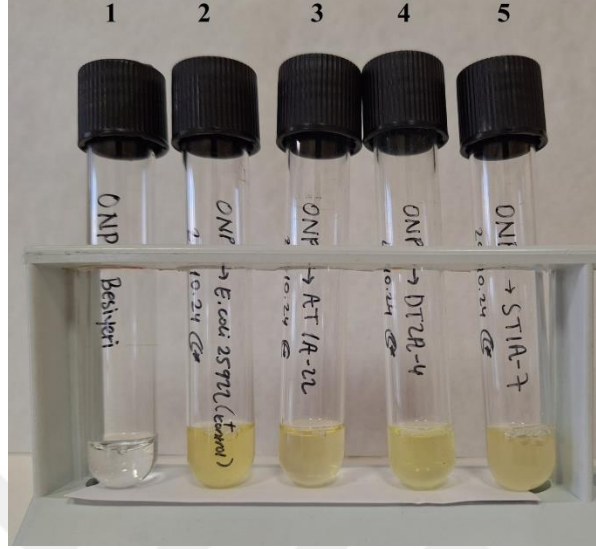
Şekil 4.12: Fenilalanin deaminaz testi, 0: Boş, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-4-5: Negatif izolatlar.

4.10.7. ONPG Testi

Bir bakterinin laktozu fermente edebilme yeteneği, permeaz ve β -galaktosidaz adlı iki enzimin aktivitesine bağlıdır. Permeaz enzimi, laktozun bakteriyel hücre duvarından geçişini sağlarken, β -galaktosidaz enzimi laktozun glukoz ve galaktoza parçalanmasını gerçekleştirir. Bu enzimler, indüklenmiş enzimlerdir ve yalnızca ortamda laktoz bulunduğunda faaliyete geçerler. Bazı organizmalar, permeaz enzimine sahip olmadıkları için laktozu geç veya hiç ferment edemezler. ONPG testi, permeaz enzimine sahip olmayan ancak β -galaktosidaz enzimine sahip olan gerçek laktoz fermantörlerini tespit etmek için kullanılır. ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid), laktoza benzer yapıya sahip renksiz bir maddedir ve bu testte β -galaktosidaz için substrat olarak kullanılır. Eğer mikroorganizma β -galaktosidaz enzimini üretiyorsa, ONPG molekülünü galaktoza ve sarı renkli o-nitrofenole parçalar. Dolayısıyla, besiyerinde sarı renk oluşumu gözlemlenirse, ONPG testi pozitif olarak değerlendirilir [Leber, 2016].

ONPG testi için %1 laktoz içeren LB sıvı besiyerinde *E. coli* ATCC 25922 ve *B.cereus* DSMZ 4312 suşları ve izolatların taze kültürleri hazırlandı. Hazırlanan

kültürler, 1 ml ONPG sıvı besiyeri eklenen steril cam tüplere 500 µl inoküle edildi. Tüplerin kapakları hafifçe gevşetilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sarı renk oluşumu gözlemlenen tüpler pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.13: ONPG testi, 1: Boş, 2: Pozitif kontrol (*E. coli*), 3-4-5: Pozitif izolatlar.

4.11. Genomik DNA İzolasyonu

Yürütülen deneyler sonucunda seçilen 3 yerel izolatın genomik DNA izolasyonları için ZymoBionics Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit protokolü uygulanarak yapılmıştır. Seçilen izolatların 24 saatlik saf ve taze kültürleri hazırlandıktan sonra taze kültürlerden 1 ml olarak 1,5 ml santrifüj tüpüne transfer edildikten sonra 18.000 x g 'de 2 dk santrifüj ile çöktürülerek süpernatant atılır. Bu adımdan sonra aşağıdaki aşamalar takip edildi:

- ZR BashingBead Lysis tüpüne 200 µl su ile 50 mg ıslak ağırlıpa sahip bakteri hücrelerine eklendi. Tüpe 750 µl BashingBead tamponu eklendi. 5 dk yüksek devirde vortex ile karıştırıldı.
- ZR Bashing Bead Lysis tüpünü 10.000 x g'de 1 dk santrifüj ile çöktürüldü.
- 400 µl süpernatant Zymo-Spin III-F Filtresine aktarıldı. 8.000g'de 1 dk santrifüj ile çöktürüldü.
- Kolona inen filtrat üzerine 1200 µl Genomik Lysis Tamponu eklendi.

- Elde edilen 1600 ul'lik süspansiyonun 800 ul'si ZymoSpin IICR kolonuna aktarıldı ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüj ile çöktürüldü (2 kez tekrarlandı).
- Yeni kolona yerleştirilmiş ZymoSpin IICR kolonuna 200 ul DNA Ön Yıkama Tamponu eklenerek 10.000 x g'de 1 dk santrifüj ile çöktürüldü.
- ZymoSpin IICR Kolonuna 500 ul g-DNA Yıkama Tamponu eklendi 10.000 x g'de 1 dk santrifüj ile çöktürüldü.
- ZymoSpin IICR Kolonuna temiz bir 1,5 ml Eppendorf tüpüne aktarıldı ve 50 ul DNA Elüsyon Tamponu doğrudan kolona eklendi ve 10.000 x g'de 30 sn santrifüj ile çöktürüldü.

DNA izolasyonunun ardından örneklerinin miktarı ve saflığı NanoDrop Lite (Thermo Scientific) cihazında ölçüldü.

Tablo 4.5: Polimeraz Zincir Reaksiyon karışım miktarları.

| Reaktif | Miktar (1X örnek) |
|-------------------------------|-------------------|
| 10X DreamTaq Buffer | 2 µL |
| dNTP Mix 10 µM | 0.4 µL |
| Forward primer 25 µM | 0,4 µL |
| Reverse primer 25 µM | 0,4 µL |
| Kalıp DNA | 50 ng |
| DreamTaq DNA Polymerase 5U/ul | 0,1 µL |
| Apirojen Su | 16,2 µL |

Tablo 4.6: PZR koşulları.

| Aşama | Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü |
|--------------|---------------|-------|-------|
| Denatürasyon | 95 | 5 dk | 30 |
| | 95 | 30 sn | |
| Bağlanma | 59 | 30 sn | |
| Uzama | 72 | 1 dk | 1 |
| Son Uzama | 72 | 10 dk | |

4.12. Seçilmiş izolatların 16S rDNA Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

İzolatların tanımlanması amacıyla 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması için evrensel 27F/1492R primerleri kullanılarak PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilmiştir. Bu primerler, bakteri ve arkeaların 16S ribozomal RNA geninin belirli bir bölgesini hedef alır ve bu genetik bölgenin çoğaltılmasını sağlar.

27F Primeri: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' ; Bu primer genellikle 8-27 pozisyonları arasındaki bölgeyi hedef alır.

1492R Primeri: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3' ; Bu primer genellikle 1492-1509 pozisyonları arasındaki bölgeyi hedef alır.

4.13. Domates Tohumu Petri Deneyleri

Seçilen 3 izolat için domates tohumlarında tuz stresine maruz bırakılarak çimlenmeye etkileri yaş ağırlık, kuru ağırlık, kök uzunluğu, gövde uzunluğu ölçülerek incelenmesi.

4.13.1. Bakteri İzolatlarının Tuzlu Besiyerinde Büyütülmesi

50, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl içeren LB katı agara, yayma ekim yapılarak izolatlar 30° C'ta 24 saat inkübasyona bırakıldı.

4.13.2. Domates Tohumlarının Sterilizasyonu

İlk olarak zefiran ve %70 etil alkol ile kabin temizlenerek ultravioye (UV) ile steril hale getirildi. %25 domestos ile domates tohumları (petri başına 5 tohum) 20 dk çalkalandı. Çalkalama sonrasında köpük gidinceye kadar distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi [van Eck vd., 2019].

4.13.3. Domates Tohumları ve İzolatların İnokülasyonu

LB sıvı besiyerinde 30° C'ta 24 saat inkübasyona bırakılan izolatlar 4000 rpm hızda santrifüj ile çöktürüldü. LB sıvı besiyeri ile 0.5 MacFarlad'a ayarlandı. Ardından 0.5 MacFarland'a ayarlanmış (3ml) izolatlara 18 ul 0.5M ACC substratı eklendi ve 5 dakika 200 rpm de 30° C de çalkalandı. Çalkalama işlemi sırasında tohumlarda eklenerek ACC ile muamele edilen bakterilerin tohum kabuklarına tutunması sağlandı [Ateş Ö., 2017].

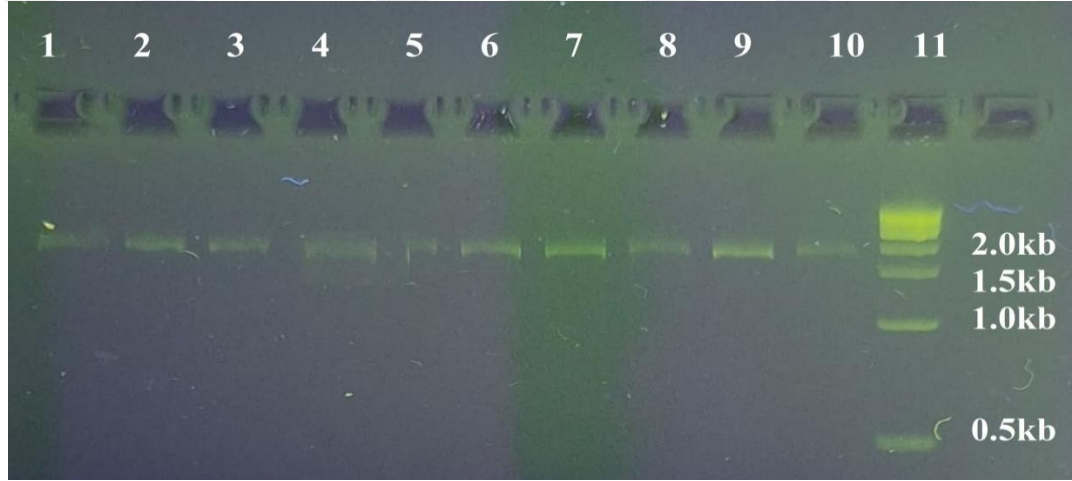
4.13.4. Domates Tohumlarının Çimlenme ve Büyüme Parametrelerine Seçilmiş İzolatların Etkisinin Takibi

Cam petriler içine 2 adet filtre kağıdı yerleştirilerek sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında her bir petriye 5 adet tohum yerleştirilerek üzeri steril filtre kağıdı ile kapatılmıştır. Her bir petriye sulama işleminde kullanılacak olan 180 mM, 200 mM ve 220 mM konsantrasyonlarında tuz solüsyonları 2 günde bir 7 gün boyunca eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan domates tohumlarına sadece su eklenmiştir. Tohumlar bitki büyüme odasında 23-25°C, 16/8 saat fotoperiyod inkübasyona bırakıldı. Testler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1. Total DNA İzolasyonu

Toplam 10 adet toprak örneğinden total dna izolasyonu ve 3 izolattan genomik dna izolasyonu metotta belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen örneklerde DNA'nın varlığı agaroz jel ile belirlenmiştir (Şekil 5.1). Ayrıca DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop cihazında ölçülerek elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir (Tablo 5.1).



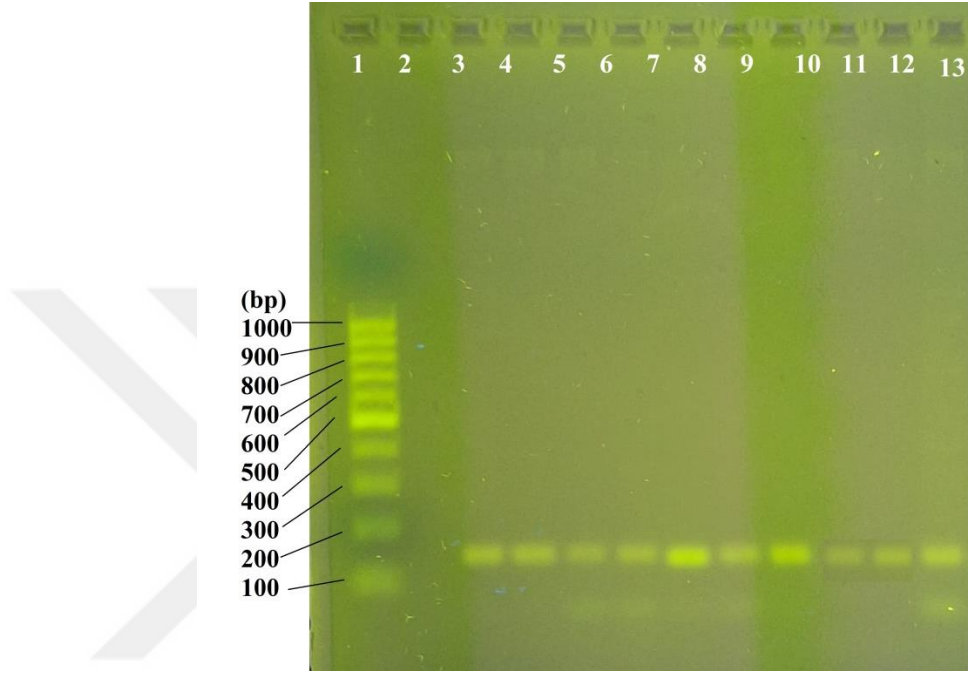
Şekil 5.1: Toprak total DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: DT1 Toprağı, 2: DT2 Toprağı, 3: TT1 Toprağı, 4: TT2 Toprağı, 5: AT1 Toprağı, 6: AT2 Toprağı, 7: ST1 Toprağı, 8: ST2 Toprağı, 9: KT1 Toprağı, 10: KT2 Toprağı, 11: 1kb dna ladder (biomassNEB).

Tablo 5.1: Toprak total DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm sonuçları.

| İzolatlar | Miktar (ng/µl) | A260/280 |
|-----------|----------------|----------|
| DT1 | 24.1 | 1.68 |
| DT2 | 24.9 | 1.78 |
| TT1 | 14.8 | 1.87 |
| TT2 | 12.2 | 1.73 |
| AT1 | 7.0 | 1.70 |
| AT2 | 12.1 | 1.71 |
| ST1 | 12.8 | 1.85 |
| ST2 | 21.3 | 1.49 |
| KT1 | 16.5 | 1.51 |
| KT2 | 15.3 | 1.71 |

5.2. *acdS* Gen Varlığının PZR ile Gösterilmesi

Topraklar için *acdS* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılarak hedeflenen gen bölgesi agaroz jel elektroforezi ile gösterildi. Beklenildiği gibi pcr ürünü hedef gen bölgesini (137 baz çifti) 100-200 baz çifti arasında gözlemlendi.



Şekil 5.2: *acdS* pcr ürünlerinin jel görüntüsü. 1: 100bp ladder, 2: Negatif kontrol, 3: DT1 toprağı, 4: DT2 toprağı, 5: TT1 toprağı, 6: TT2 toprağı, 7:AT1 toprağı, 8: AT2 toprağı, 9:ST1 toprağı, 10: ST2 toprağı, 11: KT1 toprağı, 12: KT2 toprağı.

5.3. Topraktan Bakteri İzolasyonu

Bu yüksek lizans tezi kapsamında toplamda 347 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Toprak örneklerine göre izolat sayısı Tablo 5.2' de verilmiştir.

Tablo 5.2: İzolat Sayısı.

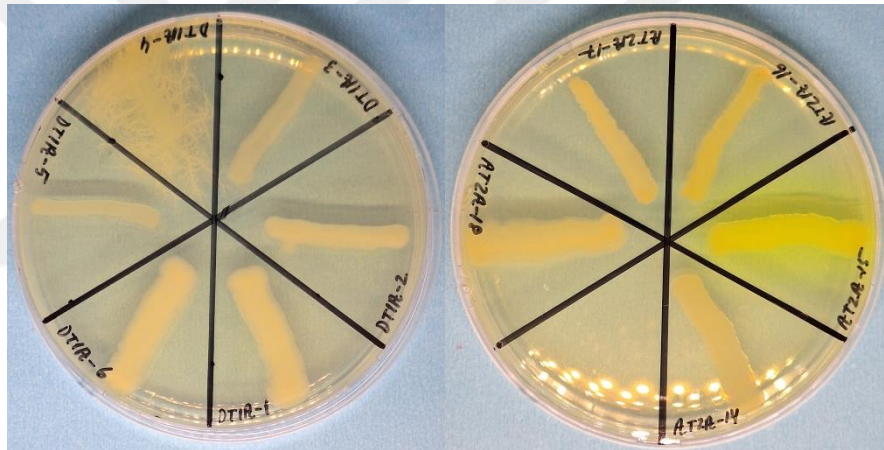
| Toprak Kodu | İzolat Sayısı |
|-------------|---------------|
| TT1 | 57 |
| TT2 | 28 |
| AT1 | 37 |
| AT2 | 32 |
| KT1 | 28 |

Tablo 5.2: Devam.

| | |
|-----|----|
| KT2 | 30 |
| ST1 | 46 |
| ST2 | 34 |
| DT1 | 27 |
| DT2 | 28 |

5.4. Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında topraktan elde edilen 347 adet izolatların koloni morfolojilerinin değerlendirilmesine ait sonuçlar Tablo 5.3' te verilmiştir. Koloni morfolojileri renk, koloni şekli, yükseklik, kenar, boyut, yüzey ve optik özellikleri incelenerek not edilmiştir.



Şekil 5.3: Farklı koloni morfolojilerine sahip izolatlardan bazıları.

Tablo 5.3: İzolatların koloni morfolojilerinin değerlendirilmesine ait sonuçlar.

| İzolat No | İzolat Adı | Koloni Morfolojisi | | | | | | |
|-----------|------------|--------------------|-------------------|-------------|---------|-------|------------|----------------|
| | | Rengi | Form/Koloni Şekli | Yükseklik | Kenar | Boyut | Yüzey | Optik Özelliği |
| 1 | TT1A-1 | Sarı | Düzensiz | Düz | İpliksi | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 2 | TT1A-2 | Sarı | Düzensiz | Krateriform | Bütün | Büyük | Kırışik | Opak |
| 3 | TT1A-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 4 | TT1A-4 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 5 | TT1A-5 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 6 | TT1A-6 | Sarı | Dairesel | Düz | Düz | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 7 | TT1A-7 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Kırışik | Opak |
| 8 | TT1A-8 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Yarı saydam |
| 9 | TT1A-9 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 10 | TT1A-10 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 11 | TT1A-11 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 12 | TT1A-12 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 13 | TT1A-13 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 14 | TT1A-14 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 15 | TT1A-15 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 16 | TT1A-16 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 17 | TT1A-17 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 18 | TT1A-18 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 19 | TT1A-19 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 20 | TT1A-20 | Sarı | Düzensiz | Kabarık | Bütün | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 21 | TT1A-21 | Sarı | Dairesel | Konveks | Bütün | Küçük | Kuru tozsu | Opak |
| 22 | TT1A-22 | Beyaz | Dairesel | Konveks | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 23 | TT1A-23 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam.

| | | | | | | | | |
|----|---------|-----------|----------|-------------|-----------|-------|------------|------------|
| 24 | TT1A-24 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 25 | TT1A-25 | Sarı | Dairesel | Konveks | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 26 | TT1A-26 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 27 | TT1A-27 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 28 | TT1A-28 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 29 | TT1A-29 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Kıvrılmış | Büyük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 30 | TT1A-30 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 31 | TT1A-31 | Sarı | Dairesel | Konveks | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 32 | TT1A-32 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 33 | TT1A-33 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 34 | TT1B-1 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 35 | TT1B-2 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 36 | TT1B-3 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 37 | TT1B-4 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 38 | TT1B-5 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 39 | TT1B-6 | Sarı | Düzensiz | Krateriform | Loblu | Büyük | Kırışik | Opak |
| 40 | TT1B-7 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 41 | TT1B-8 | Beyazımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Yarısaydam |
| 42 | TT1B-9 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 43 | TT1B-10 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Yarısaydam |
| 44 | TT1B-11 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 45 | TT1B-12 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 46 | TT1B-13 | Beyaz | Düzensiz | Krateriform | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 47 | TT1B-14 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 48 | TT1B-15 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam.

| | | | | | | | | |
|----|---------|-----------|----------|---------|-------------|-------|-------------|------------|
| 49 | TT1B-16 | Beyazımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Yarısaydam |
| 50 | TT1B-17 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 51 | TT1B-18 | Sarı | Düzensiz | Düz | Loblu | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 52 | TT1B-19 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 53 | TT1B-20 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 54 | TT1B-21 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 55 | TT1B-22 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 56 | TT1B-23 | Beyaz | Dairesel | Düz | Yırtık gibi | Orta | Parlak düz | Opak |
| 57 | TT1B-24 | Sarı | Dairesel | Konveks | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 58 | TT2A-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Y.saydam |
| 59 | TT2A-2 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 60 | TT2A-3 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 61 | TT2A-4 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 62 | TT2A-5 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru Tozsu | Opak |
| 63 | TT2A-6 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 64 | TT2A-7 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Küçük Loblu | Orta | Parlak düz | Saydam |
| 65 | TT2A-8 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 66 | TT2A-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 67 | TT2A-10 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | İnce taneli | Opak |
| 68 | TT2A-11 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 69 | TT2A-12 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 70 | TT2A-13 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 71 | TT2A-14 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 72 | TT2B-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Y.saydam |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|----|---------|-----------|----------|---------|-----------|-------|-------------|-----------|
| 73 | TT2B-2 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 74 | TT2B-3 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 75 | TT2B-4 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 76 | TT2B-5 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 77 | TT2B-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İnce taneli | Y. saydam |
| 78 | TT2B-7 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 79 | TT2B-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 80 | TT2B-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 81 | TT2B-10 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 82 | TT2B-11 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 83 | TT2B-12 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Kıvrılmış | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 84 | TT2B-13 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | İri taneli | Opak |
| 85 | TT2B-14 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 86 | KT1A-1 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 87 | KT1A-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Kuru tozsu | Y. saydam |
| 88 | KT1A-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 89 | KT1A-4 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 90 | KT1A-5 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Y. saydam |
| 91 | KT1A-6 | Renksiz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 92 | KT1A-7 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 93 | KT1A-8 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | İri taneli | Opak |
| 94 | KT1A-9 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 95 | KT1A-10 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 96 | KT1A-11 | Renksiz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 97 | KT1A-12 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | İnce taneli | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|-------------|-------|-------------|-----------|
| 98 | KT1B-1 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Y. saydam |
| 99 | KT1B-2 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Y. saydam |
| 100 | KT1B-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 101 | KT1B-4 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | İpliksi | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 102 | KT1B-5 | Beyaz | Düzensiz | Düz | İri taneli | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 103 | KT1B-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Y. saydam |
| 104 | KT1B-7 | Sarı | Düzensiz | Kabarık | İri taneli | Küçük | Kuru tozsu | Opak |
| 105 | KT1B-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 106 | KT1B-9 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 107 | KT1B-10 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Y. saydam |
| 108 | KT1B-11 | Renksiz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 109 | KT1B-12 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 110 | KT1B-13 | Beyaz | Dairesel | Düz | Yırtık gibi | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 111 | KT1B-14 | Sarımsı | Rizoit | Düz | Çentikli | Küçük | Filamentli | Opak |
| 112 | KT1B-15 | Sarı | Düzensiz | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 113 | KT1B-16 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 114 | KT2A-1 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 115 | KT2A-2 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 116 | KT2A-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 117 | KT2A-4 | Beyaz | Düzensiz | Düz | İpliksi | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 118 | KT2A-5 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Kuru tozsu | Opak |
| 119 | KT2A-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 120 | KT2A-7 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 121 | KT2A-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | İnce taneli | Y. saydam |
| 122 | KT2A-9 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | İri taneli | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|-----------------|-------|-------------|-----------|
| 123 | KT2A-10 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 124 | KT2A-11 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Y. saydam |
| 125 | KT2A-12 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 126 | KT2A-13 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | İri taneli | Opak |
| 127 | KT2A-14 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 128 | KT2A-15 | Renksiz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 129 | KT2A-16 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 130 | KT2B-1 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | İri taneli | Opak |
| 131 | KT2B-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Küçük Loblu | Orta | Pürüzlü | Y. saydam |
| 132 | KT2B-3 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Y. saydam |
| 133 | KT2B-4 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 134 | KT2B-5 | Beyaz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 135 | KT2B-6 | Sarı | Düzensiz | Düz | Küçük loblu | Büyük | Parlak düz | Y. saydam |
| 136 | KT2B-7 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 137 | KT2B-8 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 138 | KT2B-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Y. saydam |
| 139 | KT2B-10 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 140 | KT2B-11 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 141 | KT2B-12 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 142 | KT2B-13 | Renksiz | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | İnce taneli | Saydam |
| 143 | KT2B-14 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 144 | AT1A-1 | Sarı | Dairesel | Düz | İri taneli | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 145 | AT1A-2 | Beyaz | Noktasal | Düz | Dalgalı geçmeli | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 146 | AT1A-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 147 | AT1A-4 | Beyazımsı | Dairesel | Kabarık | Düz | Büyük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|-----------------|-------|------------|--------|
| 148 | AT1A-5 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 149 | AT1A-6 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı geçmeli | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 150 | AT1A-7 | Beyaz | Noktasal | Düz | Dalgalı geçmeli | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 151 | AT1A-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 152 | AT1A-9 | Sarımsı | Dairesel | Konveks | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 153 | AT1A-10 | Sarımsı | Dairesel | Düz | İri taneli | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 154 | AT1A-11 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | İri taneli | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 155 | AT1A-12 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Geniş loblu | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 156 | AT1A-13 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 157 | AT1A-14 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak | Opak |
| 158 | AT1A-15 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 159 | AT1A-16 | Sarı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 160 | AT1A-17 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 161 | AT1A-18 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 162 | AT1A-19 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 163 | AT1A-20 | Sarı | Noktasal | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 164 | AT1A-21 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 165 | AT1A-22 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Geniş loblu | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 166 | AT1A-23 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 167 | AT1A-24 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 168 | AT1B-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 169 | AT1B-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | İri taneli | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 170 | AT1B-3 | Sarımsı | Rizoit | Düz | Dalgalı | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 171 | AT1B-4 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 172 | AT1B-5 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|------------|-----------------|-------|------------|-------------|
| 173 | AT1B-6 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Geniş loblu | Küçük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 174 | AT1B-7 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 175 | AT1B-8 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı geçmeli | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 176 | AT1B-9 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Geniş loblu | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 177 | AT1B-10 | Sarımsı | Dairesel | Kraterimsi | Dalgalı | Orta | Ağaca bnz. | Opak |
| 178 | AT1B-11 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 179 | AT1B-12 | Beyazımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 180 | AT1B-13 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 181 | AT2A-1 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 182 | AT2A-2 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 183 | AT2A-3 | Sarımsı | Noktasal | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 184 | AT2A-4 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 185 | AT2A-5 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Saydam |
| 186 | AT2A-6 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 187 | AT2A-7 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 188 | AT2A-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 189 | AT2A-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 190 | AT2A-10 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Dalgalı | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 191 | AT2A-11 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 192 | AT2A-12 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Tozsu | Opak |
| 193 | AT2A-13 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 194 | AT2A-14 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 195 | AT2A-15 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 196 | AT2A-16 | Sarı | Noktasal | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 197 | AT2A-17 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Pürüzlü | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|------------|------------|------------|-------|-------------|-------------|
| 198 | AT2A-18 | Sarımsı | Noktasal | Kabarık | Dalgalı | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 199 | AT2B-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | İri taneli | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 200 | AT2B-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 201 | AT2B-3 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 202 | AT2B-4 | Sarı | Düzensiz | Düz | Loblu | Küçük | Pürüzlü | Opak |
| 203 | AT2B-5 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Loblu | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 204 | AT2B-6 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 205 | AT2B-7 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 206 | AT2B-8 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Kıvrılmış | Orta | Parlak düz | Opak |
| 207 | AT2B-9 | Sarı | Dairesel | Düz | Dallı | Küçük | Ağaca benz. | Opak |
| 208 | AT2B-10 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 209 | AT2B-11 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 210 | AT2B-12 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 211 | AT2B-13 | Renksiz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Yarı saydam |
| 212 | AT2B-14 | Sarımsı | Rizoit | Kraterimsi | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 213 | AT2B-15 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Düz | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 214 | DT1A-1 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 215 | DT1A-2 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 216 | DT1A-3 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 217 | DT1A-4 | Beyaz | Filamentöz | Düz | İpliksi | Büyük | Kırışik | Opak |
| 218 | DT1A-5 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 219 | DT1A-6 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 220 | DT1A-7 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 221 | DT1A-8 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 222 | DT1A-9 | Beyazımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|-------------|-------|-------------|-------------|
| 223 | DT1A-10 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 224 | DT1A-11 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 225 | DT1A-12 | Beyaz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 226 | DT1A-13 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 227 | DT1A-14 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 228 | DT1A-15 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 229 | DT1A-16 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Yarı saydam |
| 230 | DT1B-1 | Beyaz | Dairesel | Düz | Kıvrılmış | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 231 | DT1B-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Kıvrılmış | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 232 | DT1B-3 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 233 | DT1B-4 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 234 | DT1B-5 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 235 | DT1B-6 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Yarı saydam |
| 236 | DT1B-7 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 237 | DT1B-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 238 | DT1B-9 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Küçük loblu | Büyük | İnce taneli | Opak |
| 239 | DT1B-10 | Renksiz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Saydam |
| 240 | DT1B-11 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | İnce taneli | Opak |
| 241 | DT2A-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 242 | DT2A-2 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 243 | DT2A-3 | Sarı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 244 | DT2A-4 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 245 | DT2A-5 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | İri taneli | Opak |
| 246 | DT2A-6 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 247 | DT2A-7 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|-------------|-------------|-------|------------|-------------|
| 248 | DT2A-8 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Yırtık gibi | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 249 | DT2A-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Kuru tozsu | Opak |
| 250 | DT2A-10 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 251 | DT2A-11 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 252 | DT2A-12 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Kıvrılmış | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 253 | DT2A-13 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 254 | DT2A-14 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 254 | DT2A-15 | Sarı | Dairesel | Hörgüç gibi | Bütün | Orta | Kırışik | Opak |
| 255 | DT2A-16 | Sarı | Dairesel | Dış bükey | Bütün | Küçük | Kuru tozsu | Opak |
| 256 | DT2B-1 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 257 | DT2B-2 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 258 | DT2B-3 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 259 | DT2B-4 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 260 | DT2B-5 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 261 | DT2B-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 262 | DT2B-7 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 263 | DT2B-8 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 264 | DT2B-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Katlanmış | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 265 | DT2B-10 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 266 | DT2B-11 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 267 | DT2B-12 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Kuru tozsu | Opak |
| 268 | ST1A-1 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 269 | ST1A-2 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 270 | ST1A-3 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 271 | ST1A-4 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|---------|-------|------------|-------------|
| 272 | ST1A-5 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 273 | ST1A-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 274 | ST1A-7 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 275 | ST1A-8 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | İpliksi | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 276 | ST1A-9 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 277 | ST1A-10 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 278 | ST1A-11 | Beyazımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 279 | ST1A-12 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 280 | ST1A-13 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | İpliksi | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 281 | ST1A-14 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 282 | ST1A-15 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 283 | ST1A-16 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 284 | ST1A-17 | Beyaz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 285 | ST1A-18 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 286 | ST1A-19 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 287 | ST1A-20 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 288 | ST1A-21 | Beyaz | Dairesel | Konveks | Dalgalı | Küçük | Kırışik | Opak |
| 289 | ST1A-22 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 290 | ST1A-23 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 291 | ST1A-24 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 292 | ST1A-25 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 293 | ST1A-26 | Sarımsı | Dairesel | Konveks | Dalgalı | Orta | Kırışik | Opak |
| 294 | ST1A-27 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 295 | ST1B-1 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 296 | ST1B-2 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |

Tablo 5.3: Devam

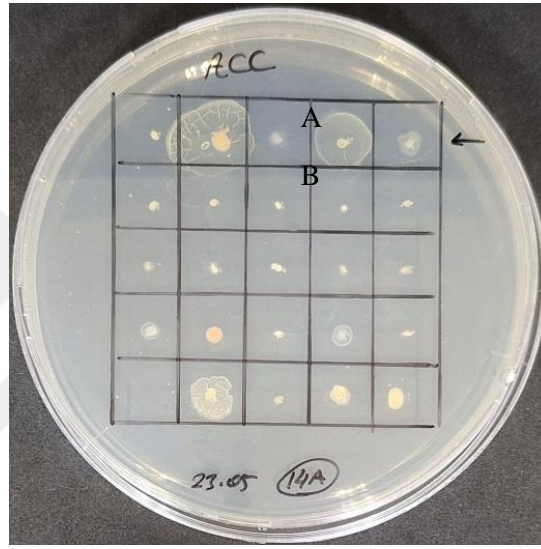
| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|---------|-------|-------------|-------------|
| 297 | ST1B-3 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 298 | ST1B-4 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 299 | ST1B-5 | Beyazımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 300 | ST1B-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 301 | ST1B-7 | Beyaz | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 302 | ST1B-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | İnce taneli | Opak |
| 303 | ST1B-9 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 304 | ST1B-10 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 305 | ST1B-11 | Beyaz | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 306 | ST1B-12 | Sarı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 307 | ST1B-13 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 308 | ST1B-14 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 309 | ST1B-15 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | İnce taneli | Opak |
| 310 | ST1B-16 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 311 | ST1B-17 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 312 | ST1B-18 | Beyaz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 313 | ST1B-19 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 314 | ST2A-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 315 | ST2A-2 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 316 | ST2A-3 | Sarı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 317 | ST2A-4 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 318 | ST2A-5 | Renksiz | Düzensiz | Düz | Loblu | Büyük | Parlak düz | Saydam |
| 319 | ST2A-6 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 320 | ST2A-7 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | İnce taneli | Opak |
| 321 | ST2A-8 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |

Tablo 5.3: Devam

| | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|----------|---------|---------|-------|-------------|-------------|
| 322 | ST2A-9 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 323 | ST2A-10 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 324 | ST2A-11 | Sarı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Opak |
| 325 | ST2A-12 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 326 | ST2A-13 | Beyaz | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 327 | ST2A-14 | Turuncu | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 328 | ST2A-15 | Beyaz | Dairesel | Kabarık | Bütün | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 329 | ST2A-16 | Sarı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 330 | ST2A-17 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 331 | ST2A-18 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Pürüzlü | Yarı saydam |
| 332 | ST2A-19 | Sarımsı | Dairesel | Kabarık | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 333 | ST2B-1 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 334 | ST2B-2 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 335 | ST2B-3 | Sarımsı | Dairesel | Dalgalı | Dalgalı | Küçük | Parlak düz | Opak |
| 336 | ST2B-4 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Küçük | İnce taneli | Opak |
| 337 | ST2B-5 | Renksiz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Yarı saydam |
| 338 | ST2B-6 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İnce taneli | Opak |
| 339 | ST2B-7 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Büyük | İri taneli | Opak |
| 340 | ST2B-8 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 341 | ST2B-9 | Sarımsı | Dairesel | Düz | Dalgalı | Büyük | İri taneli | Opak |
| 342 | ST2B-10 | Sarımsı | Düzensiz | Düz | Dalgalı | Orta | Parlak düz | Opak |
| 343 | ST2B-11 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Bütün | Büyük | Pürüzlü | Opak |
| 344 | ST2B-12 | Sarımsı | Noktasal | Düz | Loblu | Büyük | Parlak düz | Opak |
| 345 | ST2B-13 | Beyazımsı | Dairesel | Düz | Bütün | Orta | Parlak düz | Opak |
| 346 | ST2B-14 | Sarı | Dairesel | Konveks | Dalgalı | Büyük | Kırsık | Opak |
| 347 | ST2B-15 | Beyaz | Noktasal | Düz | Bütün | Küçük | Parlak düz | Opak |

5.5. ACC Deaminaz Üreten Bakterilerin Kalitatif Tayini

Farklı koloni morfolojilerine göre seçilen izolatların ACC Deaminaz enzim aktivitesinin kalitatif tayinini gerçekleştirmek amacıyla 2 farklı azot kaynağı (ACC; amonyum sülfat) içeren DF minimal besiyerine ve azot kaynağı içermeyen DF minimal ekilen bakterilerden ACC substratı içeren besiyerinde büyüüp amonyum sülfat içeren besiyerinde büyüme göstermeyen izolatlar seçildi ve ACC Deaminaz ürettiği düşünülen 90 izolat kantitatif tayin için izole edildi.



Şekil 5.4: ACC içeren DF minimal besiyerinde; A: büyüme gösteren; acc deaminaz pozitif olduğu düşünülen izolat, B: büyüme göstermeyen acc deaminaz negatif olduğu düşünülen izolat.

5.6. ACC Deaminaz Aktivitesinin Kantitatif Ölçüm Sonucu

Bu reaksiyonla üretilen μmol α -ketobütirat sayısı, bir örneğin 540nm'deki absorbansının 0,1 ile 1,0 μmol arasında değişen α -ketobütirat standart eğri karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir Tablo 5.4'te değerler verilmiştir.

Tablo 5.4: Seçilen izolatların ACC deaminaz aktivite değerleri.

| İzolat Adı | Absorbans (540nm) | Miktar (µmol) |
|-------------------|--------------------------|----------------------|
| DT1A-7 | 0,012599 | 0,056921 |
| DT2A-14 | 0,016933 | 0,075063 |
| DT1A-13 | 0,032696 | 0,141044 |
| DT1A-10 | 0,050808 | 0,216861 |
| ST1A-21 | 0,007332 | 0,034877 |
| DT2B-5 | 0,020586 | 0,090356 |
| KT1A-4 | 0,005061 | 0,025368 |
| DT2B-7 | 0,007664 | 0,036264 |
| DT1A-2 | 0,030916 | 0,133594 |
| KT2A-12 | 0,021102 | 0,092516 |
| ST2A-15 | 0,032007 | 0,138162 |
| DT1A-9 | 0,016009 | 0,071195 |
| DT1A-6 | 0,038655 | 0,16599 |
| DT2A-15 | 0,016491 | 0,073213 |
| ST2S-19 | 0,003881 | 0,020429 |
| AT2A-13 | 0,013061 | 0,058855 |
| ST2A-17 | 0,030312 | 0,131067 |
| ST1A-26 | 0,01252 | 0,056593 |
| DT2B-10 | 0,002843 | 0,016086 |
| ST1A-17 | 0,078226 | 0,331628 |
| ATA2-10 | 0,018802 | 0,082888 |
| TT1B-28 | 0,009393 | 0,043501 |
| KT2A-16 | 0,020717 | 0,090904 |
| TT1A-31 | 0,023795 | 0,103786 |
| KT1A-5 | 0,020109 | 0,088357 |
| AT2A-16 | 0,019332 | 0,085105 |
| TT2A-13 | 0,028539 | 0,123644 |
| KT1A-3 | 0,015693 | 0,069874 |
| KT1A-1 | 0,02231 | 0,08921 |
| TT1A-16 | 0,010594 | 0,048529 |
| AT1A-23 | 0,022587 | 0,098732 |
| AT2A-18 | 0,043032 | 0,184311 |
| KT2A-8 | 0,024156 | 0,10299 |
| TT1A-32 | 0,020618 | 0,090488 |
| TT1A-13 | 0,017934 | 0,079253 |
| AT1A-24 | 0,052166 | 0,222543 |
| TT1A-20 | 0,045586 | 0,195 |
| AT2A-1 | 0,065842 | 0,279789 |
| AT1A-16 | 0,043474 | 0,186159 |
| DT2A-4 | 0,008886 | 0,041379 |
| AT1A-22 | 0,027869 | 0,120841 |
| AT2A-5 | 0,038138 | 0,163824 |
| AT1B-8 | 0,018639 | 0,082204 |
| TT1B-20 | 0,065306 | 0,277545 |
| TT1A-23 | 0,022878 | 0,09995 |
| AT2A-8 | 0,031133 | 0,134504 |

Tablo 5.4: Devam.

| | | |
|---------|----------|----------|
| AT2A-4 | 0,031051 | 0,134161 |
| AT1A-2 | 0,026076 | 0,113336 |
| AT1B-9 | 0,026973 | 0,117089 |
| AT1A-10 | 0,030399 | 0,131429 |
| AT1A-7 | 0,033489 | 0,144364 |
| AT1A-13 | 0,039094 | 0,167828 |
| AT1B-6 | 0,001227 | 0,009324 |
| AT1A-17 | 0,052605 | 0,224383 |
| AT1B-13 | 0,034319 | 0,147838 |
| AT2B-9 | 0,023838 | 0,103968 |
| KT1B-14 | 0,040863 | 0,175230 |
| TT1A-18 | 0,041393 | 0,177451 |
| KT1B-4 | 0,026597 | 0,115517 |
| ST2B-14 | 0,045874 | 0,196208 |
| AT1B-3 | 0,019106 | 0,084160 |
| KT1B-5 | 0,022460 | 0,098198 |
| DT1B-11 | 0,026244 | 0,114037 |
| KT1B-10 | 0,030919 | 0,133606 |
| TT1B-9 | 0,030952 | 0,133744 |
| DT2B-2 | 0,046578 | 0,199154 |
| TT2B-11 | 0,025304 | 0,110105 |
| TT1B-13 | 0,018113 | 0,080004 |
| AT1B-12 | 0,010859 | 0,049640 |
| AT2B-8 | 0,037069 | 0,159349 |
| KT2B-12 | 0,046420 | 0,198493 |
| ST2B-7 | 0,051941 | 0,221603 |
| DT1B-9 | 0,032622 | 0,140737 |
| KT1B-12 | 0,027514 | 0,119355 |
| KT1B-8 | 0,023918 | 0,104301 |
| KT2B-20 | 0,033181 | 0,143075 |
| KT1B-16 | 0,013774 | 0,061842 |

5.7. Seçilen İzolatların Ön Tanımlama Test Sonuçları

Seçilen 90 izolatın Gram boyama, spor boyama, oksidaz ve katalaz testleri gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları Tablo 5.5’ te verilmiştir.

Tablo 5.5: İzolatların ön tanımlama testi sonuçları.

| İzolat Numarası | İzolatın Adı | Gram Boyama | Hücre Şekli | Spor Boyama | Katalaz | Oksidaz |
|-----------------|--------------|-------------|--------------------|-------------|---------|---------|
| 1 | AT1A-02 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 2 | AT1A-07 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | + | + |
| 3 | AT1A-10 | Gram (+) | Basil-streptobasil | + | +++ | - |
| 4 | AT1A-13 | Gram (-) | Basil-diplobasil | - | ++ | + |
| 5 | AT1A-16 | Gram (-) | Basil-diplobasil | - | ++++ | + |
| 6 | AT1A-17 | Gram (+) | Basil | + | ++ | + |
| 7 | AT1A-18 | Gram (-) | Basil | - | +++ | - |
| 8 | AT1A-22 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | ++ | + |
| 9 | AT1A-23 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | ++ | + |
| 10 | AT1A-24 | Gram (+) | Basil-diplobasil | + | ++ | - |
| 11 | AT1B-03 | Gram (+) | Basil-diplobasil | + | ++ | - |
| 12 | AT1B-06 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | + | - |
| 13 | AT1B-08 | Gram (-) | Basil-basil | - | + | - |
| 14 | AT1B-09 | Gram (+) | Basil-basil | + | + | + |
| 15 | AT1B-10 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | + | - |
| 16 | AT1B-12 | Gram (-) | Basil-kokobasil | - | ++ | - |
| 17 | AT1B-13 | Gram (+) | Basil | + | ++++ | - |
| 18 | AT2A-01 | Gram (-) | Basil | - | - | + |
| 19 | AT2A-03 | Gram (-) | Basil | - | - | - |
| 20 | AT2A-04 | Gram (-) | Basil | - | - | + |
| 21 | AT2A-05 | Gram (-) | Basil | - | - | + |
| 22 | AT2A-08 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 23 | AT2A-10 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | + | - |
| 24 | AT2A-13 | Gram (+) | Basil | + | ++++ | - |
| 25 | AT2A-16 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 26 | AT2A-18 | Gram (+) | Basil | + | + | + |

Tablo 5.5: Devam.

| | | | | | | |
|----|---------|----------|-------------------------|---|------|---|
| 27 | AT2B-05 | Gram (-) | Basil | - | ++++ | - |
| 28 | AT2B-07 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | ++++ | - |
| 29 | AT2B-08 | Gram (-) | Basil | - | ++ | - |
| 30 | AT2B-09 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | + | - |
| 31 | AT2B-10 | Gram (-) | Basil | - | +++ | - |
| 32 | DT1A-02 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | ++ | - |
| 33 | DT1A-06 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | + | - |
| 34 | DT1A-07 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 35 | DT1A-09 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | + | - |
| 36 | DT1A-10 | Gram (+) | Basil - kokobasil | + | + | - |
| 37 | DT1A-13 | Gram (-) | Basil | - | + | - |
| 38 | DT1B-09 | Gram (-) | Basil | - | ++ | - |
| 39 | DT1B-11 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | + | - |
| 40 | DT2A-04 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 41 | DT2A-12 | Gram (+) | Basil - streptobasil | + | ++ | - |
| 42 | DT2A-14 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | ++ | - |
| 43 | DT2A-15 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | ++ | + |
| 44 | DT2B-02 | Gram (+) | Basil - kokobasil | + | + | - |
| 45 | DT2B-05 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 46 | DT2B-07 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 47 | DT2B-10 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | +++ | - |
| 48 | DT2B-11 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 49 | KT1A-01 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 50 | KT1A-03 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 51 | KT1A-04 | Gram (+) | Basil - kokobasil | + | ++++ | - |
| 52 | KT1A-05 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | +++ | - |
| 53 | KT1A-06 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 54 | KT1A-11 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | ++ | - |
| 55 | KT1B-04 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | + | + |
| 56 | KT1B-05 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 57 | KT1B-08 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | +++ | - |

Tablo 5.5: Devam.

| | | | | | | |
|-----------|---------|----------|----------------------|---|------|---|
| 58 | KT1B-10 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | +++ | - |
| 59 | KT1B-12 | Gram (+) | Basil | + | ++++ | - |
| 60 | KT1B-14 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 61 | KT1B-16 | Gram (+) | Basil - streptobasil | + | +++ | - |
| 62 | KT2A-08 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 63 | KT2A-12 | Gram (+) | Basil - streptobasil | + | +++ | - |
| 64 | KT2A-16 | Gram (+) | Basil - streptobasil | + | ++ | - |
| 65 | KT2B-12 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 66 | KT2B-20 | Gram (-) | Kok | - | +++ | - |
| 67 | ST1A-17 | Gram (-) | Basil | - | ++++ | - |
| 68 | ST1A-21 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 69 | ST1A-26 | Gram (-) | Basil - diplobasil | - | ++ | + |
| 70 | ST1B-02 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 71 | ST2A-15 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | + | - |
| 72 | ST2A-17 | | | | | - |
| 73 | ST2A-19 | Gram (+) | Basil | + | ++++ | - |
| 74 | ST2B-07 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | +++ | + |
| 75 | ST2B-14 | Gram (-) | Kok | - | +++ | - |
| 76 | TT1A-10 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 77 | TT1A-12 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 78 | TT1A-13 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 79 | TT1A-16 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | ++ | - |
| 80 | TT1A-18 | Gram (-) | Basil - kokobasil | - | + | - |
| 81 | TT1A-20 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 82 | TT1A-23 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 83 | TT1A-31 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 84 | TT1A-32 | Gram (+) | Basil - diplobasil | + | - | - |
| 85 | TT1B-09 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |
| 86 | TT1B-13 | Gram (+) | Basil | + | ++ | - |
| 87 | TT1B-20 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 88 | TT1B-28 | Gram (-) | Basil | - | ++ | + |
| 89 | TT2A-13 | Gram (+) | Basil | + | + | - |
| 90 | TT2B-11 | Gram (+) | Basil | + | +++ | - |

Gram boyama sonuçlarına bakıldığında 47 izolatın Gram (+), 42 izolatın Gram (-) olduğu belirlenmiştir. Hücre morfolojilerine bakıldığında 50 izolatın basil, 22 izolatın kokobasil, 12 izolatın diplobasil, 5 izolatın streptobasil ve 2 izolatın kok olduğu tespit edilmiştir.

85 izolatın farklı seviyelerde katalaz pozitif, 5 izolatın katalaz negatif olduğu; oksidaz testlerinde ise 21 izolatın oksidaz pozitif, 68 izolatın oksidaz negatif olduğu belirlenmiştir.

Yalnızca Gram pozitif izolatlar üzerinde spor boyama yapılmış ve sonuçlara göre 48 Gram pozitif 43 izolatın endospor varlığı tespit edilmiş, 23'ünde ise endospor görülmemiştir.

5.8. Seçilen İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

ACC deaminaz aktivasyonunun kantitatif sonuçları değerlendirilğinde, pozitif kontrole görece en iyi ACC deaminaz aktivitesi gösteren 3 izolat seçilerek IMViC, hareketlilik, H₂S üretimi, oksidasyon-fermantasyon, karbonhidrat kullanımı, lizin, ornitin, arjinin dekarboksilaz, üreaz, fenilalanin deaminaz ve ONPG biyokimyasal testleri gerçekleştirilmiştir. 3 izolat için biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde her üç izolatında indol, hareketlilik ve H₂S üretimi yönünden negatif olduğu belirlenmiştir. 3 izolatın 2'si sitrat pozitif; 1'i sitrat negatiftir. Bakterilerin karbonhidratları oksidasyon yoluyla mı fermentasyon yoluyla mı metabolize ettiğini anlamak için oksidasyon-fermantasyon sonuçları incelendiğinde 1 izolatın fakültatif anaerob, diğer 2 izolatın ise mineral yağ ile kaplı tüpte renk değişimi olmaması ve mineral yağ eklenmemiş tüpteki besiyerinin rengin alkaliye dönüşmesi negatif bir sonucu gösterir yani glikozu fermentasyon veya oksidatif olarak kullanamaz. Mineral yağ içermeyen tüpün tepesindeki mavi, ortamdaki proteinin metabolizmasından kaynaklanan amin üretiminden kaynaklanır. Sonuçlar tablo 5.7'de verilmiştir. İzolatların MR-VP test sonuçları incelendiğinde 1 izolatın MR pozitif sonuç verdiği; diğer iki izolatın ise negatif sonuç verdiği görülmektedir. 3 izolatın sitrat testi ise 2 izolatın sitrat pozitif; 1 izolatın sitrat negatif olduğu belirlenmiştir. Karbonhidrat kullanımı testinde ise karbon kaynağı olarak laktoz eklenen besiyerinde 2 izolat pozitif; 1 izolat negatif sonuç verirken ONPG test sonuçlarında her 3 izolatta pozitif sonuçlar gözlemlenmiştir. Fenilalanin deaminaz

testinde her 3 izolatında negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Test sonuçları Tablo 5.5, 5.6 ve 5.7’de verilmiştir.

Tablo 5.6: Seçilmiş 3 izolatın hareketlilik, H₂S üretimi, IMViC ve üreaz testi sonuçları.

| İzolat Adı | Hareketlilik | H ₂ S Üretimi | IMViC Testi | | | | Üreaz |
|------------|--------------|--------------------------|-------------|-----------------|-------|--------|-------|
| | | | İndol | Metil Kırmızısı | Voges | Sitrat | |
| AT1A-22 | - | - | - | - | TE | + | - |
| DT2A-4 | - | - | - | + | TE | - | - |
| ST1A-17 | - | - | - | - | TE | + | - |

*TE: Tespit edilemedi

Tablo 5.7: Seçilmiş 3 izolatın oksidasyon-fermantasyon, lizin, ornitin, arjinin dekarboksilaz, fenilalanin deaminaz ve ONPG testi sonuçları.

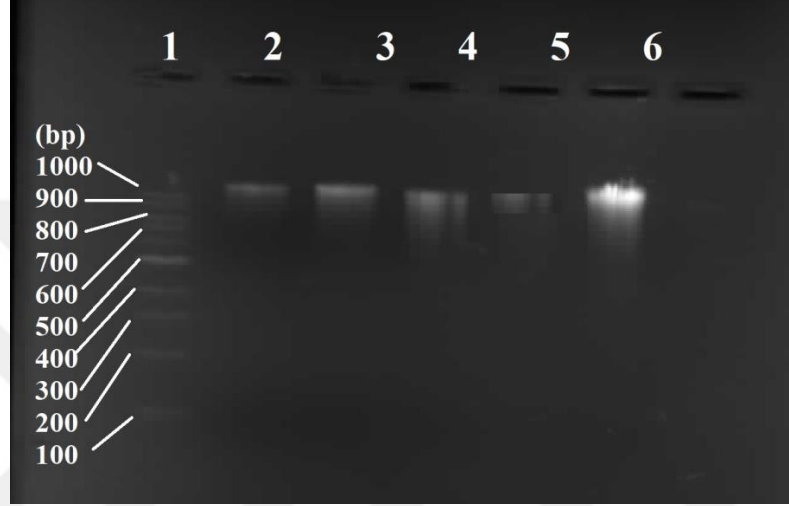
| İzolat Adı | O/F Testi | | | Dekarboksilaz Testi | | | Fenilalanin Deaminaz Testi | ONPG Testi |
|------------|-----------|--------------------|-------|---------------------|-------|---------|----------------------------|------------|
| | Aerob | Fakültatif anaerob | Inert | Arjinin | Lizin | Ornitin | | |
| AT1A-22 | | + | | + | inert | inert | - | + |
| DT2A-4 | | | + | - | - | - | - | + |
| ST1A-17 | | | + | inert | inert | inert | - | + |

Tablo 5.8: Seçilen 3 izolatın karbonhidrat kullanımı testi sonuçları.

| İzolat Adı | Glukoz | | G.G.O.* | | Mannitol | | Ksiloz | | Trehaloz | | Sükroz | | Sellobiyoz | | Mannoz | | Laktoz | |
|------------|--------|-----|---------|-----|----------|-----|--------|-----|----------|-----|--------|-----|------------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s | 24s | 48s |
| AT1A-22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| DT2A-4 | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ST1A-17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

5.9. Genomik DNA İzolasyonu

3 izolat ve 2 kontrol bakterisinden metotta belirtildiği gibi genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve DNA varlığı agaroz jelde görüntüledi (Şekil 5.5). Nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 5.9’de verilmiştir.



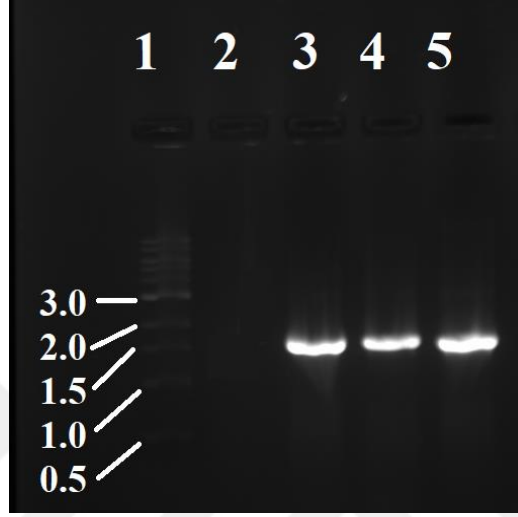
Şekil 5.5: Genomik DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: 100bp marker, 2: Negatif kontrol bakterisi, 3: Pozitif kontrol bakterisi 4-6: izolatlar.

Tablo 5.9: g DNA örneklerinin NanoDrop ölçüm sonuçları.

| | Miktar (ng/µl) | A260/280 |
|----------------|-----------------------|-----------------|
| AT1A-22 | 107 | 1.87 |
| DT2A-4 | 15.4 | 1.78 |
| ST1A-17 | 142.4 | 1.80 |

5.10. 16S rDNA Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizi

Elde edilen yerel izolatların tür düzeyinde tanımlanması için 16S rDNA bölgesinin 27F, 1492R primerleri kullanılarak pzs gerçekleştirildi. 16S rDNA pzs ürünleri agaroz jel ile varlığı görüntülendi. Jel görüntüsü Şekil 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.6: PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1: 100 bp marker, 2: Negatif kontrol, 3-5: PZR ürünleri.

5.11. Dizi Analiz Sonuçları

Topraktan izole edilen 3 izolatın tanımlama sonuçları BLASTn programı kullanılarak analiz edilmiştir. Benzerlik yüzdeleri ve tanımlama sonuçları Tablo 5.10'da verilmiştir.

Tablo 5.10: İzolatların 16S rDNA analiz sonuçları.

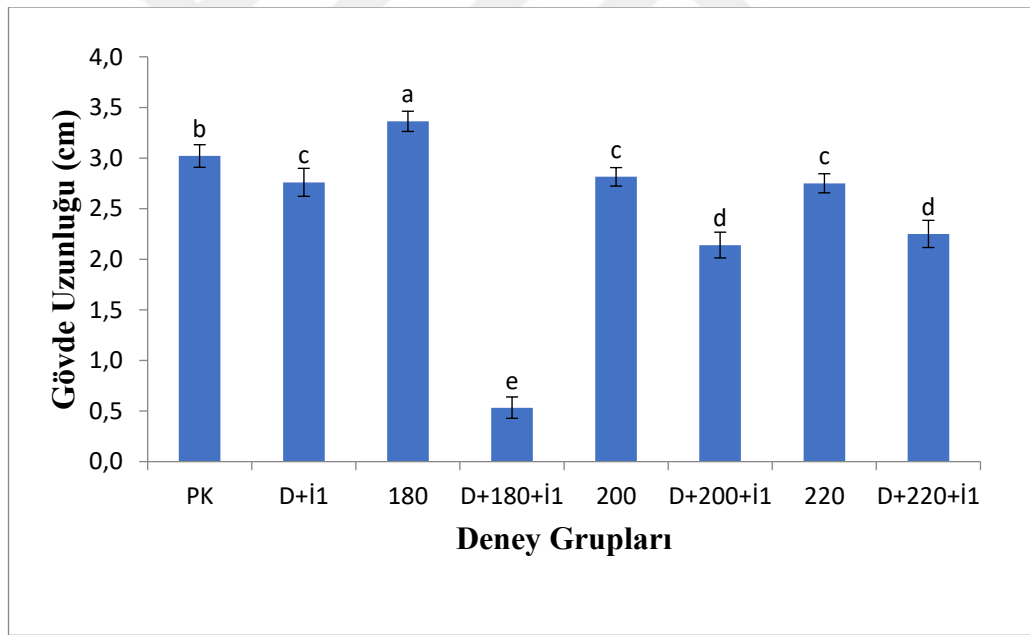
| İzolat Adı | BLASTn Sonucu | Benzerlik Yüzdesi | Takson Tahmini |
|---|---|-------------------|--------------------------|
| AT1A-22 (seçilmiş izolat olarak yeni kodu i1) | <i>Pseudomonas azotoforms</i> strain LCG49 | 99.84% | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| | <i>Pseudomonas</i> sp. strain M14 | 99.84% | |
| | <i>Pseudomonas</i> sp. strain P1 | 99.84% | |
| DT2A-4 (seçilmiş izolat olarak yeni kodu i2) | <i>Niallia circulans</i> strain PF7-1.3.1 | 100% | <i>Niallia</i> sp. |
| | <i>Niallia circulans</i> strain FDAARGOS | 100% | |
| | <i>Niallia circulans</i> strain DES601 | 100% | |
| ST1A-17 (seçilmiş izolat olarak yeni kodu i3) | <i>Achromobacter spanius</i> strain DYCC3703 | 99.91% | <i>Achromobacter</i> sp. |
| | <i>Achromobacter spanius</i> strain OUCC MY32 | 99.91% | |
| | <i>Achromobacter spanius</i> strain UQ283 | 99.91% | |

5.12. Seçilmiş İzolatların Tuz Stresinde Domates Tohumlarının Çimlenmeye Etkisi

Seçilmiş 3 izolatın tuz stres koşulları altında domates tohumun çimlenme ve 1 haftalık gelişim sürecinde etkilerinin gözlemlendiği denemelerden elde edilen sonuçlar aşağıda detaylı olarak sunulmuştur.

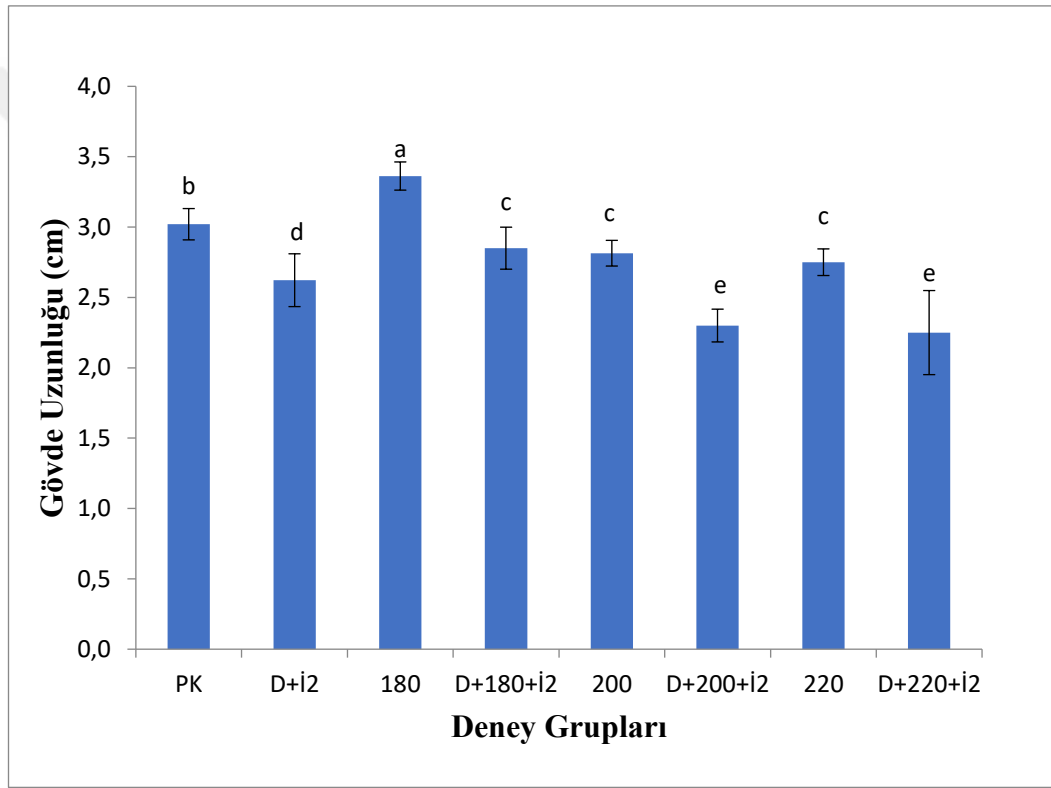
5.12.1. Gövde Uzunluğu

Gövde uzunluğu parametresinin değerlendirildiği denemede Şekil 5.7 incelendiğinde, PK (3,02 cm)'e görece 1. İzolatın (i1) etkisi D+i1 denemesinde 2,76 cm olarak izlenmiştir. Gövde uzunluğuna en olumlu etkinin 180 mM tuz stresi uygulanan deneme olduğu görülmüştür. 200 ve 220 mM tuz uygulamasının sırasıyla 2,81 cm ve 2,75 cm ile gövde uzunluğunu görece azalttığı ve negatif etkilediği anlaşılmaktadır. İlgili bakteri ve tuz stres konsantrasyonlarının birlikte uygulandığı kombinasyonlarda ise en düşük değerin ölçüldüğü D+180+ i1 deneme grubunda (0,53 cm) görülmüştür. Diğer uygulamalar D+200+i1 ve D+220+i3 denemelerinde gövde uzunluğu sırasıyla 2,14 ve 2,25 cm olarak ölçülmüş ve aynı istatistik grup içerisinde yer almışlardır. Diğer uygulamalar içinde D+i1, 200 ve 220 mM tuz uygulamaları da aynı istatistik grup içinde yer alarak anlamlı bir fark ortaya koymamışlardır.



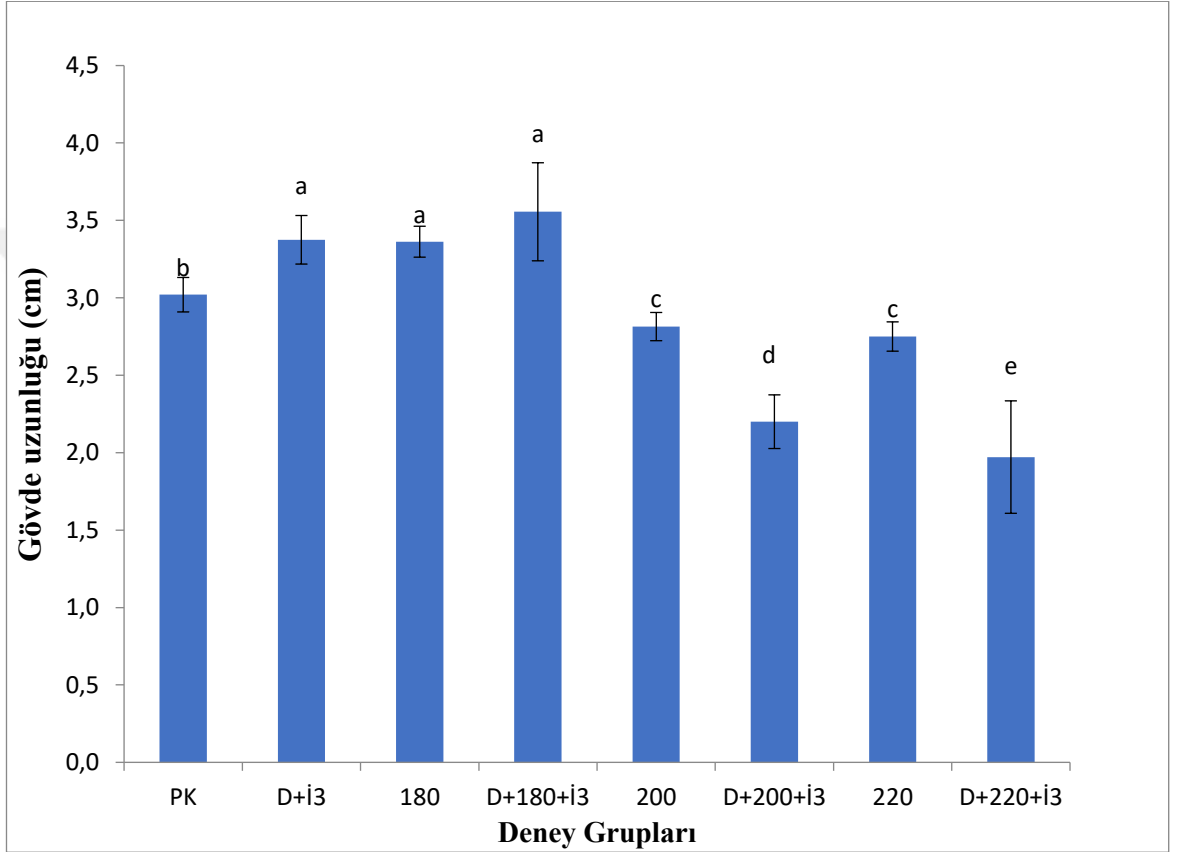
Şekil 5.7: ATA1-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin gövde uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

DT2A-4 izolatu (i2) da normal koşullar (PK, 3,02 cm) ile karşlaştırıldığında 180 mM (3,36 cm) tuz konsantrasyonu uygulamasında daha uzun gövde boyu sonucunu vermiştir. 200 (2,81 cm) ve 220 (2,75 cm) mM NaCl tuz stresinde çimlendirilen uygulamalar ise kontrole görece daha düşük gövde uzunluğunu vermiş ve her ikisi de aynı istatistik grup içerisinde yer almışlardır (şekil 5.8). Grafik incelendiğinde nihai sonuç olarak tek başına farklı tuz konsantrasyonları (180- 3,36 cm; 200- 2,81; 220 2,75 cm) uygulamalarına ilgili izolat eklendiğinde gövde uzunlukların da (sırasıyla 2,85 cm, 2,30 cm, 2,25 cm) düşüş kaydedilmiştir. Bu da tuz konsantrasyonları bakteri ile uygulandığında olumsuz bir etki olarak değerlendirilmiştir.



şekil 5.8: DT2A-4 izolatu tuz stres koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin gövde uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ2: DTA2A-4 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

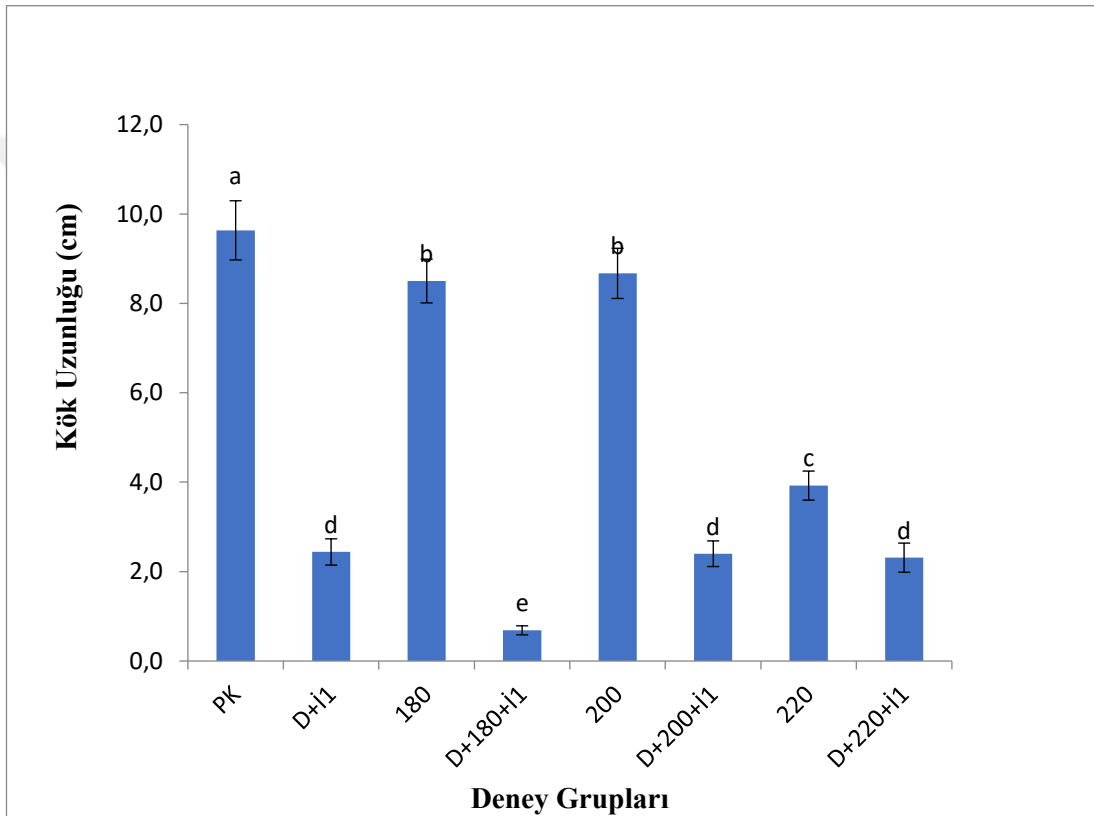
ST1A-17 izolatu (i3) da normal koşullar (PK, 3,02 cm) ile karşlaştırıldığında izolatu etkisi (3,38 cm), tuz konsantrasyonu uygulamasında 180 mM; 3,36 cm ve D+180+i3 uygulamasında (3,36 cm) kontrole g6rece daha uzun g6vde sonucu vermiştir ve her u6ç grup aynı istatistik grup i6çerisinde yer almışlardır (şekil 5.9). Grafik incelendiğinde D+200+i3 ve D+220+i3 denemelerinde g6vde uzunluğu sırasıyla 2,20 cm; 1,97 cm olarak 6l6çm6ř, olumsuz olarak değerlendirilmiş.



şekil 5.9: ST1A-17 izolatu tuz stresi koşullarında (180, 200, 220 mM) domates bitkisinin g6vde uzunluğuuna etkisi. . PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ3: ST1A-17 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

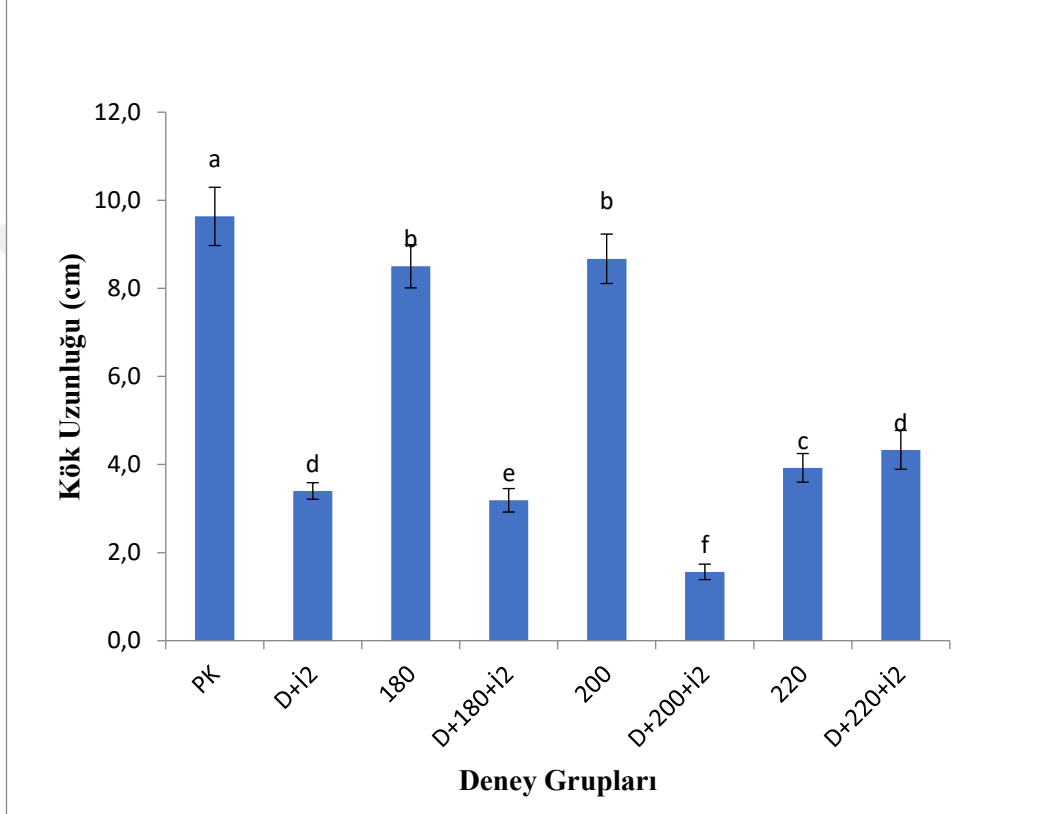
5.12.2. Kök Uzunluğu

Kök uzunluğu parametresinin değerlendirildiği denemede Şekil 5.10 incelendiğinde, İ1 (AT1A-22) izolatu normal koşullar (PK, 9,63 cm) ile karşılaştırıldığında izolatu etkisi (2,44 cm), tuz konsantrasyonu uygulamasında D+180+İ1 (0,69 cm), D+200+İ1 uygulamasında (2,40 cm) ve D+220+İ1 uygulamasında (2,31 cm) kontrole görece daha kısa kök uzunluğu sonucunu vermiştir ve izolatu tuz konsantrasyonlarında bitkinin kök uzunluğuna olumsuz etkisi olarak değerlendirilmiştir.



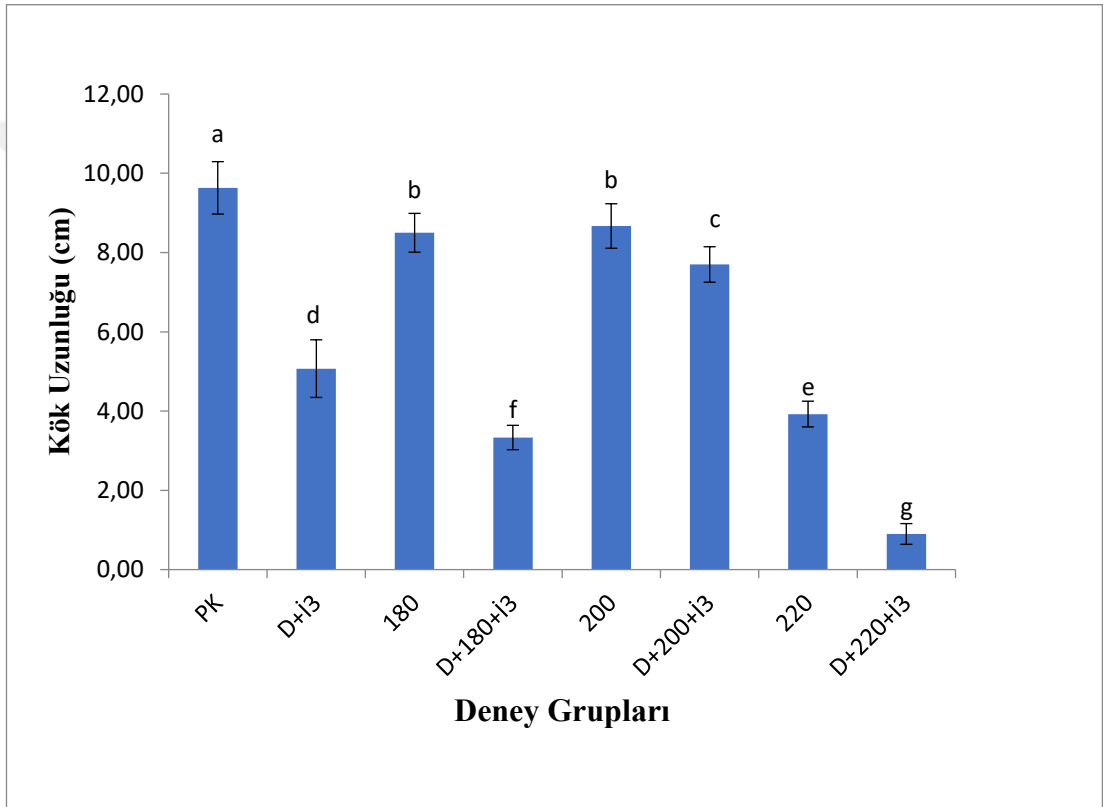
Şekil 5.10: ATA1-22 izolatu tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

İ2 (DT2A-4) izolatu normal koşullar (PK, 9,63 cm) ile karşılaştırıldığında i2 izolatuının etkisi (3,40 cm) kontrole g6rece daha kısa k6k uzunluğu sonucunu vermiştir. 180 ve 200 mM konsantrasyon denemeleri sırasıyla; 8,50 cm ve 8,67 cm PK'ye g6rece daha az k6k uzunluğu sonucunu vermiştir ve aynı istatistiksel grup i6inde yer almaktadırlar. Ancak D+180+i2 (3,19 cm), D+200+i2 (3,19 cm) ve D+220+i2 (4,33 cm) uygulamalarına g6re daha uzun k6k uzunluğu sonucunu vermiştir.



şekil 5.11: DT2A-4 izolatuının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin k6k uzunluğuına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ2: DT2A-4 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

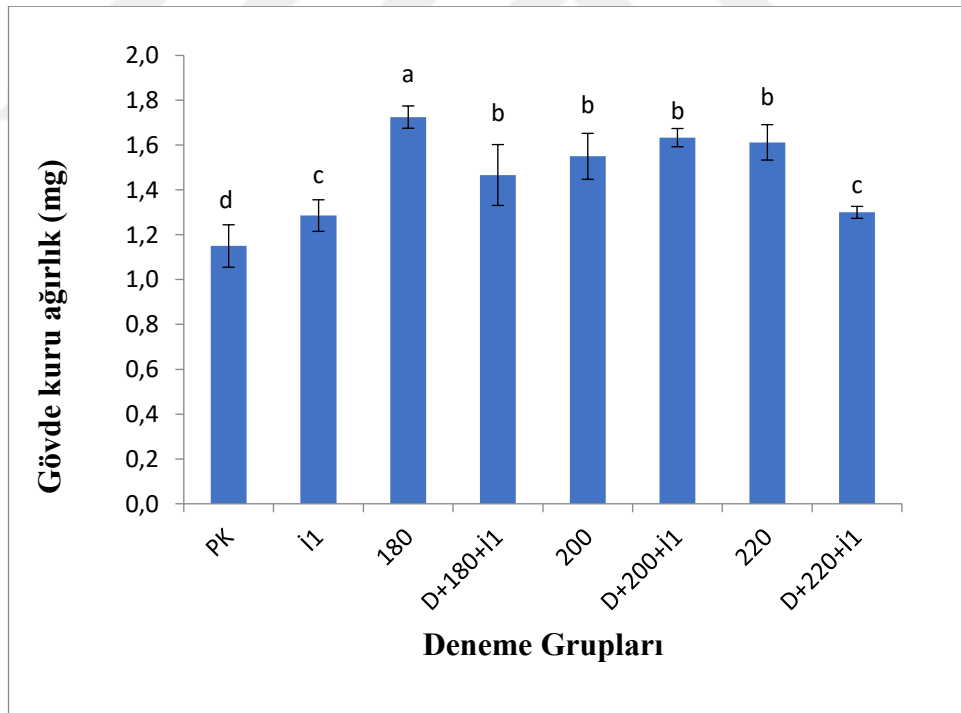
Şekil 5.12'deki sonuçlar değerlendirildiğinde i3 (ST1A-17) izolatu normal koşullarda (PK; 9,63 cm) i3 izolatu değerlendirildiğinde PK' ye görece (5,07 cm) daha kısa kök uzunluğu sonucunu vermiştir. 180 ve 200 mM konsantrasyon denemelerinde sırasıyla 8,50 cm; 8,67 cm kök uzunluğu sonucu aynı istatistiksel grup içinde yer almaktadır ancak kontrole görece daha kısa kök uzunluğu sonucunu vermiştir. Nihai olarak grafik incelendiğinde i2 bakteri uygulamasının ve D+180+i2, D+200+i3, D+220+i2 uygulamasının domates kök uzunluğuna olumsuz etkisi olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.12: ST1A-17 izolatinın tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin kök uzunluğuna etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ3: ST1A-17 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

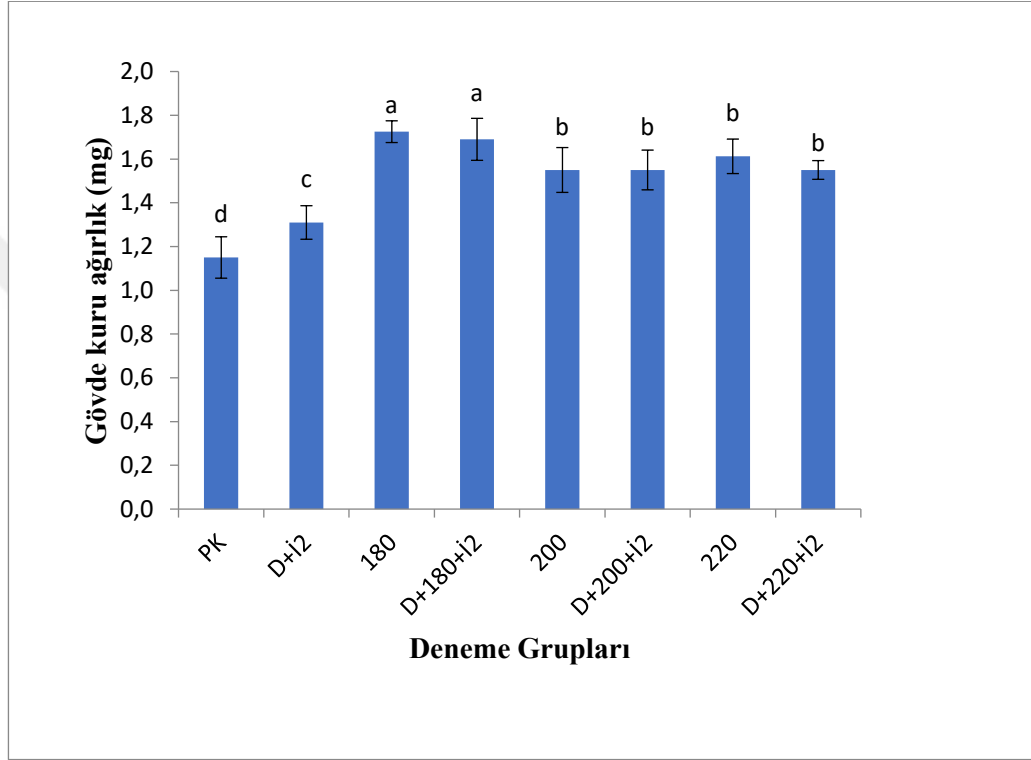
5.12.3. Gövde Kuru Ağırlığı

Şekil 5.13 incelendiğinde, İ1 (AT1A-22) izolatu (1,29 mg) normal koşullarda (PK; 1,15 mg) kontrole görece değerlendirildiğinde gövde kuru ağırlığı arttırdığı ve D+220+İ3 uygulamasının da (1,30 mg) kontrole göre gövde kuru ağırlığını arttırdığı ve aynı istatikselsel grup içinde değerlendirilmiştir. Tek başına farklı tuz konsantrasyonları; 180, 200, 220 mM uygulandığında sırasıyla 1,73 mg, 1,55 mg, 1,61 mg sonucunu vermiştir ve pozitif kontrole görece gövde kuru ağırlığına olumlu etkisi olarak değerlendirilmiştir. D+180+İ1, D+200+İ2, farklı konsantrasyonlarda tuz uygulamaları 200, 220 mM sırasıyla 1,47; 1,55 mg; 1,63 mg, 1,61 mg gövde kuru ağırlığını pozitif kontrole göre arttırmıştır ve aynı istatikselsel grup için yer almaktadırlar. Nihai olarak şekil 5.17 değerlendirildiğinde sadece İ1 uygulamasının, farklı tuz konsantrasyonlarının uygulanması ve farklı tuz konsantrasyonlarının İ1 izolatu ile uygulanması PK'ye görece çimlenmiş domatesin gövde kuru ağırlığına arttırıcı etkisi olmuştur.



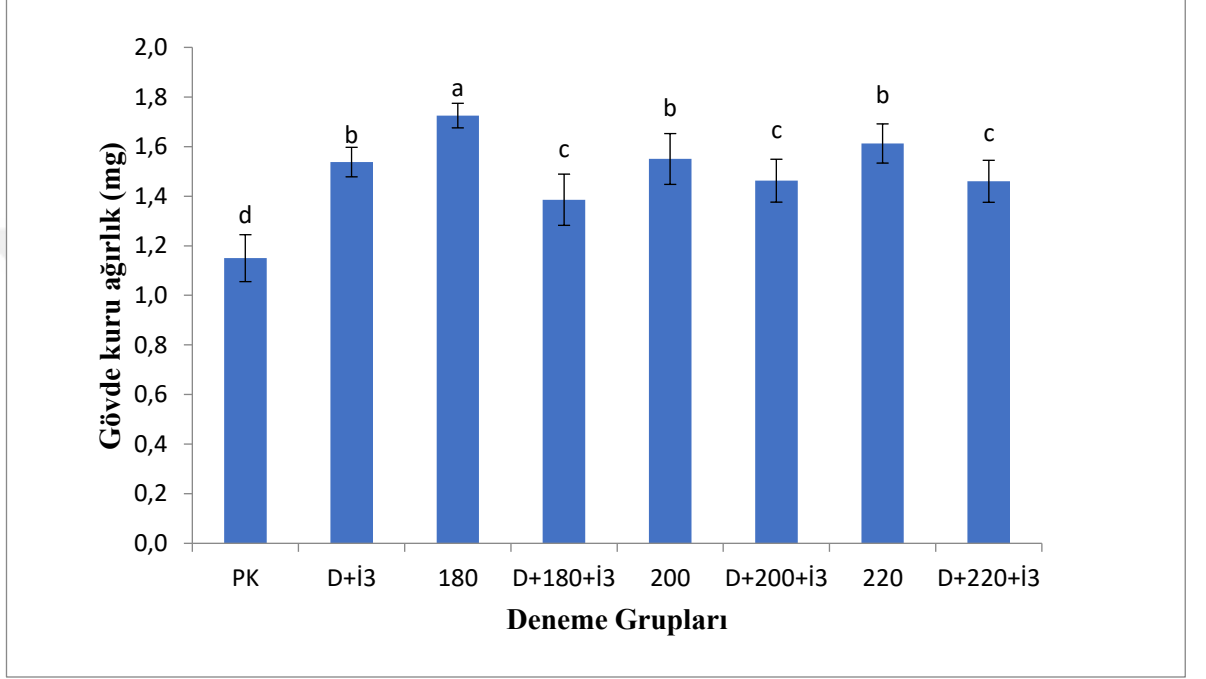
Şekil 5.13: AT1A-22 izolatu'nun tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

Şekil 5.14 incelendiğinde i2 (DT2A-4) izolatu normal koşullarda (PK; 1,15 mg) kontrole görece çimlenmiş domates tohumunun daha ağır gövde kuru ağırlığı sonucunu vermiştir. 180; D+180+i2, 200; D+200+i2, 220; D+200+i2 deney grupları sırasıyla 1,73 mg, 1,69 mg; 1,55 mg, 1,55 mg ve 1,61 mg, 1,55 mg sonucu vermiştir. Bu sonuçlar PK'ye göre gövde kuru ağırlığı artırıcı etkisi olup deneme grupları kendi aralarında aynı istatistiksel grup içinde yer almaktadır.



Şekil 5.14: DT2A-4 izolatinin tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ2: DT2A-4 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

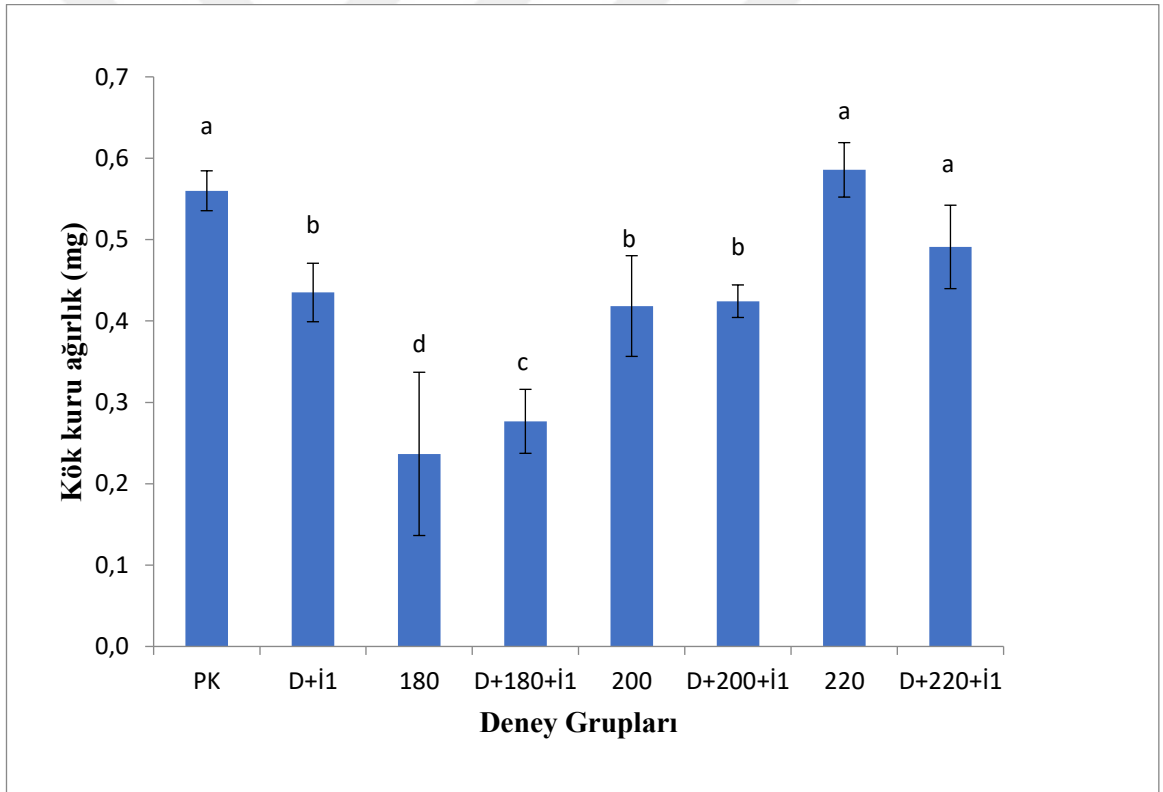
İ3 (ST1A-17) izolatu (1,54 mg) normal koşullarda (PK; 1,15 mg) kontrole g6rece değerlendirildiğinde g6vde kuru ağırlığı arttırdığı sonucunu vermiştir. Nihai olarak Şekil 5.15 değerlendirildiğinde farklı konsantrasyon denemeleri (180, 200, 220) sırasıyla 1,73 mg; 1,55 mg; 1,61 mg g6vde kuru ağırlığını PK' ye ve D+180+i3, D+200+i3, D+220+i3 deneme gruplarına kıyasla (sırasıyla 1,39 mg; 1,46 mg; 1,46 mg) imlenmiş domatesin g6vde kuru ağırlığını arttırdığı sonucunu vermiştir.



Şekil 5.15: ST1A-17 izolatuının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin g6vde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ3: ST1A-17 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

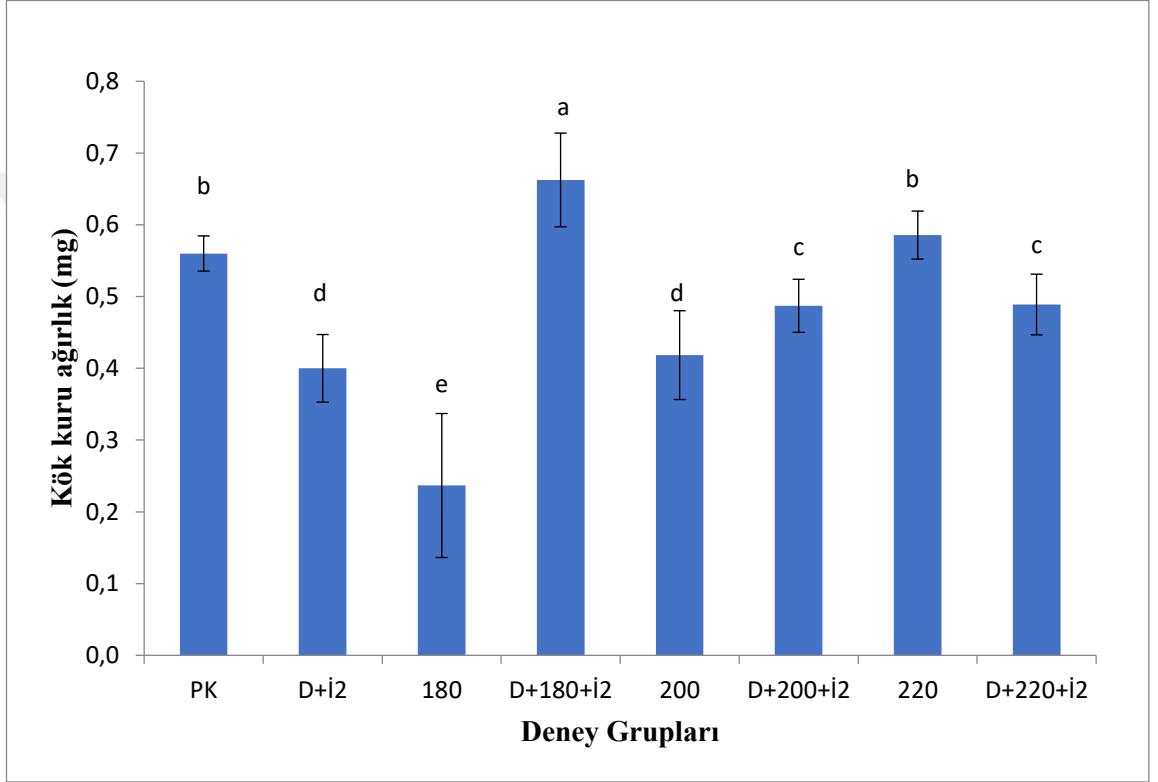
5.12.4. Kök Kuru Ağırlığı

İ1 (AT1A-22) izolatı (0,44 mg) normal koşullarda (PK; 0,56 mg) kontrole görece değerlendirildiğinde gövde kuru ağırlığı azalttığı sonucunu vermiştir. Şekil 5.16 incelendiğinde 180 tuz konsantrasyonu ve D+180+i1 deney gruplarının sırasıyla 0,24 mg; 0,28 mg sonuç verdiği yani 180 mM konsantrasyon uygulamasında i1 bakterisinin kök kuru ağırlığına arttırucu etki ettiği, 200 tuz konsantrasyonu ve D+200+i1 deney gruplarının sırasıyla 0,42 mg; 0,42 mg sonuç verdiği ve D+i1 deney grubu ile aynı istatistiksel grupta bulunduğu, 220 tuz konsantrasyonu ve D+220+i1 deney gruplarının sırasıyla 0,59 mg; 0,49 mg sonuç vererek 220 mM konsantrasyon denemesinde i1 bakteri uygulamasının kök kuru ağırlığına etki etmediği sonucunu vermiştir.



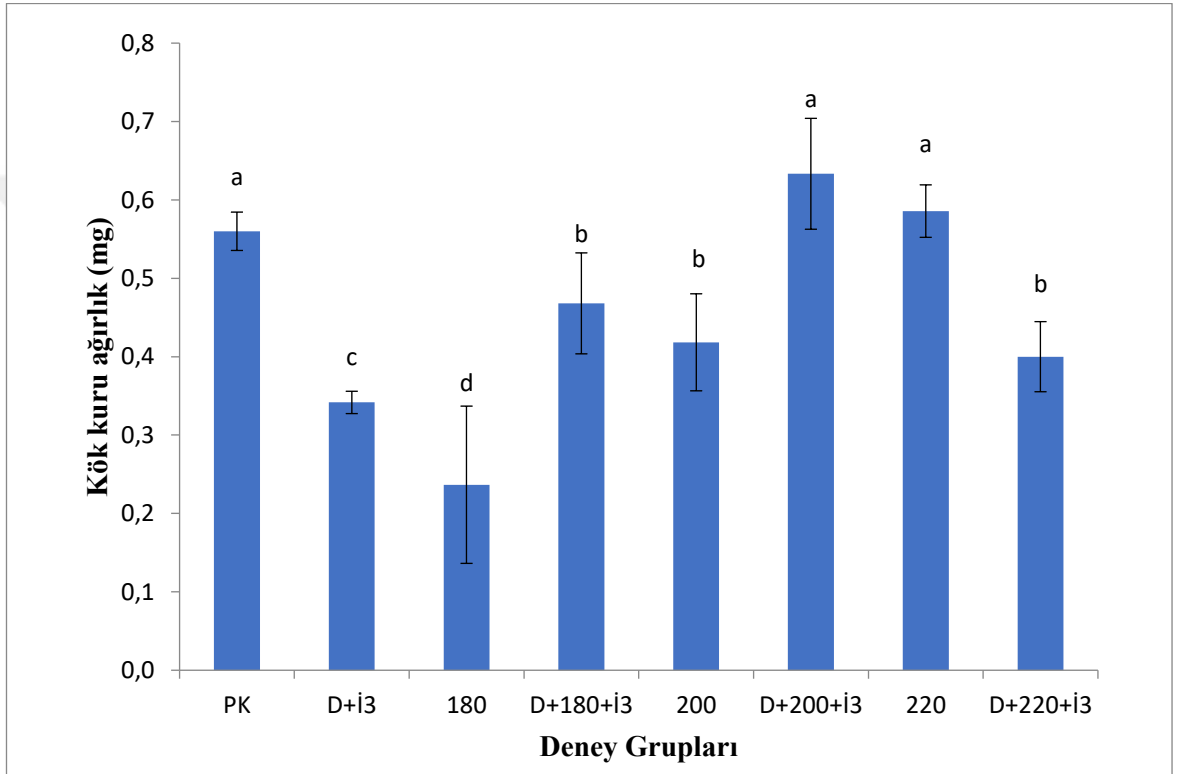
Şekil 5.16: AT1A-22 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ1: AT1A-22 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

İ2 (DT2A-4) izolatu (0,40 mg) normal koşullarda (PK; 0,56 mg) kontrole g6rece değerlendirildiğinde g6vde kuru ağrılığı azaltıcı etkisi olduğu sonucunu vermiştir. 180, 200 konsantrasyon denemelerinde sırasıyla 0,24; 0,42, D+180+i2, D+200+i2 deneme gruplarında sırasıyla 0,66 mg; 0,49 mg sonuç vererek tuz konsantrasyonlarında pozitif kontrole g6rece k6k kuru ağrılığını arttırıcı etki g6stermiştir. 220 mM tuz konsantrasyonu (0,59 mg) ile D+200+i2 deney grubu karşılaştırıldığında k6k kuru ağrılığını azaltıcı etki g6stermiştir.



şekil 5.17: DT2A-4 izolatu'nun tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin k6k kuru ağrılığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ2: DT2A-4 izolatu, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

Şekil 5.18 incelendiğinde İ3 (ST1A-17) izolatı (0,34 mg) normal koşullarda (PK; 0,56 mg) kontrole görece değerlendirildiğinde gövde kuru ağırlığı azaltıcı etkisi olduğu sonucunu vermiştir. 180, 200 konsantrasyon denemelerinde sırasıyla 0,24; 0,42, D+180+i3, D+200+i3 deneme gruplarında sırasıyla 0,67 mg; 0,63 mg sonuç vererek kök kuru ağırlığını arttırıcı etki göstermiştir. 220 mM tuz konsantrasyonu (0,59 mg) ile D+200+i3 deney grubu (0,40) karşılaştırıldığında kök kuru ağırlığını azaltıcı etki göstermiştir.



Şekil 5.18: ST1A-17 izolatının tuz stresi koşullarında (180 mM, 200 mM, 220 mM) domates bitkisinin gövde kuru ağırlığına etkisi. PK: Pozitif kontrol, D: Domates, İ3: ST1A-17 izolatı, 180, 200, 220: Tuz konsantrasyonları.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kimyasal gübrelerin ve pestisitlerin aşırı kullanımı, modern tarımın önemli bir parçası olarak kabul edilse de, bu uygulamaların uzun vadeli çevresel ve ekonomik etkileri büyük önem taşır. Kimyasal gübreler, bitki büyümesini hızlandırarak ve besin eksikliklerini gidererek kısa vadede yüksek verim elde edilmesine katkı sağlar. Ancak, bu süreçte toprak organik madde içeriği azalabilir, toprak yapısının bozulmasına ve mikrobiyal aktivitenin azalmasına neden olur [Kılıç vd., 2012].

Pestisitler ise zararlıların kontrol altına alınmasında etkilidir, ancak bu kimyasalların doğal düşmanları da etkileyerek ekosistemde dengesizliklere yol açar. Bu durum, biyoçeşitlilik kaybına ve ekosistemin zarar görmesine neden olur. Ayrıca, diğer senaryolardan biri zararlı organizmalar zamanla bu kimyasallara karşı direnç geliştirerek, daha fazla pestisit kullanımını arttırabilir. Aynı zamanda kimyasal gübreler ve pestisitlerin insan sağlığını da tehdit eder; toksik maddelerden zehirlenmeler ve ölümler meydana gelmektedir [Kurutaş vd., 2003]. Bu nedenlerle, sürdürülebilir tarım için daha çevre dostu yöntemlerin teşvik edilmesi önemlidir. Bu yöntemlerle, toprak sağlığını korumaya, su ve doğal kaynakların sürdürülebilir kullanımına ve insan sağlığına zarar vermeyen gıda üretimine katkıda bulunulabilir.

Son zamanlarda tarımda kimyasal gübrelerin yerine alternatif olarak bitki büyümesini teşvik eden bakteriler gibi biyolojik çözümler üzerindeki ilgi artmıştır. Bu bakteriler, bitkilerin büyümesini teşvik ederek kök gelişimini artırabilir, bitkilerin besin alımını kolaylaştırabilir ve zararlı organizmalarla mücadelede doğal bir destek sunabilirler [Gmriz vd., 2014]. Biyolojik çözümler olarak bitki büyümesini teşvik edici bakterileri kullanımı, kimyasal gübrelerin aksine gıdalarda kalıntı bırakmaz ve toksik kimyasalların insan sağlığına etkilerinden kaçınır. Bu da hem tarım ürünlerinin güvenliği hem de tüketicilerin sağlığı için önemli bir avantaj sağlar. Ancak, yapılan çalışmalar incelendiğinde bu uygulamaların henüz tamamen uygulanabildiği gözlemlenmemiştir çünkü bitki büyümesini teşvik edici bakteri kullanımının dezavantajları da vardır. Bu bakterilerin etkinliği, toprak tipine, iklim koşullarına ve bitki türüne bağlı olarak değişebilir. Ayrıca, bu bakterilerin büyümesini ve etkinliğini artırmak için doğru uygulama yöntemleri ve teknik bilgi gereklidir. Uygulama maliyetleri bazı durumlarda yüksek olabilir ve çiftçiler için

yeni bir teknolojiyi benimseme süreci zaman alabilir. Ayrıca bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler, laboratuvar koşullarında gösterdikleri performansın tarla koşullarında sergilememeleri durumunda yaygın olarak kullanımlarını sınırlayan diğer bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumun temel nedenleri, bu bakterilerin bölgenin iklimik şartlarına uyum sağlayamamaları veya yerel mikroflora ile rekabet edememeleridir. Bu nedenle bu tez çalışmasında yaz mevsiminin uzunluğu, yüksek ortalama sıcaklık derecelerine sahip olması gibi nedenlerle, Tekirdağ, Ankara, Konya, Sivas ve Diyarbakır illerinden toplanan toprak örnekleri ile çalışılmıştır. Böylelikle ACC deaminaz aktiviteli izolatların sığa adapte olmuş; kuraklık stresine dirençli bakteri seçimi yapılmıştır. ACC deaminaz üreten bakteriler etilen öncüsü olan ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) molekülünü parçalayıp, bitki üzerindeki stres kaynaklı etilen birikimini azaltır ve bitki stres ortamındayken kök ve sürgün büyümesini artırır [Glick vd., 2005]. Yaygın olarak *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ait türler olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında nihai olarak seçilen 3 izolat; AT1A-22, DT2A-4 ve ST1A-17, 16S rDNA analizi ve biyokimyasal testler ile de desteklenerek tür seviyesinde tanımlanmıştır. BLASTn programı sonuçlarına göre AT1A-22 izolatı 99.84% benzerlikle *Pseudomonas azotoforms*; DT2A-4 izolatı 100% benzerlikle *Niallia circulans*; ST1A-17 izolatı 99.91% benzerlikle *Achromobacter spanius* cinslerine ait türlerden oluşmaktadır. Pseudomonas türlerinin bitki büyümesini teşvik edici özellikleri yapılan çalışmalar sayesinde bilinmektedir. Daha önce bu konu üzerinde yapılmış araştırma sonuçları incelendiğinde, ACC deaminaz aktivitesine sahip türlerin *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter* ve *Rhizobium* cinslerine ait olduğu ancak *Pseudomonas* cinsinin bu konuda çokça bir üstünlük gösterdiği anlaşılmaktadır [Meyer vd., 2004]. Liu vd., (2021), yaptıkları bir çalışmada ACC deaminaz geninin *P. azotoformans*'da başarıyla silinmesini ve bunun domates bitkileri üzerindeki etkilerini göstermiştir. Çalışmalarında *P. azotoformans* CHB 1107 ve *P. azotoformans* CHB 'nin *acdS* mutantını (CHB 1107 M) kullanmışlardır. Bu çalışmanın amacı *P. Azotoformans*'daki *acdS* geninin etkileri değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda CHB 1107 ile inoküle edilen domates bitkileri, tuz stresine yanıt olarak etilen salınımı ve prolin içeriğinde önemli bir azalma gösterdiğini ve kök ve sürgün kuru ağırlıklarında artışla sonuçlanmıştır. Bunun yanı sıra, CHB 1107 WT, CHB 1107 M'ye kıyasla K, Ca ve Mn alımını artırmış, ancak Na alımını azaltmıştır. CHB 1107 WT ile inoküle edilen bitkiler, daha yüksek bir

K/Na oranı göstermiştir ve bu, tuz stresine karşı bitkilerin iyon alımı stratejileriyle ilişkilendirilmiştir [Liu vd., 2021]. AT1A-22 izolatı; *P. Azotoformans* ile NaCl tuz stresi ortamında çimlenmeye bırakılan domates tohumu çimlenme sonrasında 180 mM NaCl ortamında kök kuru ağırlığını arttığı olarak belirlenmiştir. Ayrıca DT2A-4 izolatı; *Niallia circulans* 'ın ise 180 mM, 200 mM ve 220 mM NaCl tuz ortamında kök kuru ağırlığını arttırdığı gözlenmiştir. Deney sonuçları Liu vd., (2021), yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir. Sonuç olarak, bu durum *P. azotoformans*'ın ACC deaminaz genini içeren suşları, domates bitkilerinde tuz stresine karşı büyümeyi ve besin alımını iyileştirmek için etkili bir araç olarak kullandığını düşündürmektedir.

Bitkilerde tuz stresi gövde gelişimini de olumsuz etkiler. Tuz, toprakta ozmotik basıncı artırarak bitkinin su alımını zorlaştırır. Bu durum hücrel su kaybına ve hücre genişlemesinde azalmaya neden olur, bu da gövde kuru ağırlığını düşürür [Chaves vd., 2009]. Ayrıca sodyum (Na⁺) ve klor (Cl⁻) iyonlarının birikimi, potasyum (K⁺) ve kalsiyum (Ca²⁺) gibi gerekli besinlerin alımını engelleyebilir. Bu durum hücrel metabolizmayı bozarak büyümenin yavaşlamasına yol açar. Ve stomaların kapanmasına neden olarak fotosentez oranını düşürür. Azalan fotosentez, karbonhidrat üretiminin düşmesine ve büyümenin yavaşlamasına yol açar [Tian vd., 2017].

Gövde kuru ağırlıkları incelendiğinde; normal koşullarda (PK) büyütülen domates ile DT2A-4 inokülasyonu ve tuz stresi ortamında büyütülen domateslerin gövde kuru ağırlıklarında istatistiksel olarak olumlu bir değişim olmamıştır; yani tuz stresi ortamında gövde kuru ağırlığında azalma beklerken bakterinin tuz stresinde gövde kuru kuru ağırlığının azalmasını engellediği belirlenmiştir. 180 mM, 200 mM, 220 mM NaCl stres ortamında gövde uzunlukları incelendiğinde gövde uzunluklarının azaldığı saptanmıştır; nihai olarak olumlu etkisi olmamıştır. Bu durumda gerçekleştirilen deneyde stres ortamında gövde uzunluğu ve gövde kuru ağırlığı arasında ters orantı mevcuttur. Bu ters orantı bitki stres altındayken uzamaya değil metabolik olayların devamlılığını sağlamaya çalışmasında bakterinin etki potansiyeli olarak değerlendirilebilir. *Bacillus circulans* (şimdiki adıyla *Niallia circulans*) bakterisi, bitki büyümesini teşvik eden ve indol-3-asetik asit (IAA) üreten bir bakteri olduğundan biyogübre olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Qin vd., (2021)' de yaptığı bir çalışmada *Bacillus circulans* E9 bakterisini, endüstriyel substratlar içeren düşük maliyetli ortamda bakteri büyümesi ve IAA üretimi için geleneksel Luria Broth (LB) ortamının yerine kullanımını değerlendirilmiştir. PYM ortamında

biyoreaktörde kültüre edilen *B. circulans*, erlenmeyer şişelerinde yetiştirilene göre büyüme ve IAA üretiminde sırasıyla 8 ve 1.6 kat daha yüksek değerler gösterdiği ayrıca biyoreaktörde üretilen IAA'nın, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde kök sistemini sentetik IAA ile benzer şekilde indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışma, PYM ortamının *B. circulans* E9'un biyoreaktörlerde kitlesel üretimi için kullanılabilirliğini ve hem bakteri büyümesini hem de IAA üretimini artırabileceğini göstermektedir. Tez çalışmalarında kullanılan DT2A-4 izolatu analizler sonucu *Niallia circulans* cinsine ait tür olduğu tespit edilmiştir. IAA aynı zamanda ACC sentaz enziminin aktivitesini teşvik ederek SAM'in ACC'ye dönüşmesini sağlar [Kende, 1993]. Bu durumda DT2A-4 izolatının IAA üretimine bakmak; iyi bir üretici ise yolağın ACC sentaz enzimine etkisini araştırmak; mikrobiyal gübre ve tuz stresi altında bitkilerin büyüme ve gelişmesini artırıcı çalışmalara öncülük edebilir.

Shahid ve vd., (2019) yaptıkları çalışmada ACC deaminaz üreten faydalı bir bakteri suşu olan *Achromobacter* sp. FB-14'ün pirinç bitkilerinde stresle ilgili CIPK genlerini (OsCIPK03, OsCIPK12, ve OsCIPK15) yukarı düzenleyerek tuzluluğun etkilerini hafifletme potansiyelini araştırmışlardır. FB-14 suşunu, 855 mM NaCl konsantrasyonunda izole etmiş olup ve çeşitli *Achromobacter* türleriyle %99'un üzerinde 16S rRNA gen dizisi benzerliği ile taksonomik olarak tanımlamasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda *Achromobacter* sp. FB-14 suşunun, ACC deaminaz aktivitesi göstererek stres altındaki pirinç bitkilerinin büyümesini düzenlediğini tespit etmişlerdir. Bu enzim, stres koşullarında bitkide birikme eğiliminde olan ACC'yi ayrıştırarak aşırı etilen üretimini engellediği; ACCD aktivitesi sayesinde, *Achromobacter* sp. FB-14, bitki hücrelerindeki etilen seviyelerini düzenleyerek büyümeyi teşvik ettiğini ayrıca, indol bileşikleri (IAA) üreten bu bakterinin, bitki kök gelişimini teşvik ederek su ve besin alımını arttırdığını göstermişlerdir [Shahid vd.,2020]. ST1A-17 izolatu 16S rDNA analizi sonucunda *Achromobacter spanius* cinslerine ait türler olduğu tespit edilmiştir. Ve tuz stresi altında domates bitkisinin kök ve gövde kuru ağırlığını arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle *Achromobacter* sp., tuzlu topraklarda tarımsal verimliliği artırmak için biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir umut verici bir adaydır.

Sonuç olarak, sürdürülebilir tarım için mikroorganizmaların ve biyoteknolojik çözümlerin önemini vurgulamakta ve bu alandaki araştırmaların daha fazla geliştirilmesi gerektiği öngörüsünde bulunmaktadır. Bu çözümler, ekosistem sağlığını korurken, daha verimli ve çevre dostu tarım yöntemlerinin benimsenmesine

katkı sağlayabilir. Özellikle ACC deaminaz üreten türlerin, bitkilerde stres altında büyümeyi teşvik ettiği ve zararlı etkileşimleri azalttığı gözlemlenmiştir. Bu bakterilerin kullanımı, bitkilerdeki tuz stresini hafifletmeye, kök ve sürgün büyümesini artırmaya, besin alımını iyileştirmeye ve daha sağlıklı ürünler elde edilmesine olanak tanımaktadır. Özellikle *Pseudomonas*, *Niallia* ve *Achromobacter* türlerinin bu konuda olumlu etkiler gösterdiği ve bu bakterilerin daha geniş tarımsal uygulamalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir. Ancak, biyolojik çözümler henüz her koşulda tam verim alabilecek düzeyde değildir. İklim koşulları, toprak tipi ve yerel mikroflora gibi faktörler bu bakterilerin etkinliğini etkileyebilmektedir. Bu biyolojik uygulamaların maliyetleri ve yeni teknolojilere adaptasyon süreci de göz önünde bulundurulmalıdır.



KAYNAKLAR

Acet S., (2023). Bitki büyümesini teşvik edici özelliğe sahip bakterilerin buğday rizosferinden izolasyonu, saflaştırılması, biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Ahanger M. A., Akram N. A., Ashraf M., Alyemeni M. N., Wijaya L., & Ahmad P., (2017). Plant responses to environmental stresses from gene to biotechnology. *AoB Plants*, 9(4), plx025.

Ahmed E., Holmström S. J., (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, 7(3), 196–208.

Aktan Z. C., Soylu S., (2020). Diyarbakır İlinde Yetişen Badem Ağaçlarından Endofit ve Epifit Bakteri Türlerinin İzolasyonu ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Karakterizasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(3), 641-654.

Alexveer S. K., Strete D., (2001). *Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory*, 1st Edition, Benjamin Cummings.

Arshad M., Frankenberger W.T., (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 133, 1-8.

Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis, I., Zeroual Y., Meftah Kadmiri I., (2021). Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition ve yield stability. *Frontiers in microbiology*, 12, 628379.

Ateş Ö., (2017). Tuz Stresi Koşulları Altında Buğdayın Ürün Verimini ve Gelişimini Arttırmak için ACC Deaminaz İçeren Bakterilerin İzolasyonu Tanımlanması ve Etkinliğinin Saptanması. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi.

Bicek S., (2021). Azotu Fikse Eden *Azotobacter* Türlerinin Buğday Rizosferlerinden İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi.

Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan M. A. R., Bhowmik P., Mahmud N. U., Islam, T., (2020). Mechanism of plant growth promotion ve disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture*, 10(12), 624.

Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C., (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103 4, 551-60.

Çobanoğlu H. B. İ., (2023). Toprak ve Gıda Kaynaklı Örneklerden Bacillus Türlerinin İzole Edilip Maldı-tof Ms Cihazı ile Tanımlanması, Siderofor Etkinliklerinin Belirlenmesi ve Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.

Depaepe T., Van Der Straeten D., (2020). Tools of the ethylene trade: a chemical kit to influence ethylene responses in plants ve its use in agriculture. *Small Methods*.

Dimkić I., Janakiev T., Petrović M., Degrassi G., Fira D., (2022). Plant-associated Bacillus and Pseudomonas antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological ve Molecular Plant Pathology*, 117, 101754.

Dixon R., Kahn D., (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature reviews. Microbiology*, 2(8), 621–631.

El-Saadony M. T., Saad A. M., Soliman S. M., Salem H. M., Ahmed A. I., Mahmoo, M., AbuQamar S. F., (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges ve future perspectives. *Frontiers in plant science*, 13, 923880.

Etesami H. & Adl S. M., (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) ve their action mechanisms in availability of nutrients to plants. *Phyto-Microbiome in stress regulation*.

Fadiji A. E., Santoyo G., Yadav A. N., Babalola O. O., (2022). Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 962427.

Fallik E., Sarig S., Okon Y., (1994). Morphology ve physiology of plant roots associated with Azospirillum. In: Okon Y (ed) *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, London, 77-8.

Fatma M., Asgher M., Iqbal N., Rasheed F., Sehar Z., Sofu A., Khan N. A., (2022). Ethylene signaling under stressful environments: Analyzing collaborative knowledge. *Plants*, 11(17), 2211.

Fenn M. A., Giovannoni, J. J., (2021). Phytohormones in fruit development ve maturation. *The Plant Journal*.

Gao C., Ding L., Li Y., Chen Y., Zhu J., Gu M., Li Y., Xu G., Shen Q., Guo S., (2017). Nitrate increases ethylene production ve aerenchyma formation in roots of lowlve rice plants under water stress. *Functional Plant Biology*, 44(4):430-442.

Glick B. R., (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 1–7.

Glick B. R., (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1), 963401.

Glick B.R., Penrose D.M., Li J., (1998). A model for lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190, 63-68.

Gupta A., Rai S., Bano A., Sharma S., Kumar M., Binsuwaidan R., Suhail Khan M., Upadhyay T.K., Alshammari N., Saeed M., Pathak N., (2022). ACC Deaminase Produced by PGPR Mitigates the Adverse Effect of Osmotic and Salinity Stresses in *Pisum sativum* through Modulating the Antioxidants Activities. *Plants*, 11.

Herpell J.B., Alickovic A., Diallo B., Schindler F., Weckwerth W., (2023). Phyllosphere symbiont promotes plant growth through ACC deaminase production. *The ISME Journal*, 17, 1267- 1277.

Hong Y., Glick B.R., Pasternak J.J., (1991). Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Curr Microbiol*, 23, 111-114.

İmriz G., Özdemir F., Topal İ., Ercan B., Taş M. N., Yakışır E., Okur O., (2014). Bitkisel Üretimde Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteri (Pgpr)'ler ve Etki Mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 12(2), 1-19.

Jacksons M.B., (1985). Etilen ve bitkilerin topraktaki su birikintileri altında kalmasına tepkileri. *Yıllık Bitki Fizyolojisi İncelemesi*, 36, 145-174.

Jacoby R.P., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva S., (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Jaya D. K., Giyanto G., Nurhidayat N., Antonius S., (2019). Isolation, identification and detection of ACC deaminase gene-encoding rhizobacteria from rhizosphere of stressed pineapple. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 24(1), 17-25.

Johnson P. R., Ecker J. R., (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual review of genetics*, 32, 227–254.

Kadıoğlu G.B., (2013). ACC Deaminaz Aktivitesine Sahip ve Soğuğa Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi.

Kapoor B., Kumar P., Sharma R., Kumar A., (2021). Regulatory interactions in phytohormone stress signaling implying plants resistance ve resilience mechanisms. *Journal of Plant Biochemistry ve Biotechnology*, 1-16.

Kaynak L., İmamgiller B., (1997). Bitki büyüme düzenleyicilerinin fizyolojik olaylardaki rolleri. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*, 10(1), 289-299.

Kazankaya A., Doğan Ö. Ü. A., Şen F., Ögütcü H., Erdoğan M., Yağmur M., Demircioğlu K., (2023). *Tarım ve Doğa Bilimlerine Güncel Bakış*.

- Kende H., (1993). Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 44,283-307.
- Khan N., Ali S., Shahid M. A., Mustafa A., Sayyed R. Z., Curá, J. A., (2021). Insights into the interactions among roots, rhizosphere, ve rhizobacteria for improving plant growth ve tolerance to abiotic stresses: a review. *Cells*, 10(6), 1551.
- Khan N., Bano A., Ali S., Babar M. A., (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta ve PGPR under biotic ve abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*.
- Kılıç R., Korkmaz K., (2012). Kimyasal gübrelerin tarım topraklarında artık etkileri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 5(2), 87-90.
- Kurutaş E. B., Kılınc M., (2003). Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. *Arşiv Tarama Dergisi*, 12(3).
- Leber A., (2016). *Clinical Microbiology Procedures Hvebook*. 4th Edition, ASM Press.
- Leboffe M. J., (2011). *A Photographic Atlas For The Microbiology Laboratory*. 4th Edition, Morton Publishing.
- Ma J.H., Yao J.L., Cohen D., Morris B., (1998). Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep*, 17, 211-214.
- Madigan M. T., Martinko J., Parker J., (2004). *Brock Biology of Microorganisms*. Lippincott Williams & Wilkins, 10th Edition.
- Maehly A. C., Chance B., (1954). The assay of catalases ve peroxidases *Methods of Biochemical analysis*, 1:357-424.
- Mattoo A.K., Suttle J.C., (1991). *The Plant Hormone Ethylene*. 1st Edition. CRC Press.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R., (1999). Effect of Wild-Type and Mutant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Rooting of Mung Bean Cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18, 49-53.
- Meraklı N., Memon A., (2020). Bitki Büyümesinde ve Gelişiminde Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakterinin (PGPR) Rolü: Toprak-Bitki İlişkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science ve Technology*, 8(12), 2590-2602.
- Meyer A.F., Lipson D. A., Martin A. P., Schadt C. W., Schmidt S. K., (2004). Molecular and Metabolic Characterization of Cold-Tolerant Alpine Soil Pseudomonas. *Sensu Stricto Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 483–489.
- Naing A.H., Campol J.R., Chung M.,Kim C.K., (2022). Overexpression of *acdS* in *Petunia hybrida* Improved Flower Longevity and Cadmium-Stress Tolerance by Reducing Ethylene Production in Floral and Vegetative Tissues. *Cells*, 11.

Oleńska E., Małek W., Wójcik M., Swiecicka I., Thijs S., Vangronsveld J., (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth ve health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 743, 140682.

Orozco-Mosqueda M.D., Duan J., DiBernardo M., Zetter E., Campos-García J., Glick B.R., Santoyo G., (2019). The Production of ACC Deaminase and Trehalose by the Plant Growth Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 Synergistically Protect Tomato Plants Against Salt Stress. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Pantigoso H. A., Manter D. K., Fonte S. J., Vivanco J. M., (2023). Root exudate-derived compounds stimulate the phosphorus solubilizing ability of bacteria. *Scientific Reports*.

Paśmionka I. B., Bulski K., Boligłowa E., (2021). The participation of microbiota in the transformation of nitrogen compounds in the soil a review. *Agronomy*. 11, 977.

Qin L., Tian P., Cui Q., Hu S., Jian W., Xie C., Yang X., Shen H., (2021). *Bacillus circulans* GN03 Alters the Microbiota, Promotes Cotton Seedling Growth and Disease Resistance, and Increases the Expression of Phytohormone Synthesis and Disease Resistance-Related Genes. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Qu Q., Zhang Z., Peijnenburg W. J. G. M., Liu W., Lu T., Hu B., Chen J., Chen J., Lin Z., Qian H., (2020). Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(18), 5024–5038.

Rafi A., Chaudhary H.J., Ali J., Kutawa A.B., Amna A., Khan M., Aslam N., Ur Rehman, S., (2022). Evaluation of the Effect of ACC Deaminase ve Exopolysaccharides Producing Bacteria in Maize (*Zea mays*) under Heat Stress. *Trends in Sciences*, 19(21):6311-6311.

Rather B. A., Sehar Z., Majid A., Jahan B., Mir I. R., Anjum N. A., Masood A., Khan N. A., (2023). Ethylene and cellular redox management in plants. *The Plant Hormone Ethylene*, 141–170.

Roy Choudhury A., Trivedi P., Choi J., Madhaiyan M., Park J., Choi W., Walitang D.I., Sa T., (2023). Inoculation of ACC deaminase producing endophytic bacteria down-regulates ethylene induced PR-signaling in red pepper (*Capsicum annum* L.) under salt stress. *Physiologia Plantarum*, 175(2): e13909.

Satar A., İsmail G. L., Haspolat Y. K., (2022). “Farklı Yaklaşımlarla Tarıma Yeniden Bakış”, *Orient Yayınları*, 978-975-6124-98-7.

Shahid M., Shah A. A., Basit F., Noman M., Zubair M., Ahmed T., Naqqash T., Manzoor I., Maqsood A., (2020). *Achromobacter* sp. FB-14 harboring ACC deaminase activity augmented rice growth by upregulating the expression of stress-responsive CIPK genes under salinity stress. *Brazilian journal of microbiology*, 51(2), 719–728.

Shahid M., Singh U.B., Khan M.S., Singh P., Kumar R., Singh R.N., Kumar A., Singh H.V., (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, 14.

Sumbul A., Ansari R.A., Rizvi R., Mahmood I., (2020). Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 3634 - 3640.

Tian J., Ge F., Zhang D., Deng S., Liu X., (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*.

Van Eck J., Keen P., Tjahjadi M., (2018). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. *Methods in molecular biology*, 1864, 225-234.

Wang H., Liu R., You M. P., Barbetti M. J., Chen Y., (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9.

Xu J., & Zhang S., (2015). *Ethylene Biosynthesis and Regulation in Plants*, 1-25, Springer Netherlands.

Yılmaz E., Tuna A.L., Bürün B., (2011). Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Gelistirdikleri Tolerans Stratejileri- Tolerance Strategies Developed By Plants To The Effects Of Salt Stress. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7, 47-66.

Konferans Bildirisi

Bayrak Koçoğlu S., Gül Şeker M., (2024), “ACC Deaminaz Üreticileri Yönünden Buğday Rizosferik Topraklarında Gen Düzeyinde Taranması”, 8. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 30-31 Mayıs.

ÖZGEÇMİŞ

Sümevra BAYRAK KOÇOĞLU 2015 yılında Bayburt Fen Lisesinden mezun olduktan sonra Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2021 yılında, Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

