

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS SP.
TÜRLERİNİN HERBİSİT DEGRADASYONUNUN ARAŞTIRILMASI
VE FOSFATLI BİLEŞİKLERİ ÇÖZEBİLEN İZOLATLARIN
BUĞDAY BİTKİSİNİN GELİŞİMİNE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

İLKAY İLHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIM ALANLARINDAN İZOLE
EDİLEN PSEUDOMONAS SP. TÜRLERİNİN
HERBİSİT DEGRADASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI VE FOSFATLI
BİLEŞİKLERİ ÇÖZEBİLEN İZOLATLARIN
BUĞDAY BİTKİSİNİN GELİŞİMİNE OLAN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İLKAY İLHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ MİNE GÜL ŞEKER

GEBZE

2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE HERBICIDE
DEGRADATION OF PSEUDOMONAS SP.
SPECIES ISOLATED FROM
AGRICULTURAL FIELDS AND THE
EFFECTS OF PHOSPHATE SOLUBILIZING
ISOLATES ON GROWTH OF WHEAT
PLANTS**

İLKAY İLHAN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. MİNE GÜL ŞEKER

GEBZE
2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/02/2022 tarih ve 2022/08 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/02/22 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İlkay İLHAN'ın tez çalışması MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: DR. ÖĞR. ÜYESİ MİNE GÜL ŞEKER

ÜYE

: PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZGE DİNÇ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında 2018-A-105-04 no'lu BAP projesi kapsamında yüksek herbisit konsantrasyonunda üreyebilen izole edilmiş 45 *Pseudomonas* spp izolatı kullanıldı. Seçilen izolatların saf olup olmadıkları Gram boyama, hareketlilik ve indol testleri ile kontrol edildi. Yüksek herbisit konsantrasyonunda üreyebilen 45 *Pseudomonas* izolatı içinden farklı yerlerden izole edilmiş olmalarına dikkat edilerek seçilen 5 tanesi HPLC analizi ile degradasyon kabiliyetleri yönünden tarandı. Herbisit degradasyon özelliği bakımından kontrol bakterisine (*Pseudomonas putida* KT244- %18,8) görece 13 numaralı izolatın (%35,22) yaklaşık 2 kat daha fazla degradasyon yapabildiği gösterildi.

45 izolatın inorganik fosfatı (Ca_3PO_4) çözebilme yetenekleri Kontrol bakterisine görece değerlendirilerek 32 tanesinin fosfatı çözebildiği taranarak, içlerinden 10 tanesinin fosfatlı bileşikleri çözdüğü spektrofotometre olarak ta tespit edildi. Bunların en aktif 5 tanesi, gen düzeyinde inorganik ve organik fosfat çözünürlüğünden sorumlu *phoA*, *phoC* ve *GCD* genlerinin varlığı yönünden taranarak 18 no'lu izolatta *GCD* varlığı tespit edildi. İlgili izolatın *GCD* aktivitesi kontrol bakterisine (*Pseudomonas aeruginosa*) görece düşük olmasına rağmen real-time PCR ile gösterildi. Devamında 18 no'lu izolatın topraktaki davranışını test etmek üzere buğday bitkisi ile saksıda bir araya getirildi. Daha önce *P. baetica* ve *P. koreensis* ve *P. moraviensis*'e %98 benzetilen izolatın 16S rDNA dizisi NCBI veribankasına kaydedilerek, erişim numarası (MZ976856) alındı. Makarnalık buğday bitkisinin (*Triticum durum* L., Eminbey) büyümesi üzerinde diamonyum fosfat (DAP) miktarındaki azalmaya görece (%50) gelişimin ilk 8. (bitki boyu, sap sayısı ve gövde kalınlığı), 16. (bitki boyu) haftalardaki büyüme aşamalarından gelen ortalamalar istatistiki olarak anlamlı bulunmazken ve 24. haftada hesaplanan kırmızı ayalı yaprak sayısının azalmasına 18 numaralı izolat pozitif yönde etkiledi.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas* sp., fosfat, PGPB, nikosülfüron, degradasyon.

SUMMARY

In this thesis, 45 *Pseudomonas spp* isolates which can grow in high herbicide concentration were chosen from the scope of 2018-A-105-04 BAP project. The purity of the isolates were checked with Gram-staining, motility and indole tests. 5 isolates which were isolated from different soil areas were selected in this 45 isolates. HPLC analysis was done for investigate herbicide degradation capabilities of 5 chosen isolates. It was found that herbicide degradation capability of isolate 13 (35,22%) is approximately 2 times more than the control bacteria (18,8%).

Inorganic phosphate degradation capabilities of this 45 isolates were evaluated according to the control bacteria. 32 isolates from them were scanned for phosphate solubilisation and capability of 10 bacteria from this 32 isolates also measured by spectrophotometrically. Most active 5 isolates' inorganic and organic phosphate solubilisation genes (*phoA*, *phoC*, *GCD*) were scanned. In isolate 18, *GCD* gene was determined. Although the *GCD* gene activity of the isolate 18 relatively low compared to the control bacteria, it was demonstrated by Real-time PCR. In order to test the behavior of isolate 18 in soil, it was combined with wheat plant in a pot. 16S rDNA sequence of the isolate 18, was found similar to *P. baetica* and *P. koreensis* and *P. moraviensis* (98%) before, was recorded in the NCBI database and the accession number (MZ976856). It was found that the effect of the decrease in DAP fertilizer (50%) on the growth of the *Triticum durum* L., Eminbey was not statistically significant in the development of the plant at the 8th and 16th weeks. The decrease in the number of red-footed leaves counted at the 24th week was evaluated as the positive effect of the 18th isolate.

Keywords: *Pseudomonas sp.*, Phosphate, PGPB, Nicosulfuron, degradation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini esirgememiş olan değerli hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye ve Öğr. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY 'a

Değerli laboratuvar arkadaşlarım Seray TOPÇU, Mhriban AYDOĞAN, Gülcan AKKÖK, Nida ARSLAN, Sena ACET, Ali SÜNE, Nil TÜRKÖLMEZ ve diğer tüm bitki biyoteknolojisi grubu üyelerine,

Tüm süreç boyunca her zaman bana destek olan sevgili ev arkadaşlarım Neslihan EL, Serap SAKARYA ve Buse Nur URAL'a,

Bu yolda hep yanımda olarak yolu güzelleştiren, desteğini ve sevgisini esirgemeyen hem ev hem de laboratuvar arkadaşım sevgili Tuğçe ARIT'a

Her zaman arkamda olan biricik, tatlı aile fertlerim Hatice İLHAN, Şükrü İLHAN ve Eray İLHAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Herbisitler	6
2.1.1. Sülfonilüre Grubu Herbisitler	6
2.2. Tarımda Verim Arttırıcı Olarak Fosfatlı Gübreler	12
2.2.1. Kimyasal Fosfatlı Gübrelerin Tarımda Kullanımı	13
2.2.2. Toprakdan Doğal Fosfatlı Bileşiklerin Alımı için	14
Mikroorganizmaların Kullanımı	
2.3. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler	16
2.3.1. PGP Bakterilerin Herbisit Parçalama Özellikleri	16
2.3.2. PGP Özelliği Olarak Fosfat Çözebilme Yeteneğine Sahip	17
Bakterilerin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi	
2.3.3. PGPB olarak Pseudomonas'lar	18
2.3.4. Fosfat İndirgenmesinin Genetiği	19
2.3.5. Buğday Bitkisi	19
2.3.5.1. Eminbey (<i>Triticum Durum L.</i>) Makarnalık Buğday	21
Çeşidi	
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşları	22
3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal	22

3.1.3. Tezde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	22
3.1.4. Kullanılan Kitler	25
3.2. Cihazlar	25
3.2.1. Kullanılan Kimyasallar	26
3.2.2. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçler	27
3.3. Yöntem	27
3.3.1. <i>Pseudomonas</i> spp izolatlarının Saf Olup Olmadıklarının Kontrol Edilmesi ve Stoklarının Hazırlanması	27
3.3.2. Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler	28
3.3.2.1. Hareketlilik ve İndol Testi	28
3.4. Herbisit (Nikosülfüron) Degradasyonu için Seçili 5 İzolatın Degradasyon Seviyelerinin Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi	28
3.5. İnorganik Fosfat Çözebilen Bakterilerin Pikovskaya's Agarda Taranması	30
3.5.1. İnorganik Fosfat Çözünürlüğünün Spektrofotometrik Yöntem ile Kantitatif Ölçümü	30
3.5.2. Moleküler Yöntemler ile Fosfat Çözünürlüğünden Sorumlu Genin Varlığının Gösterilmesi	32
3.5.3. Araştırılan 3 gen içerisinde <i>GCD</i> Varlığı Gösterilen İzolatın Besiyerinde pH Takibi	33
3.5.4. Seçilen İzolata Ait <i>GCD</i> Gen Ekspresyon Seviyesinin Moleküler Yöntemler ile Gösterilmesi	33
3.6. Seçilmiş Fosfat Çözebilen İzolatın Saksıda Sera Koşullarında Buğday Bitkisi Büyüme Parametrelerinin İncelenmesi	36
3.7. İstatiksel Analizler	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. Tekirdağ İli Tarım Alanlarından İzole Edilen 45 <i>Pseudomonas</i> sp İzolatlarının Fizyolojik ve Biyokimyasal test sonuçları	39
4.1.1. Gram boyama, Hareketlilik Testi ve İndol Testi	39
4.2. Herbisit (Nikosülfüron) Parçalayabilen İzolatların HPLC ile Tayini	42
4.3. İnorganik Fosfatı Çözebilen Bakterilerin Pikovskaya Agarda	44

Taranması	
4.3.1. İnorganik Fosfat Çözünürlüğünün Spektrofotometrik Olarak Tayini	45
4.3.2. Fosfat Çözünürlüğünden Sorumlu Genlerin (<i>phoA</i> , <i>phoA</i> ve <i>GCD</i>) qPCR ile Varlığının Gösterilmesi	47
4.3.3. <i>GCD</i> Varlığı Gösterilen İzolatın Besiyerinde pH Takibi	47
4.3.4. Fosfat Çözünürlüğü için Belirlenen Genin (<i>GCD</i>) İfadesinin Real-Time PCR Kullanılarak İncelenmesi	48
4.4. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerinde Verim Parametrelerinin İncelenmesi Sonuçları	49
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	Mikrolitre
<i>B. cereus</i>	: <i>Bacillus cereus</i>
Ca ₃ PO ₄	: Kalsiyum trifosfat
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
G	: Gram
H ₂ O	: Su
HPLC	: High performens liquid chromatography/yüksek performanslı sıvı kromatografisi
L	: Litre
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nm	Nanometre
<i>P.acidovorans</i>	<i>Pseudomonas acidovorans</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. flourescens</i>	<i>Pseudomonas flourescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
P	Fosfat
PCR(PZR)	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Mg	Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1:	Sülfonilüre grubu herbisitlerin genel yapısı. 7
2.2:	Nikosülfuron. 8
2.3:	Kimyasal fosfatlı gübre. 14
2.4:	Toprakta kimyasal ve organik gübre kullanımına ait döngüler. 15
2.5:	<i>Pseudomonas sp</i> mikroskop görüntüsü. 18
2.6:	<i>Triticum aestivum L</i> , <i>Triticum durum L</i> . 20
3.1:	HPLC ölçümleri ile standart eğri. 30
3.2:	KH ₂ PO ₄ ile hazırlanan Bartons's ayırıcı eklenmiş farklı konsantrasyonlardaki standart fosfor çözeltileri. 31
3.3:	KH ₂ PO ₄ ile farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği. 32
3.4:	Saksı deney planı. 37
4.1:	Hareketlilik ve indol testi sonucu örneği fotoğraf. 41
4.2:	Hareketlilik ve indol testi sonucu örneği fotoğraf. 41
4.3:	Seçilmiş izolatların nikosülfüron degradasyonuna ait HPLC grafiği. 43
4.4:	Seçilmiş izolatların nikosülfüronu yüzde (%) degradasyon grafiği. 44
4.5:	İnorganik fosfat testi için kontrol grubu. 45
4.6:	İnorganik fosfat çözünürlüğü için örnek Petri görüntüleri. 45
4.7:	İzolatların kontrol bakterilerine görece çözünmüş P miktarları. 46
4.8:	GCD gen ürününün jel görüntüsü. 47
4.9:	18 numaralı izolatın kontrole görece 96 saat boyunca pH takip sonuçları. 48
4.10:	18 numaralı izolatın kontrole (<i>P. aeruginosa</i>) görece gen ekspresyon seviyesinin Real time-PCR sonuçları. 49
4.11:	8. haftada buğday boy, sap ve gövde kalınlığına (cm) ait ölçüm sonuçları. 51
4.12:	16. haftada buğday boy uzunlukları (cm). 51
4.13:	16. haftaya ait saksı fotoğrafları. 52

4.14:	20. hafta sap sayısı.	53
4.15:	24. haftaya ait kırmızı yaprak sonuçları.	54
4.16:	Tez Özet şeması.	55



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Son yıllarda yapılan sülfonilüre grubu herbisitlerin parçalanmasını konu alan araştırmalardan örnekler.	12
3.1: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	22
3.2: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	23
3.3: Kullanılan cihazlar.	25
3.4: Kullanılan kimyasallar ve besiyeri katkıları.	26
3.5: HPLC metodu.	29
3.6: PCR termal döngü.	32
3.7: PCR basamağında tez kapsamında tasarlanan primerlere ait diziler ve PCR ürün boyutları.	33
3.8: cDNA termal döngü programı.	35
3.9: RT-qPCR döngü koşulları.	35
3.10: RT-qPCR için kullanılan primerler.	35
4.1: Seçilmiş 45 izolatın Gram boyama, hareket ve indol testi sonuçları.	39
4.2: 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre, NCBI veri bankasından elde edilen tanımlama sonuçları ve benzerlik yüzdeleri.	42
4.3: Seçilmiş 10 izolatın kontrollerine görece çözünmüş fosfat miktarları (µgr/ml).	46
4.4: Toprak analiz sonuçları.	49
4.5: 8. hafta buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları ve gövde kalınlıkları.	50

1. GİRİŞ

Fosfor, biyolojik büyüme ve gelişme için en önemli makro elementlerden birisidir [Reddy et al., 2002]. Bütün canlılarda hücre zarlarının temel yapı elemanı olan fosfolipidlerin önemli bir bileşeni olan fosfor, aynı zamanda hücredeki en önemli makro-moleküller olan DNA ve RNA'nın da temel yapı elemanlarından birisidir. Ayrıca canlıların kullandıkları ATP molekülünde de birbirlerine yüksek enerji depolayan bağlar ile bağlanan üç adet fosfat grubu bulunur. Hayatın devamı için temel fizyolojik olaylar olan fotosentez ve solunum reaksiyonlarında önemli rol oynayan NAD ve FAD ko-enzimlerinde de fosfor önemli bir yapı taşıdır [Kadioğlu, 1998].

Fosfatlı bileşikler bitkiler için temel besin elementlerindendir. Toprakta doğal olarak inorganik ve organik formları bulunsa da doğada bulunan formları çoğu bitki için kullanılamaz bileşikler halinde olduklarından kullanılabilir olması için öncelikle çözünabilir formlara indirgenmeleri gereklidir. Bitkiler geliştikleri ortamdan fosforu, primer ortofosfat iyonu (H_2PO_4) ve sekonder ortofosfat iyonu (HPO_4^{2-}) olarak alabilirler. Toprakta çözünemez formda bulunan fosfatlı bileşikler organik asitlerler ile veya mineralizasyon (enzimler ile) ile bitkiler için kullanılabilir hale dönüştürülebilir. Bu noktada doğada fosfatlı bileşikleri çözebilen bakteriler, çeşitli enzim ve organik asitleri salgılayarak çözünür hale getirdikleri fosfatlı bileşikler bitkinin kullanımına uygun hale getirerek yardım ederler [Hanif vd., 2015].

Bahsedilen bu özelliklere sahip bir kısım bakteri türleri de rizosferde bitkiye yakın olacak şekilde konuşlanmışlardır. Rizosferde yaşayan böyle bakterilerin farklı etki mekanizmaları ile bitki gelişimini birçok yönden desteklediği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. Bitkiye çeşitli faydalar sağlayan bu tip bakterilere Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) denir (Kloepper et al., 1980). PGPR'ler azot fiske edebilmeleri, hormon üretmesi, fosforlu bileşikler ve ağır metalleri çözebilmesi, mineral ve su alımını artırması, kök gelişimini desteklemesi, bitkide enzim aktivitesini artırması, gibi etki mekanizmaları ile bitki gelişimini teşvik etmektedirler [Dejordevic et al., 1987]. Rizobakteriler geniş kullanım alanlarına sahip olmalarından dolayı pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları; rizobakterilerin ağır metallerin detoksifikasyonu [Wani et al., 2010], herbisitlerin parçalanması [zhang], tuzluluk toleransı [Mayak et al., 2004], bitki

hastalık ve zararlılarının biyolojik mücadelesi [Hynes et al., 2008], bitki tarafından besin elementleri ve minerallerin kullanımının artırılması, fitohormon ve enzim üreterek bitki gelişimini desteklemesi [Ferreira et al., 1987] üzerine yoğunlaşmıştır.

Yabancı otlarla mücadele konusunda herbisitlerin kullanımı, tarımsal üretimde ürün artışını pozitif yönde etkilemiştir. Ancak 80' li yıllardan itibaren yoğun herbisit kullanımının negatif sonuçları ortaya çıkmaya başlamıştır. Herbisitler bilinçsiz ve yüksek dozda kullanıldıklarında, tarım alanlarında herbisitlere dayanıklı yabancı ot biyotiplerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Diğer herbisit grupları ile kıyaslandığında, sülfonilüre grubu herbisitler düşük dozajlı kullanımları, yüksek herbisidal aktiviteleri, geniş spektrumlu etkileri, ürün seçicilikleri ve düşük insan ve hayvan toksisitesine sahip olmalarıyla tanınırlar. 70' li yıllarda kullanıma sunulan sülfonilüre herbisitler güneş ışığında parçalanmamaları, yalnız asidik ortamlarda, nem varlığında ve toprak mikrobiyal çeşitliliğine bağlı olarak ve biyokimyasal aktivite yoluyla yıkıma uğramaları nedeniyle doğada uzun parçalanma süreçlerine sahiptirler. Ancak sahip oldukları bu özellikleri ile günümüzde ikinci üründe ciddi toksite sorunları yaratmaktadırlar [Williams, 1984; Waller 1989; Sözeri ve Solmaz 1996]. Bunun için herbisitlerin indirgenebilmesi çok önemli bir gündem konusu haline gelmiştir.

Pek çok türü PGPR özelliği gösteren *Pseudomonas* türleri sahip oldukları indirgeme yetenekleri ile herbisitlerin yarattıkları olası yan etkileri azaltmak ve kontrol etmek konusunda iyi birer adaylardır. Üstelik içlerinden pek çok tür fosfatlı bileşikleri de indirgeyebilmektedirler [Mengüç, 2018]. *Pseudomonas*, *Pseudomonadaceae* familyasından tamamı katalaz pozitif, Gram negatif, aerobik, polar flagellası ile hareket edebilen çubuk şekilli bakterileri içeren cinstir. Son derece önemli olan bu cinsin türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir [Euzéby, 1997]. Bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktivite göstermektedir. Isı ve radyasyona karşı dirençleri zayıftır kolayca öldürülebilirler, 42 derece üzerinde üreyemezler ve kurumaya dirençlilikleri zayıftır [Madigan et al., 2005].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Her geçen gün artan nüfus ve bu doğrultuda artan besin ihtiyacını karşılamaya yönelik çalışmalar günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Bitkilerin dayanıklılığını ve bitkilerden alınan verimi yükseltmek amacıyla birçok farklı çalışma yapılmaktadır. Ürün verimini arttırmak için kullanılan yollardan biri de herbisit uygulanmasıdır, böylelikle ekilen kültür bitkileri besin için yabancı otlar ile rekabet etmek zorunda kalmaz [Web1,2020]. Ancak kullanılan herbisitler zamanla toprakta ve yer altı sularında birikir ve çevre kirliliğine sebep olur. Bu kalıntılar bazı diğer biyolojik yollarla yıkılabilse de süreç oldukça yavaş ve zaman alıcıdır. Literatürde bakterilerin bir bölümünün herbisitleri parçalayabildiği bilinmektedir [Zhang, 2010; Kurtoğlu, 2020]. Kirlenmiş toprakların rehabilitasyonunda hem bitki dostu hem de biyolojik olarak kalıntı giderimi yapabilen bakteriler önemlidir [Dindar, 2010].

Kültür bitkileri için bir diğer sorun ise yetersiz fosfat alımıdır. Toprakta bulunan fosfat miktarının %80'i bitkilerin kullanımına uygun olmadığından bu yetersizlik, DAP (Diamonyum Fosfat), TSP (Triple Süper Fosfat), NP (Kompoze Gübre) ve NPK (Kompoze Gübre) gibi fosfatlı kimyasal gübreler ile karşılanmaktadır [Akgün, 2015]. Nihayetinde bu kolaylığın bir külfeti olarak zamanla hareketli olmayan fosfatlı gübreler toprakta birikerek çevreyi de olumsuz etkilerler [Sönmez, 2008]. Bunun yanında birçok mikroorganizmanın hem herbisitleri parçalayabildiği ve hem de fosfatlı bileşikleri çözerek bitkinin kullanımına uygun forma getirebildiği bildirilmektedir [Li, 2017; Güneş, 2013; Zhang, 2012].

Doğada bulunan tüm kirleticiler dolaylı veya doğrudan insan sağlığını etkilemektedir. Kirleticilerin mevcut sağlıklı çevreden bir an önce detoksifikasyon veya biyoremediyasyon yolu ile uzaklaştırılması veya etkisiz hale getirilmesi bu mücadelenin ana senaryosunu oluşturmaktadır. Bunun sağlanması için en önemli kaynak hiç kuşkusuz çevrede doğal olarak bulunan ve biyoremediyasyon yeteneği olan mikroorganizmalar ile mümkün olacaktır [Wasi et al., 2013]. Toksik kirleticilerin biyolojik parçalanma (biodegradasyon) ve detoksifikasyonunda bakterilerin rolü ortaya konmuştur [Johri et al., 1996; Wasi et al., 2011a, b]. Bu konudaki ilk rapor Matsumura ve diğerleri (1976) tarafından persistent (parçalanması uzun süre alan) bir pestisit olan hegzeklorosikloheksan (HCH)' ın Pseudomonas

genusuna ait izolatlar tarafından aerobik parçalanması konusunda yapılmıştır. Daha sonralarda bu mikroorganizmanın *P. paucimobilis* olduğu, Wada ve diğerleri., (1989) tarafından bildirilmiştir. Literatürde 2,4 D, karbamat gibi pestisitlerin, fenolik bileşiklerin, kathekol gibi pestisit hammaddelerinin, petrol kaynaklı hidrokarbonlarının, Cd, Cr, Cu gibi ağır metallerin, p-crezol, petrol hidrokarbonları gibi organik veya inorganik kirleticilerin parçalanması veya gideriminde etkin olan başta *P. aeruginosa*, *P. acidovorans*, *P. fluorescens* ve *P. putida* olmak üzere pek çok *Pseudomonas* sp. türü bakteri rapor edilmektedir [Wasi et al., 2013]. *P. putida* sahip olduğu TOL plazmiti sayesinde toluen, m- ve p- toluate, ayrıca m- ve p- ksilen ve piruvat ve asetaldehit ile ilgili bileşenleri parçalama kabiliyeti ile patent alınmış ilk mikroorganizma niteliğini taşımaktadır. Sayılan bu özellikleri ile *Pseudomonas* cinsi bakteriler sahip oldukları biyoremediyasyon ve parçalama yetenekleri ile tarım ve çevre koruma uygulamalarında potansiyel kullanım alanlarına sahip mikroorganizmalardır [Gül-Şeker, 2020].

Sülfonilüre grubu herbisitler dünya çapında son yıllarda yoğunlukla kullanılan ve insan ve hayvan sağlığı üzerine sahip oldukları düşük toksisiteleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca bunlar buğday, arpa, pirinç, soya fasulyesi, pamuk, patates ve mısır gibi ürünlerin yetiştiriciliğinde yabancı ot mücadelesi için dünya çapında kullanılan, geniş bir kimyasal herbisit grubudur [Blair ve Martin, 1988; Brown, 1990; Zhou et al., 2008].

Yukarıda özetlenen literatür bilgisine dayalı olarak bu tezin amacı; yoğun herbisit konsantrasyonlarında yaşayabilme özellikleri yönünden izole edilen *Pseudomonas* spp, toprakta çözünmez halde bulunan fosfatlı bileşikleri çözebilme yeteneklerinin araştırılması ve aynı zamanda fosfatı çözebilme yeteneğine de sahip seçilen bir izolatın sera koşullarında bir kışlık ve makarnalık bir buğday çeşidi olan Emin Bey çeşidinin (*Triticum durum* L.) verim parametrelerine (bitki boyu, başak boyu, bayrak yaprak uzunluğu, ana başak dane sayısı, ana başak tane verimi (gram) ve başaktaki başakçık sayısı) etkisinin ortaya çıkarılmasıdır. Tez ana konusunu oluşturan 45 *Pseudomonas* spp izolatı herbisitlerin yoğun olarak kullanıldığı tarım alanlarından 2018A-105 no'lu ve "Sülfonilüre grubu herbisit olan tribenuron metil ve nikosülfuronu metabolize eden ve yerel kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas* sp soylarının moleküler ve biyokimyasal olarak tanımlanması" başlıklı BAP projesi kapsamında izole edilmişlerdir. Söz konusu izolatların yüksek herbisit konsantrasyonunda (500mg/L) üreme gösterebilen, klasik biyokimyasal testler ile

(Gram boyama, Pigment oluşumu, Glukoz kullanımı/Gaz oluşumu, Oksidaz testi, nitratın indirgenmesi ve N gazı oluşumu, Nikosülfüron kullanımı vb) genus seviyesinde karkterizasyonu yapılmış ve *Pseudomonas* spp.'ler olarak tez kapsamında çalışılmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Herbisitler

Toprak ekosisteminin önemli bir parçası olan yabancı otlar tarımın başından beri çiftçilere hep sorun olmuştur. Araştırmacılar yabancı otlardan kurtulmak için kültürel, mekanik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler geliştirmiş ve uygulamışlardır. Yabancı ot kontrolünde kimyasal mücadele ajanı olarak herbisitler, kolay uygulanabilir, kısa vadede ekonomik ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle en popüler ve yaygın kullanımı olan kimyasallardır [Torun,2012].

Kimyasal mücadelede yaygın olarak kullanılan herbisitler sağladıkları yararların yanında yan etkileri ile de pek çok zarara neden olabilmektedir. Herbisitler uygulamaları esnasında oluşan yanlış kullanım ve dozaj ile hedef alan dışındaki bitkilere zarar verebilecekleri gibi toprağa uygulandıklarında veya bitkiye uygulandıktan sonra çeşitli şekillerde toprağa karıştıklarında, toprakta uzun süre kalarak kültür bitkilerinde çok ciddi kayıplara sebep olabilmektedir. Herbisitler uygulamadan sonra parçalanmadan belirli bir süre toprakta kalabilmektedirler. Bu süre yabancı ot kontrolü bakımından önemlidir. Sürenin uzun olması çevresel sorunlara yol açabileceği gibi kısa olması da verimsiz yabancı ot kontrolüne sebep olabilmektedir. Herbisitlerin yabancı ot bünyesinde taşınması yapraktan, toprakaltı organlarından, az da olsa gövde ve sürgünlerden bitki bünyesine giriş yapan herbisitler ot içerisinde; sırasıyla iletken dokular (parankimatik) içerisinde, dokular arasında ve hücre içerisinde taşınma şeklinde 3 aşamada taşınırlar [Başaran,2010].

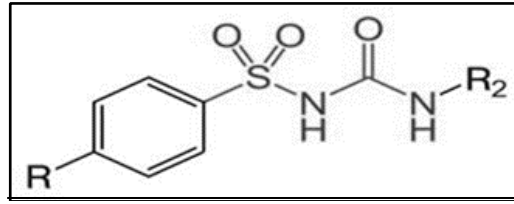
2.1.1. Sülfonilüre Grubu Herbisitler

Sülfonilüre grubu herbisitler yabancı ot mücadelesinde son yıllarda geniş bir uygulama alanına sahip olmaları, ürün seçicilikleri, düşük insan ve hayvanlar toksisiteleri ($LD_{50} > 5000 \text{ mg/Kg}$ -ratlarda) nedeniyle giderek daha çok tercih edilmektedir [Brown 1990; Zanardini et al., 2002; Zhou et al., 2008]. Ancak bu grup herbisitlerle yapılan çalışmalarda rotasyona tabi ikinci üründe ciddi kalıntı ve fitotoksite yarattığı tespit edilmiştir (Demircioğlu, 2007; Başaran, 2010; Serim ve Maden, 2011a, 2011b, 2011c, 2012). Bu etki, sülfonilüre grubu herbisitlerin toprağın

alkali pH' sının uzun parçalanma sürecine neden olduğu şeklindedir. Yapılan çalışmalarda parçalanma sürecinin düşük pH' ya sahip topraklarda ve toprakta var olan mikroorganizma toplulukları sayesinde kısaldığı gösterilmiştir. Bu sürecin kısılmasını destekleyen laboratuvar ortamında birçok çalışma son yıllarda yapılmaktadır [Joshi et al., 1985; O' Keefe et al., 1991; Zanardini et al., 2002; Boschini et al., 2003; Yu et al., 2005; Valle et al., 2006; Gu et al., 2007; Huang et al., 2007; Ma et al., 2009; Xu et al., 2009; Lu et al., 2011].

- Sülfolilüre Grubu Herbisitlerin Etki Mekanizmaları

Sülfolilüre grubu herbisitler, buğday, arpa, pirinç, soya fasulyesi, pamuk, patates ve mısır gibi ürünlerin yetiştiriciliğinde yabancı ot mücadelesi için dünya çapında kullanılan, geniş bir kimyasal herbisit grubudur [Blair ve Martin, 1988; Brown, 1990; Zhou et al., 2008]. Bu grup herbisitlerin 2-100g/ha oranında yapılan düşük oranlı dozajları bile yüksek herbisidal aktivite, geniş spektrumlu etki, ürün yönünden seçicilik ve düşük insan ve hayvan toksisitesine (raflarda LD₅₀ değeri genellikle > 5000mg/kg) sahip olmaları nedeniyle günümüzde çok tercih edilen bir yabancı ot mücadele ürün grubudur. Kimyasal yapıları bir aril grup (R₁), bir sülfolilüre köprüsü ve azot içeren heterosiklik bir halkadan (R₂) oluşmaktadır (Şekil 2.1) [Zanardi et al.,2002].

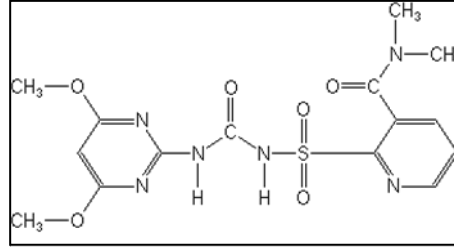


Şekil 2.1: Sülfolilüre grubu herbisitlerin genel yapısı.

Aktivitelerini protein sentez inhibitörü olarak gerçekleştirirler. Bitkilerde ve mikroorganizmalarda var olan ancak hayvanlarda olmayan dallanmış amino asitlerin (valin, izolösin ve lösin) biyosentetik döngülerinde görev alan bir enzim olan asetoilaktat sentetaz (ALS) enziminin inhibitörü olarak görev yaparlar [Blair ve Martin 1988; Brown, 1990]. Bu herbisitlerin uygulanması sonucu yabancı otun büyümesi engellenirken, yaprakları sararmaya başlar ve 3-5 hafta içinde yabancı ot ölür. Sülfolilüre grubu herbisitlerin ürün seçiciliği fizyolojiktir [Ray,1984; Rost 1984].

- Nikosülfuron

2-[[[(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]amino]sulfonyl]-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide (Nikosülfuron) bir sülfonilüre grubu herbisit olup (Şekil 2.2), mısır tarlalarında yaygın olarak yabancı ot mücadelesinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.2: Nikosülfuron.

Dar ve geniş yapraklı yabancı otların mücadelesinde hayvanlar ve insanlar için düşük toksisiteleri nedeniyle tercih edilmektedirler [Sikkema et al., 2007]. Mısır ekim alanlarında bitki 4-8 yapraklı iken, çimensi otlara, kardeşlenme öncesi veya kardeşlenme içinde oldukları erken dönemde (2-8 yaprak), kanyaş, ilacı bünyeye alacak yeterli çıkışlar (10-30 cm boyda) olduktan sonra uygulanması tavsiye edilmektedir. Dar yapraklılardan kanyaş (*Sorghum halepense*), darıcan (*Echinochloa crus-galli*), benekli darıcan (*E. colonom*), çatalotu (*Digitaria sanguinalis*), kirpidarı (*Setaria viridis*); geniş yapraklı yabancı otlardan gelişimlerinin 2-6 yapraklı oldukları genç dönemde olmak üzere, horozibiği (*Amaranthus retroflexus*), köpek üzümü (*Chenopodium album*), yabani semizotu (*Portulaca oleracea*) ve pıtrağın (*Xanthium strumarium*) mücadelesinde kullanılmaktadır. Ancak tatlı mısır ve cin mısırlarda kullanılması önerilmemektedir [Tarım Bakanlığı, 2013b].

Tarım Bakanlığının, 2012 yılı verilerine göre; nikosülfuron 11591 kg'ı yerli ve 11,591 kg'ı ithal olmak üzere toplamda 19,383 kg tüketilmiştir. Bu rakamlara göre söz konusu herbisit ülkemizde yaygın ve çok miktarda kullanılan sülfonilüre grubu herbisitlerden biridir (Tarım Bakanlığı, 2013b) ve hızlı hareket kabiliyetinden dolayı yer altı sularına karıştıkları için geniş alanlarda kullanımı sınırlandırılmıştır [Nélieu et al., 2005].

- Biyolojik parçalanma- Biyolojik iyileştirme (Biyodegradasyon-Biyoremediyasyon)

Doğadan toksik organik kirleticileri uzaklaştırılmasında mikroorganizmaların rolü, genişletilmiş anlamda biyolojik parçalanma sürecini kapsamaktadır. Bu süreç biyolojik iyileştirme (bioremediation), ıslah etme (bioreclamation), biyorestorasyon (biore Restoration) olarak da adlandırılır. Doğa ise bu süreçte sağladığı çevresel faktörler ile mikrobiyal aktiviteyi dengelemekte çok önemli bir rol oynamaktadır. Toprağı, suyu veya sedimentleri bulaştıran kirleticilerin uzaklaştırılması veya detoksifikasyonunda mikroorganizmaların kullanımına biyoremediasyon adı verilir. Bu durum organik pestisitlerin son ürün olarak H₂O ve CO₂' e kadar indirgenmesini içeren süreci tamamlamak için mikroorganizmaların kullanımı şeklinde de açıklanabilir. Benzer bir şekilde, mikroorganizmalar, inorganik kirleticileri de dönüştürebilirler. Bu halleri ile kirleticilerin çözünürlüğü, hareketliliği ve toksisitesi azalır [Kamaludeen et al., 2003; Wasi et al., 2008; 2010]. Biyoremediasyonun amacı, oluşan çevresel kirliliği en az maliyetle, en aza indirmektedir [Timmis et al., 1994; Paul et al., 2005]. Bu bağlamda sağladığı ekonomik kazanç ve uygulama kolaylığı nedeniyle, bir biyolojik parçalanma şekli olan mikrobiyal biyoremediasyon, uygun ve düşük maliyetli bir detoksifikasyon metodudur [Wasi et al., 2013].

Yabancı otlarla mücadele konusunda herbisitlerin kullanımı, yeşil devrimin bir parçası olarak görülmüş olsada, özellikle 80'li yıllardan itibaren yoğun herbisit kullanımının negatif sonuçları ön plana çıkmaya başlamıştır. Herbisitlerin sık ve yüksek dozlarda uygulanmasının, atmosfer ve su kaynaklarının kirlenmesine neden olduğu gibi [Perkins, 1997], tarım alanlarında herbisitlere dayanıklı yabancı ot biyotiplerinin ortaya çıkmasına [Rubin, 1996] ve bilinçsiz kullanıldığında ise üretim maliyetlerinde ciddi bir artışa neden olduğu bilinmektedir [Doğan vd., 2004]. 80'li yılların ortasında dünyada herbisit kullanımında azalma özellikle birim alana daha düşük miktarda etken madde içeren sülfonilüre grubu herbisitlerin piyasaya çıkmasıyla meydana gelmiştir. Sülfonilüre grubu herbisitler sayesinde hektara kilogram bazında uygulanan herbisit miktarı gram seviyesine gerilemiştir. Böylece her ne kadar birim alanda kullanılan herbisit miktarının tonaj bazında azalması sağlanmış olsa da zaman içerisinde bu grup herbisitlerin de diğerlerine benzer yan etkilerinin olduğu gözlenmiştir [Bellinder et al., 1994].

Herbisitin toprakta aktif olarak bulunduğu veya kaldığı süre, etkinliğinin devam etmesi ve ikinci üründe neden olduğu hasar ve ürün kaybı nedeniyle çok önemlidir. Bu süre yabancı ot ile ekilen bitki rekabetini önleyecek kadar uzun

olmalıdır. Süreç sonunda herbisit toprakta inaktif formlarına kısa sürede dönüşerek kaybolabilmelidir. Ancak bazı herbisitlerde bu süre oldukça uzun olduğundan münavebe (rotasyona tabi ekilen ikinci ürün) bitkilerinde ciddi fitotoksisiteye neden olabilmektedir. Bu gibi durumlarda topraktaki yüksek düzeydeki herbisit kalıntısı çiftçilerin ürün rotasyonu seçeneklerinde kısıtlamaya gitmeleri ile sonuçlanmaktadır [Zimdahl, 2007].

Sülfonilüre parçalanması literatürde sülfonilüre grubu herbisitlerin parçalanmasının, özellikle mikrobiyal metabolizmaya ve kimyasal hidrolize bağlı olduğu belirtilmektedir [Şeker, 2020]. Duffy and Hanafey (1987) kimyasal hidrolizin, asidik ortamlarda daha hızlı olduğunu ve toprak pH'sının artmasıyla azaldığını belirtmişlerdir. Bazı sülfonilüre herbisitlerin yüksek pH'ya sahip topraklarda daha uzun süre kalabildiği [Beyer et al., 1988], bu herbisitlerin topraktaki kalıntısının toprak pH'sı arttıkça rotasyona tabi ekilen ikinci üründe bitkilerindeki zararı artırdığı [Curran et al., 1991] ve pH'sı 6.8'den yüksek olan topraklarda sülfonilüre kullanılmaması gerektiği [O'Sullivan ve Thomas, 2001] ifade edilmektedir.

Toprakta bu herbisitlerin bazıları, özellikle simbiyotik mikroorganizmaların sahip olduğu nitrifikasyon yeteneğini ve nitrojen fiksasyonunu ek olarak, mikrobiyal biyokütleyi ve bunların metabolik aktivitelerini negatif etkileyebilirler [Martensson and Nilsson, 1989; Malkomes, 1989; 1990; Burnet and Hodgson, 1991; Martensson, 1992; Perucci et al., 1993; Thompson et al., 1993; Boldt and Jacobsen, 1998]. Bu herbisit grubu dikkate değer bir uçuculuk ve ışıktaki parçalanma-bozulma (fotodegradasyon) özelliğine sahip değildir. Belli pedo-klimatik şartlarda ve bazı bileşenlerin baskın olması durumunda ise parçalanma süreci 100 günden daha uzundur ve bu da yukarıda ifade edildiği gibi ikinci ürün için kalıntıların yol açtığı zarar demektir. Sülfonilüre grubu herbisitler toprakta çok hızlı hareket ederler ve parçalanmaları ancak asidik koşullarda, nem ve organik maddeler vasıtasıyla başarılmaktadır [Walker and Welch, 1989; Oppong and Sagar, 1992; Ismail et al., 1996; Pons and Barriuso, 1998]. Sülfonilüre grubu herbisitlerin çevresel akıbetleri ve biyolojik parçalanmaları, tarlada hassas ikinci ürüne verdikleri yüksek fitotoksik etki ve sucul ekosistemler üzerine muhtemel etkileri nedeniyle son zamanlarda artan bir dikkatle incelenmektedir [Andersen et al., 2001; Sarmah and Sabadie, 2002; Wang et al., 2010].

Biyoremediyasyon ve biyolojik parçalanma araştırmaları, sülfonilüre bileşiklerinin topraktaki parçalanmasında mikroorganizmaların önemli bir rol oynadığı yönündedir [Andersen et al., 2001]. Sterilize edilmiş topraklar ile steril olmayan topraklardaki sülfonilüre parçalanmasının karşılaştırılma çalışmalarında steril olmayan topraklarda parçalanmanın daha hızlı ve efektif oluşunun toprak mikrobiyal topluluklarına bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır [Walker et el., 1989; Ismail ve Lee, 1995; Li et al., 1999].

Yakın geçmişte yapılan bazı araştırmalar ile sülfonilüre herbisitleri parçalama yeteneğine sahip bakteriler de rapor edilmiştir [O’Keefe et al., 1991; Joshi et al., 1985; Boschini et al., 2003; Yu et al., 2005; Huang et al., 2007; Xu et al., 2009; Lu et al., 2011]. Bu gruptaki kimyasalların parçalanmasına ilişkin literatürde yer alan araştırmalara göre, oksidasyon, de-esterifikasyon ve sülfonil üre köprülerinin koparılması yolu ile olmak üzere parçalanma 3 farklı yol ile açıklanmıştır [O’Keefe et al., 1987; Yu et al., 2005; Ma et al., 2009; Xu et al., 2009; Lu et al., 2011]. Oksidasyon yolu ile parçalanma yoluna ilişkin bir çalışmada iki Sitokrom P450 oksidaz (P450SU1 ve P450SU2) *Streptomyces griseolus* ATCCC 11796’ da tanımlanmış [O’Keefe et al., 1988; O’Keefe ve Harder, 1991] ve bu enzimlere ilişkin genler ise *suaC* ve *subC* klonlanarak, karakterize edilmiştir [Omer et al., 1990]. De-esterifikasyon ise sülfonilürenin mikrobiyal metabolizmasında diğer önemli bir mekanizmadır [Joshi et al., 1985; Brown et al., 1997; Xu et al., 2009; Lu et al., 2011]. Sülfonilüre herbisitlerin de-esterifikasyon ile metabolize edildiklerine ilişkin çalışmalar içinde esterazların karakterize edildiği moleküler temelli bir çalışma da literatürde mevcuttur [Hang et al., 2012]. 2009 yılında yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* sp. LW3 izolatının sülfonilüre grubu herbisitleri sülfonil üre köprülerinden parçaladıkları, HPLC / LC MS analizleri ile elde edilen ürünler gösterilmiştir [Zanardini et al., 2002; Ma et al., 2009].

Liteartürde birkaç çalışma ise nikosülfuronun su kaynakları, toprak ve bitkilerde emilimine odaklanmıştır [Regitano et al., 2006; Boschini et al., 2007; Regitano ve Koskinen 2008].

Son yıllarda artan şekilde, diğer sülfonilüre grubu herbisitlerin mikrobiyal biyolojik parçalanmasını konu eden çalışmalar da literatürde yerini almıştır [Joshi et al., 1985; O’ Keefe et al., 1991; Zanardini et al., 2002; Boschini et al., 2003; Yu et al., 2005; Valle et al., 2006; Gu et al., 2007; Huang et al., 2007; Ma et al., 2009; Xu et al., 2009; Lu et al., 2011; Wang et al., 2011] (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Son yıllarda yapılan sülfonilüre grubu herbisitlerin parçalanmasını konu alan araştırmalardan örnekler.

Test edilen sülfonilüre grubu herbisit	Mikroorganizma	Literatür
Klorosülfuron	<i>Streptomyces griseolus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium sp.</i>	Joshi et al., 1985
Thifensulfuron metil	Toprak mikrobiyal komünite	Brown et al., 1997
Bensulfuron metil	<i>Methanobacterium sp</i> <i>Methanosarcinia sp.</i>	Brusa et al., 2001
Klorosulfuron ve metsulfuron metil	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zanardini et al., 2002
Klorosulfuron ve metsulfuron	<i>Aspergillus niger</i>	Boschin et al., 2003
Klorosulfuron ve metsulfuron	<i>Aspergillus niger</i>	Boschin et al., 2003
Azimsulfuron	Toprak mikrobiyal komünite	Valle et al., 2006
Ethametsulfuron metil	<i>Pseudomonas sp. SW4</i>	Gu et al., 2007
Metsulfuron metil	<i>Methylopila sp. S113</i>	Huang et al., 2007
Klorimuron etil	<i>Pseudomonas sp. LW3</i>	Ma et al., 2009
Pitazosülfuron	<i>Pseudomonas sp. D61</i>	Xu et al., 2009
Tribenuron metil	<i>Serratia sp.</i>	Wang et al., 2011
Metsulfuron metil	<i>Ancylobacter sp. XJ-412-1</i>	Lu et al., 2011
Nikosülfuron	<i>Bacillus subtilis YB1</i> <i>Aspergillus niger YF1</i>	Lu et al., 2012
Bensulfuron methyl	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Brevibacterium sp.</i>	Lin et al., 2012
Nikosülfuron	<i>Serratia marcescens</i>	Zhang et al., 2012
Tribenuron metil	<i>Pseudomonas sp., strain NyZ42</i>	Zhang et al., 2013
Nikosülfuron	<i>Talaromyces flavus LZM1</i>	Song et al., 2013

2.2. Tarımda Verim Arttırıcı Olarak Fosfatlı Gübreler

Toprak yapısına ve ihtiyacına göre eksikliği toprak analizleri ile belirlenmiş, bitki gelişimi ve verimin artırılmasına yönelik bir takviye olarak piyasada satılan ticari gübreler içerisinde fosfatlı gübreler taban gübresi olarak değerli gübre grubundandır. 4 çeşit fosfatlı gübre piyasada yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarım Bakanlığı kaynaklarına göre [Web2, 2022] içlerinden en bilineni, DAP gübresi olup yaygın olup halk arasında 18-46-0 gübre olarak da bilinir. DAP gübresi içerisinde %18 azot, %46 fosfor bulundurur. Ekinlerin ilk gelişim döneminde söz konusu gübre suda tamamen erimesiyle ile öne çıkmaktadır. TSP Gübresi ise Triple Süper Fosfat gübresi olarak içeriğinde %43-44 oranında fosfor bulundurmaktadır Bitkiler

tarafından kolaylıkla alınabilen bu gübre çeşidi, daha çok pH değeri 6.5-7.5 arasında olan topraklarda tercih edilmektedir. Bir diğer fosfatlı gübre çeşidi ise NP Gübre (Kompoze Gübre): 20-20-0 gübresi olarak da anılmaktadır. Eşit oranda azot ve fosfor bulundurmaktadır. Tüm meyvelerin, tarla bitkilerinin yetiştirilmesinde kullanılabilir. İçeriği kükürt ve çinko ile zenginleştirilmiş faklı ihtiyaçlara hitab eden alt çeşitleri de bulunmaktadır. Son olarak NPK (Kompoze Gübre) Gübresi ise azot, fosfor ve potasyumu eşit oranda (15-15-15) içeren ayrıca kükürt ve çinkolu kombinasyonları ile öne çıkan zengin bir gübredir. Ayrıca dengeli gübreleme için içeriği ihtiyaca göre ayarlanabilen bir gübredir [Web3, 2022].

2.2.1. Kimyasal Fosfatlı Gübrelerin Tarımda Kullanımı

Bitkilerin doğal yaşam döngülerini sürdürebilmeleri için mikro ve makro besin elementlerine ihtiyaçları vardır. Bunların içinde en önemlilerinden biri de fosfor (P) elementidir. Fosfor her ne kadar yeryüzünde bol miktarda bulunsa da oksijene olan güçlü ilgisi nedeniyle serbest halde bulunmaz [Berker, 1972]. P toprakta inorganik ve organik bileşenlerin yapısında olmak üzere 2 formda bulunmaktadır. Bunlar doğada ortofosfat (PO_4) mineralleri şeklinde [florapatit $3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(F,Cl)_2$, fosforit, $Ca_3(PO_4)_2$, vivianit $Fe_3(PO_4)_2$] ve/veya trifosfat bileşikleri olarak [adenozin trifosfat (ATP), guanin trifosfat (GTP) vb], piro fosfat bileşikleri olarak [sodyum pirofosfat ($Na_2P_2O_7$) vb] organik bileşikleri şeklinde canlıların yapısında bulunur [Berker, 1972].

Topraktaki fosfatın büyük çoğunluğunu oluşturan fosfatlı bileşikler bitkinin kullanamayacağı formdadır. Bu durum tarımda fosfatlı gübre kullanımını yaygınlaştırmıştır (Şekil 2.3). Ancak fosfatlı gübre kullanımı verimde kısa sürede artış sağlasa da uzun vadede doğaya zararlı ve canlıların hayatı için oldukça tehlikelidir. Gübre içerisindeki bitki tarafından alınmayarak toprakta kalan fosfat, bir süre sonra kullanılamaz hale gelir ve topraktan yer altı sularına karışarak sularda birikir. Toprakta ölü mikro ve makro organizmaların artıklarından gelen kullanılabilir P yüksek verim için genellikle yetersizdir ve uygulanan inorganik fosfat da gübrelemeden hemen sonra fikse edilmektedir. Aynı zamanda uygulanan fosfat gübresi %75-90 oranında Fe, Al ve Ca bileşikleri şeklinde çökelmektedir [Gyaneshwar et al., 2002].

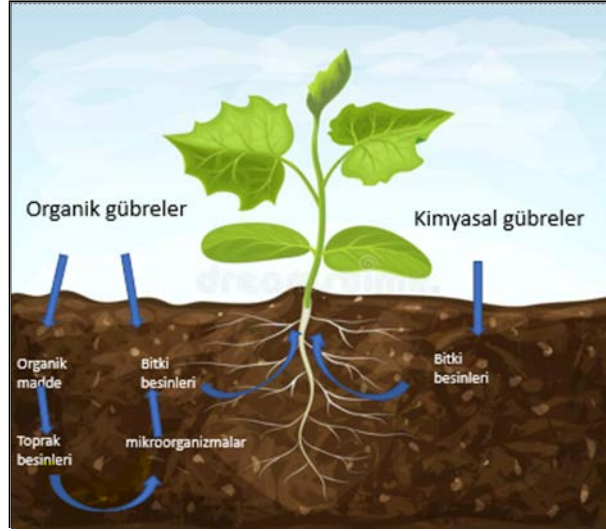


Şekil 2.3: Kimyasal fosfatlı gübre.

Yoğun ve bilinçsizce kimyasal gübre kullanımının neden olduğu zararlar genel olarak; yer altı ve yer üstü sularının kirlenmesi, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkilemesi, dolaylı ya da doğrudan bitki gelişimini olumsuz etkilemesi, gıdalarda nitrat birikimi şeklinde özetlenebilir [Çelikten 2018].

2.2.2. Toprakta Doğal Fosfatlı Bileşiklerin Alımı için Mikroorganizmaların Kullanılması

Kimyasal gübrelerin sebep olduğu ve yukarıda tarif edilen zararlar dolayısıyla dünya daha zararsız ve çevre dostu yöntemler arayışına girmiştir. Son zamanlarda topraktaki bu kimyasal dönüşüme eşlik ederek hızlandırabilecek bazı mikroorganizmaların bio-gübre olarak kullanılabilme potansiyellerinin keşfedilmesiyle, biyolojik gübreler ilgi görmeye başlamıştır (Şekil 2.4), [Aydoğan. 2013]. Fosfatlı bileşikler toprakta inorganik ve organik formda bulunur, ancak toprakta çözünmüş olarak bulunan fosfatlı bileşiklerin konsantrasyonu <1 ppm civarındadır. Fosfatlı bileşiklerin birkaç şekli bitki kök hücreleri tarafından topraktan alınabilmektedir. Ancak bir tercih söz konusu olduğunda HPO_4^{2-} veya H_2PO_4^- formları sırasıyla tercih edilir [Beever and Burns,1980].



Şekil 2.4: Toprakta kimyasal ve organik gübre kullanımına ait döngüler.

Fosfatın bitkilerin kullanabileceği forma gelmesi için; inorganik fosfatın organik asitlerle parçalanması, organik fosfatın fosfataz enzimleriyle mineralize edilerek bitkinin kullanılabileceği hale getirilmesi şeklinde 2 yol vardır. Farklı bir açıdan bakıldığında bakterilerin fosfatlı bileşikler çeşitli enzim ve organik asitleri salgılayarak bitkinin kullanımına uygun hale getirmesi, doğada tek yönlü bir dolaşıma sahip fosfatlı bileşiklerin dolaşımı ve döngüsü için güzel bir örnektir [Hanif vd., 2015].

Toprakta organik asit oluşumuna katkıda bulunan PGPR'lerin ürettiği fosforu çözebilen organik asitlerden en bilinenleri; laktik asit, glukonik asit, asetik asit, formik asit, okzalik asit, tartarik asit, fumarik asit ve süksinik asittir. *Bacillus polymyxa*, *B. megatarium*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. firmus*, *P. striata*, *P. rathonia*, *Rhizobium leguminosarum* ve *R. meliloti*, organik asit üreterek fosforu çözebilen bazı PGPR bakterileridir. Hatta bazı *Bacillus* türleri laktik, izovalerik, izobütirik ve asetik asit grubunun karışımını üretebildiği Ram ve diğerleri tarafından bildirilmiştir [Ram, 2013].

Havadaki serbest azotu fikse edebilen ve fosfat çözücü bakterilerin şeker pancarı, şeker kamışı, pirinç, mısır ve buğdayda kullanıldığı bilinmektedir [Döbereiner 1997, HechtBuchholz 1998, Schilling et al., 1998]. *Bacillus* spp'ler ile yürütülen araştırmalarda pirinç, mısır ve diğer tahıllarda önemli verim artışı ortaya konulmuştur [Tiwari et al., 1989; Belimov et al., 1995; Sukhovitskaya, 1998; Çakmakçı vd., 1999, 2001, Pal 1999, Öztürk vd., 2003]. Biyolojik gübre olarak fosfatlı bileşikler çözebilen bakterilerinin kullanımıyla tarımsal üretim de %10-15

oranında artış gözleendiği de bildirilmiştir. Benzer çalışmalar gübre olarak mikroorganizmaların kullanılması konusunu daha da ilgi çekici hale getirmektedir [Yadav and Dadarwal 1997].

2.3. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler

Bitki büyüme ve gelişmesini teşvik eden bakteriler (PGPB)'in en önemli özelliklerinden birkaçı atmosferdeki serbest azotu bağlayabilmesi, bazı sekonder metabolitleri (bitki hormonu, siderofor ve antibiyotikler vb) üretmeleri, organik fosforu çözebilmesi, sistemik dayanıklılığı artırması, besin ve yer yarışı ile hastalık etmenlerini baskılayabilmesidir [Kloepper, 1980]. PGPB'ler kök yüzeyinde kolonize olabilmeleri, varlıklarını devam ettirebilmeleri ve diğer mikroorganizmalar ile rekabet ederek bitki gelişimini teşvik edebilmeleri ya da bitkiyi patojen saldırısı gibi stres faktörlerine karşı koruyabilmeleri ile karakterize edilmiştir [İmriz, 2014].

Aynı zamanda PGPB'ler etki mekanizmalarına göre de kendi içlerinde biyofertilizer grubu (besin elementlerinin bitki kullanımına hazır hale getirmesi), bitki stimülatörü grubu (bitki gelişimini teşvik etmesi), rizoremediator grubu (organik kirleticileri parçalayarak indirgemesi) ve biyopestisit grubu altında toplamışlardır [Somers et al., 2014].

2.3.1. PGP Bakterilerin Herbisit Parçalama Özellikleri

Herbisit kullanımı her ne kadar üründe verim artışına sebep olsa da fazla kullanımı sonrasında kalıntıları canlı hayatı için tehlikeli bir kirletici olabilir. Doğada bulunan her kirletici dolaylı ya da doğrudan insan hayatına karışarak bir tehdit oluşturur. Bu nedenle çevreden uzaklaştırılması gereklidir. Bunun için en çevre dostu yöntem detoksifikasyon ve bioremediasyondur. Bunun için doğada var olan en önemli kaynak ise bioremediasyon yeteneğine sahip mikroorganizmalardır [Wasi et al., 2013]. Toprak mikroorganizmaları genel olarak algler, Aktinomiset'ler, bakteriler ve funguslardır. Bu mikroorganizmalardan bazıları çoğalma ve büyüme için kullandıkları enerjilerini topraktaki organik maddeleri parçalayarak elde ederler. [Web4, 2020] Toksik kirleticilerin biyolojik parçalanma ve detoksifikasyonun da mikroorganizmaların rolü birçok çalışmada belgelenmiştir [Johri et al., 1996; Wasi et

al., 2011a, b]. Bu konudaki ilk rapor Matsumura, (1976) tarafından persistent pestisit hegzeklorosikloheksan (HCH)' ın *Pseudomonas* sp. izolatları tarafından aerobik olarak parçalanması konusunda yapılmıştır [Matsumura et al., 1976]. Daha sonralarda bu mikroorganizmanın *P. paucimobilis* olduğu, Wada, (1989) tarafından bildirilmiştir [Wada, 1989].

2.3.2. PGP Özelliği Olarak Fosfat Çözebilme Yeteneğine Sahip Bakterilerin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

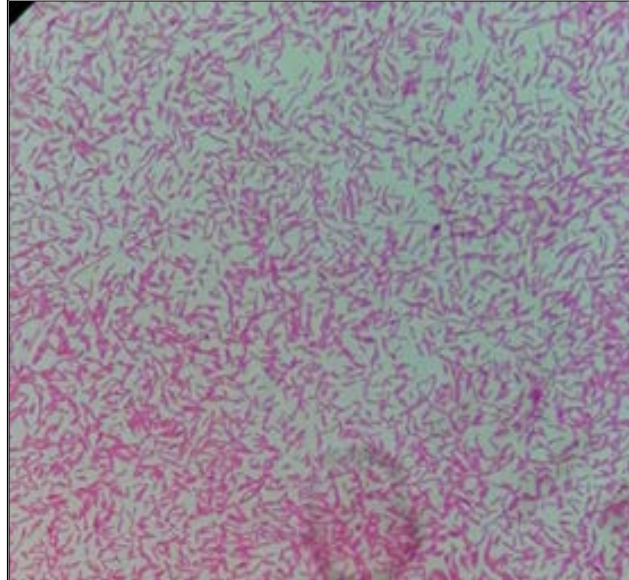
Toprakta bulunan bakteri yoğunluğu en çok rizosferik bölgededir. Rizosferik bölge toprak altında kök çevresine en yakın bölge olarak tanımlanabilir. Mevcut durumda da toprakta fosfat çözebilen bakteriler vardır ancak sayıları rizosferdeki diğer bakterilerle savaşacak düzeyde değildir [Çakmakçı, 2004].

Fosfat çözebilme yeteneği olan bakterilerin (Phosphate Solubilizing Bacteria-PSB), Cattelan ve diğerleri 1999'da ki çalışmalarında beş rizosferik izolattan fosfat çözebilme yeteneği olan ikisinin P alımı konusunda soya gelişimi üzerinde olumlu etki gösterdiğini belirlemişlerdir [Cattelan, 1999].

Bakterilerin bitki gelişimine etkisi çok yönlü olmakla birlikte çoğu mikroorganizma P alımını artırmaktadır. Mısır ve marulda mikroorganizmaların mineral fosfatları çözerek gelişimi artırdığı Chabot ve diğerleri tarafından gösterilmiştir [Chabot,1996]. Benzer bazı çalışmalarda *Burkholderia cepacia*' nın önemli miktarda P çözdüğü ve belli ölçüde fosfataz aktivitesi gösterdiği [Rodríguez et al., 1996], *Pseudomonas putida*'nın bitki kök ve gövde gelişimini teşvik ettiği ve kanolada P alımını arttırdığı belirlenmiştir [Lifshitz et al., 1987]. *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* ve *X. maltophilia* suşlarının çok iyi P çözebildiği belirlenmiştir [De Freitas et al., 1997]. Pirinç fidelerinin *Azospirillum lipoferum* ile aşılınması, P oranını, kök uzunluğu ve kuru bitki ağırlığını artırmış [Murty and Ladha 1988], *B. firmus* [Data et al., 1982], *B. polymyxa* [Gaur and Ostwal 1972] ve *B. cereus* [Fernández et al., 1984] aşılamasından sonra P alımı ve bitki verimi arttığı gözlemlenmiştir.

2.3.3. PGPB olarak *Pseudomonas*'lar

Pseudomonas'lar Gram negatif (Şekil 2.5) basil morfolojisine sahip, polar flagella ile hareket edebilen nadiren hareketsiz (bazı türleri kısa dalga boylarında yanal kamçı oluşturabilen), katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteri ailesidir. Birçok farklı türü bulunan bu bakteriler üzerine oldukça fazla çalışma bulunmaktadır [Palleroni, 2015]. Sahip oldukları ilgi çekici bazı özellikler (fosfat çözebilme, azotu fikse edebilme, herbisit parçalayabilme vb.) sayesinde de bitki gelişimi üzerine çalışan bilim insanlarının ilgisini çekmişlerdir. Örneğin; Özyılmaz ve diğerleri yaptığı deney sonucunda *Pseudomonas* sp ile kaplanan tohumların verticillium hastalığına daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir [Özyılmaz vd., 2012]. Bir diğer çalışmada da Sarı ve diğerleri (2002) Dicamba' nın *Pseudomonas maltophilia* tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanıldığını, *P. maltophilia*'nın Dicamba'yı 30 C'de metabolize edebildiğini bildirmişlerdir. Toprakta özellikle rizosfer bölümünde oldukça yoğun şekilde bulunduğunu tespit ettikleri bu bakteri grubunu gerek herbisit parçalayabilme gerekse fosfat çözebilme yeteneği gibi birçok bitki gelişimine fayda sağlayabilecek özelliğe sahip olduğu için PGPR olarak nitelendirmişlerdir [Sarı, 2002].



Şekil 2.5: *Pseudomonas* sp mikroskop görüntüsü.

2.3.4. Fosfat İndirgenmesinin Genetiği

Mikroorganizmalar sahip oldukları çeşitli fosfatlı bileşik indirgeme özellikleriyle topraktaki fosfat döngüsünün ayrılmaz bir parçası olmuşlardır. Bir yandan, asit fosfataz (*phoC* ve *olpA* tarafından kodlanır), alkalın fosfataz (*phoD*, *phoA*), fitaz (*appA*), fosfonataz (*phnX*) ve CP liyaz (*phnJ*) gibi bir dizi bakteri türevli enzim organik çözünmez haldeki fosfatlı bileşikleri bitki tarafından kullanılabilir hale getirebilir [Rodriguez et al., 2006; Richardson et al., 2011; Alori et al., 2017]. Öte yandan, sitrik asit, formik asit, glukonik asit, malik asit ve oksalik asit dahil olmak üzere çeşitli organik asitler, inorganik P formlarının mikrobiyal çözünürlüğünde rol oynar [Goldstein, 1995]. Bu organik asitler arasında glukonik asit bu süreçte en önemlisidir ve geniş çapta çalışılmış olandır. Özellikle Gram negatif bakterilerde fosfat çözünürlüğünde ana mekanizma olarak kabul edilir. Glukonik asit üretiminden sorumlu ana enzim olan glukoz dehidrojenazın *GCD* tarafından kodlandığı uzun zamandır bilinmektedir, Bitkiler bakterilerle karşılaştırıldığında daha az fosfatlı bileşik çözebilme kapasitesine sahiptir bu yüzden bakterilerin ortamda bulunması bitkiler için de yararlı olduğu bildirilmektedir [Liang, 2020].

2.3.5. Buğday Bitkisi

Gerek Türkiye’de gerekse dünyada önemli bir tahıl kaynağı olan buğday, çok eski zamanlardan beri tarımı yapılan ve tüketilen bir bitkidir. Ekim alanı ve üretim miktarı bakımından tahıllar içerisinde buğday (Şekil 2.6, Web5 kaynağından alınmıştır). (*Triticum aestivum L.*, *Triticum durum L.*) birinci sırada yer almaktadır [Geçit vd., 2009].



Şekil 2.6: *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* L.

Yapılan arkeolojik araştırmalarda ortaya çıkarılan buğday tohumlarının incelenmesi sonucu buğdayın M.Ö. 7000 yıllarında kültüre alındığı anlaşılmıştır. Buğdayın kökeninin Güneybatı Asya olduğu kabul edilmekle birlikte; Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya’da yabani buğday türlerinin bulunduğu ve bu yüzden de bu bölgenin gen merkezi olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmektedir [Çelikten, 2018].

Buğday dünyada yaklaşık 225 milyon hektar ekim alanına ve 736 milyon ton üretime sahiptir [USDA, 2017]. Dünyada buğday üretimi yapılan alanın yaklaşık %8-10’unda makarnalık buğday yetiştirilmektedir. Ülkemizde buğday yetiştirilen 7,9 milyon hektarlık alanda yaklaşık 19,5 milyon ton üretim yapılmaktadır [USDA, 2017].

Buğdayın gelişimi toprağın sahip olduğu besin elementlerinin miktarına bağlıdır. Besin miktarı ne kadar fazlaysa bitki gelişimi de aynı doğrultuda artış gösterir. Toprak doğal olarak çok sayıda mineral maddeyi bünyesinde bulundurur. Ancak bunların miktarları her zaman yeterli seviyede olmaz. Temel olarak ihtiyaç duyulan besinler makro ve mikro besinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Makro besin maddeleri yeni hücre ve dokuların oluşması, eskilerin muhafazası ve fonksiyonlarını yerine getirmeleri için fazla miktarda gerekli olanlardır. Bunlar; azot, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve kükürttür. Mikro besin maddeleri ise hücre içindeki önemli süreçler için gerekli olup çok az miktarda ihtiyaç duyulurlar. Bunlar; çinko, bakır, mangan, molibden, bor, demir ve klordur. Çok az miktarda ihtiyaç duyulsalar da eksikliklerinde verim kayıpları gözlenir [Mızrak, 2018].

Fosfor yetersizliğinde buğday bitkisi kısa kalır ve az kardeşlenir, sap inceler, kök gelişmesi zayıf olur, yapraklar küçülür ve koyu yeşil renk alır, olgunlaşma gecikir. Bazı buğday çeşitlerinde kırmızı veya pembe yaprak ayası rengi fosfor noksanlığı için bariz semptomdur [Mızrak, 2018].

2.3.5.1.Eminbey (*Triticum Durum* L.) Makarnalık Buğday Çeşidi

Emin Bey makarnalık buğday çeşidi olup aynı zamanda irmik, bulgur ve kuskus üretimi içinde uygundur. Yüksek verim parametrelerine sahip olması geniş coğrafik koşullara uyum sağlayabilmesi yüzünden ülkemizde ekim alanı olarak ekmeklik buğday öne çıksa da önemli gıdaların ana kaynağı olduğundan ekimi önemlidir. Yani makarnalık buğday ülkemizde özel iklim koşulları gerektirmesinden dolayı daha sınırlı alanda (7.3 milyon ha buğday ekim alanının 1.2 milyon hektarı) ekilmektedir. Hâlbuki ülkemiz makarnalık buğdayın gen merkezidir. Aynı zamanda sahip olduğu iklim koşulları nedeniyle kaliteli makarnalık buğday üretimine de son derece uygundur. 2004 yılında 2.1 milyon ha olan makarnalık buğday ekim alanında günümüze gelindiğinde ciddi oranlarda azalmıştır [Bozkurt, 2012; TÜİK, 2019; Benlioğlu vd., 2020]. Enteresan bir şekilde ülkemiz makarnalık buğday ihtiyacını ithalat ile karşılamaktadır [Dirik ve Sakin, 2018].

Makarnalık buğday çeşitleri içinden Eminbey çeşidi morfolojik olarak; orta boy uzunluğunda, kılçıklı beyaz başaklar olan, sağlam yapılı uzun oval ve dolgun biçimli tane yapısına sahiptir. Bunların yanında kışın ve soğuk iklim kuşağında gelişen yatmaya dayanıklı ve gübrelemeye cevabı iyi seviyededir. Azotlu gübreleme sayesinde iyi bir gelişim gösterir. Danelerini dökmeyen, kolay harman edilen bir çeşittir. Eminbey çeşidi dekar başına 350-750 kg verim aralığına sahiptir. Koyu renkli irmiği proteince zengin içeriği ile iyi bir makarnalık buğday çeşididir. Ülkemizde Emin Bey makarnalık buğday çeşidi için İç Anadolu ve geçiş bölgelerinin taban ve yarı taban alanları ekim alanı olarak Tarım Bakanlığı'na önerilmektedir [Tarım Orman, 2021].

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Bu tez çalışmasında *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Pseudomonas putida* (KT 244), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29122), *Escherichia coli* (ATCC 8739) ve yukarıda açık adı verilen ve 2018-A-105-A-04 no'lu BAP projesi kapsamında tarım alanlarından izole edilerek biyokimyasal testler ile genus seviyesinde ön tanımlamaları yapılan 45 adet *Pseudomonas* sp izolatu kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal

Saksı denemelerinde kışlık bir buğday olan *Triticum durum* L. Eminbey makarnalık çeşidi kullanılmıştır.

3.1.3. Tezde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 3.1'de, çözeltiler ve içerikleri ise Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Besiyeri	İçerikleri
Pikovskaya's medium	Glukoz 10 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 1 g/L, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 0.5 g/L, NaCl 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, KCl 0.2 g/L, maya özütü 0.5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, agar 15 g/L
Cetremide agar	Jelatin 20g/L, magnezyum klorid 10g/L, potasyum sülfat 10g/L, Cetremide 0,3g/L, agar 13,6 g/L
Lauria Bertani Broth	Trypton 10g/L, sodyum klorid 10g/L, maya özütü 5g/L

Tablo 3.1: Devam.

Nutrient agar	Pepton 5g/L, et özütü 3g/L, sodyum klorid 8g/L, agar 12g/L
SIM medium	Pepton(kazein) 20g/L, pepton(meat) 6g/L, amonyum demir (II) sitrat 0,2g/L, sodyum tiosülfat 0,2g/L, agar 3g/L
M9 medium	NaH ₂ PO ₄ ; 6gr, Casaminoacid; 5gr, KH ₂ PO ₄ ; 3 gr, NH ₄ Cl;1gr, NaCl;0,5 gr karıştırılarak otoklav edildi. Glukoz 10 ml, MgSO ₄ .7H ₂ O 1ml, Tiamin-HCL 1 ml, CaCl ₂ 1 ml

Tablo 3.2: Kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	İçerik
Barton's ayıracı	Amonyum molibdat, amonyum metavanadat, nitrit asit
Kovaks ayıracı	İzoamil alkol, para-dimetilaminobenzaldehid, hidroklorik asit
Fizyolojik tuzlu su (FTS)	8,5 gram NaCl ,1 litre dH ₂ O

Kullanılan besiyerleri hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

SIM (Sulfid Indole Motility) besiyeri: Dehidre SIM besiyeri olacak kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak (30,0 g/L) tam olarak eritilir. Besiyeri henüz sıvı halde iken iyice karıştırılıp homojen bir şekilde tüplere 4'er mL olarak dağıtılıp, 121°C'ta 15 dakika sterilize edilerek hazırlandı.

Pikovskaya's agar: Tablo 3.1'de tarif edildiği gibi besiyeri içerikleri tartılarak hazırlandı. pH 7±0.2 ye ayarlanarak kaynatıldıktan sonra otoklavda 1 atm basınç altında 121 °C'ta 15 dk steril edildi ve steril Petri kutularına 20'ser ml olarak aktarıldı.

M9 minimal besiyeri hazırlanışı: NaH₂PO₄; 6gr, Casaminoacid; 5gr, KH₂PO₄; 3 gr, NH₄Cl;1gr, NaCl;0,5 gr karıştırılarak otoklav edildi. Glukoz 10 ml,

MgSO₄.7H₂O 1ml, Tiamin-HCL 1 ml, CaCl₂ 1 ml solüsyonları hazırlanarak otoklav sonrasında M9 besiyerine eklendi. Erlenlere 20'şer ml aktarıldı.

LB Sıvı Besiyeri: Caisson firmasından temin edilen LB sıvı besiyerinden 25 gram tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7±0.2'ye ayarlanır ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Cetremide Agar: 45,3 g Merck marka cetremide agar tartılarak 1 litre saf suda çözüldü. pH 7,2±0.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 1 atm basınç altında 121 °C'ta 15 dk steril edildi ve steril Petri kutularına 20'şer ml olarak aktarıldı.

Nutrient agar: 20 g tartılan nutrient agar 1 litre saf suda çözüldü. pH 7,2±0.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 1 atm basınç altında 121 °C'ta 15 dk steril edildi ve steril Petri kutularına 20'şer ml olarak aktarıldı.

Kullanılan ayıraç ve çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

KH₂PO₄ standartının hazırlanması: 0,2195 g KH₂PO₄ 1 litre suyun içinde çözülerek 1 ml'de 59 ppm fosfor elde edildi. Hazırlanan çözeltiden 10 ml alınarak çözelti 250 ml'ye tamamlandı (Çözeltilerin 1 ml'si 2ppm fosfor içermektedir).

2 ppm'lik solüsyondan 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 ve 20 ml'lik oranlarda alınan çözelti balon jojelere aktarıldı ve üzerlerine 2,5 ml Barton's ayırıcı eklenerek çözelti distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.6, 3.2, 4.0, 6.0, 8.0 ppm konsantrasyonlarında 9 dilüsyon standart eğri için hazırlanmış oldu. Barton's ayırıcının hazırlanması: Solüsyon A ve B'nin karıştırıldıktan sonra ve 1 litreye dH₂O ile tamamlanarak hazırlandı.

Solüsyon A: 25 g Monyum Molibdat 400 ml H₂O da çözüldü.

Solüsyon B: 1,25 g Amonyum Metavanadat 300 ml kaynatılıp soğutulmuş suda çözüldü. Ardından 250 ml (%65) HNO₃ eklendi.

Agaroz jel: %1 w/v ve %2 w/v olacak iki şekilde agaroz tartıldı 1X TAE tamponunda mikrodalgada tamamen berraklaşana kadar kaynatılarak çözüldü. 50 °C'ye kadar soğuduğunda 1,5 µl redsafe eklendikten sonra jel tarağı takılmış jel tepsisine dökülerek donması sağlandı.

Fizyolojik tuzlu su: 8,5 gram NaCl 1 litre dH₂O ile çözüldü. 121 °C'ta 15 dk steril edilerek kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Kitler

Bu tez çalışmasında RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan Thermo Scientist GENEJET RNA purification kiti, DNase uygulaması için fermentas DNase kiti ve Real-time PCR için Thermo Scientific SyBR kiti, Bioline sensiFAST cDNA sentez kiti ticari kitleri kullanılmıştır.

3.2. Cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılmış olan cihazlar ve markaları Tablo 3.3'te belirtilmiş olup kullanılan cihazlar Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarları alt yapısında bulunmaktadır.

Tablo 3.3: Kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka
4 °C ve -20 °C Buzdolabı	Arçelik
-80 °C derin dondurucu	Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer
30°C inübatör	Nüve es120 soğutmalı inkübatör
Shaker	Infors HT
Nanodrop	Thermo
Steril Kabin	Nüve
Masa Üstü Santrifüj	Nüve
PCR (Polymerase Chain Reaction) cihazı	Bio-Rad
Su Banyosu	Nüve
Spektrofotometre	Shimadzu
Yatay Elektroforez Sistemi	BIO-RAD
Güç Kaynağı	BIO-RAD, PowerPac Basic
Otoklav	ALP
Uv Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Uv Görüntüleme Cihazı	Azure Biosystem, c600
Ph Metre	Hana Instruments, pH 211
Buz Makinesi	BAR-LINE BF85
Uv Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 530

Tablo 3.3: Devam.

Mikrodalga Fırın	Arçelik
Jel Görüntüleme Cihazı	Biorad
Real-Time qPCR (RTqPCR)	Applied biosystems

3.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.4: Kullanılan kimyasallar ve besiyeri katkıları.

Kimyasal	Markası
Maya özütü	Merck
Dekstroz	Riedel-de haen
Kalsiyum fosfat	Merck
Amonyum sülfat	Merck
Potasyum klorid	Sigma
Magnezyum sülfat	Merck
Manganaz sülfat	Sigma
Ferros sülfat	Sigma
Agar	Sigma
Kazamino asit	Sigma
Disodyum sülfat	Sigma
Mono potasyum fosfat	Sigma
Sodyum klorür	Sigma
Amonyum klorid	Sigma
Magnezyum sülfat	Merck
Tiamin.HCL	Sigma
Kalsiyum klorid	Sigma
Glukoz	Riedel-De Haen
Amonyum molibdat	Sigma
Beta-merkaptotanol	Applichem
SDS	Sigma

3.2.2. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçler

Hibriden DNA marker (100bp), 5x HOT FIREPol blend master mix (Solis Biodyne) enzim.

3.3. Yöntem

3.3.1. *Pseudomonas* spp. izolatlarının Saf Olup Olmadıklarının Kontrol Edilmesi ve Stoklarının Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan 45 *Pseudomonas* spp. izolatu saf kültür olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla Gram boyama yöntemi uygulanmıştır [Alexander ve Street, 2001]. Bunu gerçekleştirmek üzere, Nutrient Agar (NA) üzerine steril öze ile inoküle edilerek izolatların 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Lam üzerine 1 damla distile su bırakılarak, bakteri kolonisi lam üzerine yayıldı. Ardından 3 kez alev ile muamele edilerek fikse edilen lamlar kurutma etüvünde kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından ilk olarak lam üzerine kristal viole damlatılarak 1dk bekletildi ve süre sonunda boya distile su ile uzaklaştırıldı. Ardından lügol damlatılan lamlar 1 dk beklemenin ardından tekrar distile su ile yıkandı. Dekolorizasyon aşamasında preparatlar 10-15 saniye dekolorizasyon solüsyonu ile muamele edilmesinin ardından solüsyon distile su ile uzaklaştırıldı. Son olarak 30 saniye safranin ile muamele edilen preparatlar distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Boyamanın ardından Gram negatif basil formundaki izolatlar mikroskop altında 100X büyütmede immersiyon objektifi ile incelendi. Saf kültür oldukları doğrulanan izolatlardan buz üzerinde 1:1 (v/v) oranında bakteri kültürü ile steril %80'lik gliserol karıştırılarak izolatların stokları hazırlandı ve -20°C'ta muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

3.3.2. Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

3.3.2.1. Hareketlilik ve İndol Testi

Sahip oldukları flagella ve pililer sayesinde hareket edebilen bakterilerin belirlenmesi için uygulanan bir testtir. Bu test için kullanılacak Sulfide Indole Motility (SIM) ile bakterilerin 3 farklı özelliği (sülfid oluşumu, indol oluşumu ve hareketliliği) aynı anda taranabilir. Besi yerinin bir özelliği de yarı katı olmasıdır. Bu sayede besi yeri içerisinde bakterilerin hareket edebilmesini kolaylaştırır. İnkübasyon sonrası ekim bölgesinde oluşan bulanıklık hareketliliğin göstergesidir. Hareketlilik testi için pozitif kontrol *P. aeruginosa* ATCC 15692, negatif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29122 kullanılmıştır. Besiyeri berrak, sarımsı-kahve renkte ve 25°C de pH'sı $7,3 \pm 0,2$ dir. Hareketlilik testi yapıldıktan sonra indol testi yapılır. 0,5 mL Kovacs; Indole Reagent (Kovacs ayracı), besiyeri üzerine ilave edilir. İndol pozitif olan bakterilerde reaktif pembe renk alır [Web6, 2022].

Sım SIM besiyeri hazırlanıp otoklavdan çıktıktan sonra besiyeri tüplerin içerisinde dik olarak soğumaya bırakılmıştır. Katılaşıp besiyerlerine aseptik koşullarda alevde steril edilmiş steril iğne uç ile NA'daki 24 saatlik taze kültürlerden besiyerine bir ekim hattı üzerinden girip çıkacak şekilde inokülasyon yapılarak 30°C ta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ekim hattı etrafında oluşan bulanıklığa göre hareketlilik bakılmıştır. Hareketliliğin ardından örneklerin üzerine 0.5 mL Kovacs' Indole Reagent (Kovaks ayracı) ilave edilerek 2 dakika sonrasında renk oluşumları kayıtedilmiş ve oluşan kırmızı halka pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Negatif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692) ve pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* (ATCC 8739) kullanılmıştır.

3.4. Herbisit (Nikosülfüron) Degradasyonu için Seçili 5 İzolatın Degradasyon Seviyelerinin Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde seçilmiş *Pseudomonas* spp. izolatları için bir PGPR bakterilerinde bir özelliği olan herbisit degradasyonu incelendi. Yüksek hızlı sıvı kromatografisi kullanılarak sıvı besi ortamındaki herbisit miktarındaki değişimler ölçüldü.

Bu deney basamağı için herbisit miktarı final hacimde 5mg/L olacak şekilde 20ml M9 salt besiyeri steril erlenler içinde hazırlandı. İzolatların taze kültürlerinden steril %0,85'lik (w/v) FTS içinde 0.5 McFarland'a ayarlanarak ilgili besyerlerine %2 (v/v) inoküle edildi. İnokülasyondan sonra erlenler 7 gün boyunca 140 rpm'de 30°C'de inkübe edilmiştir. 1, 2, 4 ve 7. günlerde 5'er ml örnek alındı ve 4000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj ile çöktürüldükten sonra üst sıvı yeni bir ependorfa alınarak -20°C'ye kaldırılmıştır. Bu örnekler HPLC ile yapılan analizlerde kullanıldı. Pelletler ise RT_qPCR anallizlerinde gen anlatım düzeyinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı (BKZ.Bölüm 3.2.7).

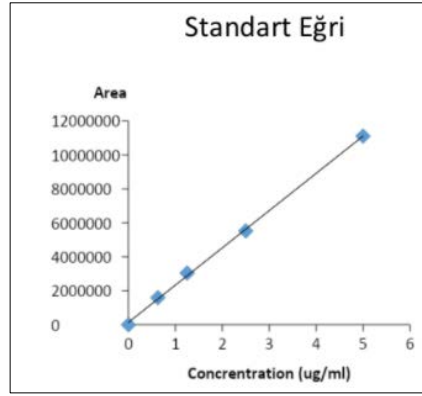
Analizi yapılmak istenen örnekler HPLC analizi için 0,45µm'luk membran filtreden geçirildi ve degradasyonu incelenecek nikosülfüron konsantrasyonunu hesaplamak üzere UV/VIS dedektör ile 240 nm dalga boyunda, C18 kolon kullanılarak Sigma ticari nikosülfüron (sigma 34210-100MG-R) protokolüne göre HPLC (Shimadzu 10A, Shimadzu, Colombia, MD) analizine tabi tutuldu.

Kullanılan HPLC metodu Tablo 3.5'te verildi. Örnekler 20 dakika süresince analiz edildi.

Tablo 3.5: HPLC metodu.

HPLC metodu	
Mobil faz	Asetonitril.dH ₂ O(20:80)+ %0,1 fosforik asit
Akış hızı	1 ml\min
Kolon sıcaklığı	30 derece
Enjeksiyon hacmi	20uL

0-6 ug/ml konsanstrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyonda nicosülfüron içeren standart çözeltilerle HPLC ölçümleri ile standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.1)



Şekil 3.1: HPLC ölçümleri ile standart eğri.

3.5. İnorganik Fosfat Çözebilen Bakterilerin Pikovskaya's Agarda Taranması

Bazı bakteriler inorganik fosfatı çözebilme yeteneğine sahip bakteri izolatlarının taranmasında kullanılan bir testtir [Suleman, 2018].

Her bir izolatın katı agardaki 24 saatlik taze kültürlerinden alevden geçirilerek steril edilmiş iğne uç ile Pikovskaya's agar besiyerine inokülasyon yapılmıştır. 30°C'ta 5 gün inkübasyon süresi sonunda şeffaf zon oluşturan izolatlar pozitif, zon oluşturmeyen izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *Bacillus cereus* (DSM 4312) kullanılmıştır.

3.5.1. İnorganik Fosfat Çözünürlüğünün Spektrofotometrik Yöntem ile Kantitatif Ölçümü

Seçilmiş 45 izolat içinden Pikovskaya's agar sonuçları göz önünde bulundurularak ve aynı zamanda zıolasyon noktalarının birbirine görece farklı olmasına dikkat ederek, ön tanımlama testlerinde birbirlerine görece farklı özellikleri daha öne çıkan (glukoz fermentasyonu, proteolitik, lipolitik enzim aktivitesi, pigment özelliği, azot indirgeme, fosfat çözebilme gibi aktivitelerden diğerlerine görece fazla olan ya da birden fazla özelliği birlikte bulunduran) 10 izolat ayrılmıştır (Bkz. 2018-A-105-A-04 proje sonuç raporu). Seçilen bu 10 izolata ortamdaki çözünmüş fosfat iyonunu ölçen aynı zamanda birçok disiplinde uygulama alanı olan Vanadate Molybdate Yellow Assay (VMYA) uygulandı. Ortamdaki çözünmüş fosfat iyonlarının varlığını, dolayısıyla mikroorganizmanın çözebildiği fosfat iyon

konsantrasyonunu belirlemeye yönelik kantitatif bir analiz olarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı [Pingale, 2013].

Bu yöntem çözünen fosfat iyonları ile molibdat arasında oluşan bileşik sonucu gözlenen renk değişimine (sarılaşma) dayanmaktadır. Gözlenen sarı renk arttıkça ortamda çözünmüş fosfat miktarı fazla olarak gözlenmiştir.

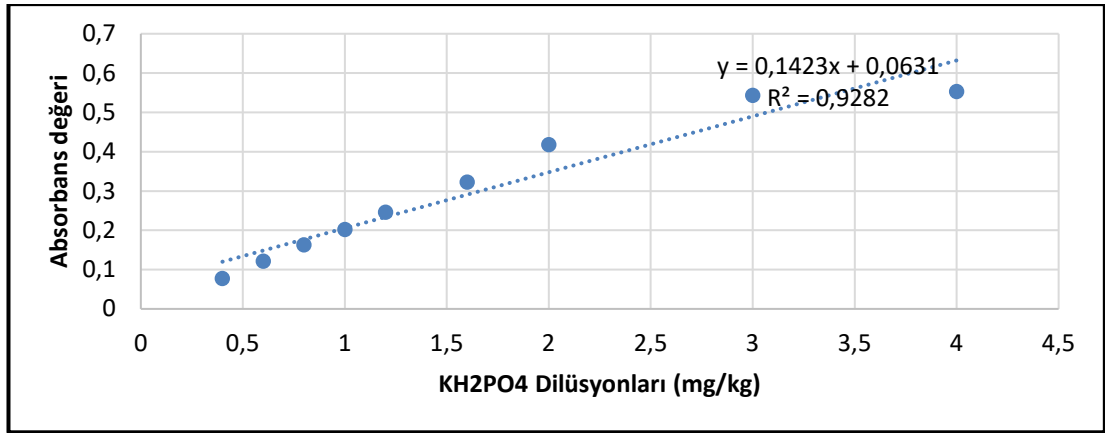
Seçilen 10 izolat 2 tekrarlı olacak şekilde, 0.5 McFarland'a steril Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) (%0,85 w/v) içinde %2 (v/v)'lik aşılama yapıldı. Her bir erlende yukarıda içeriği tarif edilen ve sıvı olarak hazırlanan 30 ml Pikovskay's sıvı besiyeri olacak şekilde 10 gün boyunca 150 rpm de 30°C 'ta büyütüldü. 10.günün sonunda her bir erlenden 5 ml alınarak bir 15 ml'lik konik tabanlı santrifüj tüpüne ayrıldı. Tüpler 20 dk 14.000 rpm de santrifüj edildi. Üst sıvıdan 2 ml çekilerek Whatmann kâğıdı yardımıyla filtre edildi. 2 ml üst sıvıdan 1 ml süzüntü elde edildi. Elde edilen 1 ml süzüntüye 250 ul Barton's ayırıcı eklenerek 10 dakika beklendi. Ardından spektrofotometre cihazında 430 nm de ölçüm yapıldı.

Standart eğrinin hazırlanması: Yukarıda tarif edilen şekilde (BKZ. Bölüm 3.1.2) hazırlanan 9 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler (Şekil 3.2; 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.6, 3.2, 4.0, 6.0, 8.0 ppm) için hazırlanıp Barton's ayırıcı eklendikten sonra 10 dk beklendi. Ardından spektrofotometrede 430 nm'de ölçüm alındı ve standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.3.).



Şekil 3.2: KH_2PO_4 ile hazırlanan Bartons's ayırıcı eklenmiş farklı konsantrasyonlardaki standart fosfor çözeltileri.

Ölçüm sonuçları önceden hazırlanan standart eğriye (Şekil 3.3) görece değerlendirilerek aşağıdaki formüle göre miktar tayini (ppm) yapıldı.



Şekil 3.3. KH₂PO₄ ile farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği.

Elde edilen eğrinin denklemi $y=0,1423x + 0,0631$ 'dir. Bu denkleme göre ortamda çözünmüş halde bulunan P miktarı ppm olarak hesaplandı.

3.5.2. Moleküler Yöntemler ile Fosfat Çözünürlüğünden Sorumlu Genin Varlığının Gösterilmesi

Spektrofotometre sonuçlarına göre seçilen görece daha iyi fosfatlı bileşikler çözdüğü tespit edilen 5 izolata glukonik asit (*GCD*) ve *pho* gen ailesinden *phoA* ve *phoC* varlığı Tablo 3.5(b)'te belirtilen primerlerle kontrol edildi. Kontrol bakterimiz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692 için NCBI'da tüm genom verileri analiz edilerek *GCD* gen bölgesine ait primer tasarlandı. Bu tez kapsamında tasarlanan ilgili primerler (Tablo 3.7) ile kontrol ve seçilmiş izolatlarda *GCD* gen varlığı PCR ile yapıldı. Bunun için ilgili primerler 5x HOT FIREEPol blend master mix (Solis Biodyne) enzimi ile PCR döngüsü Tablo 3.6'da gösterildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yaklaşık 40 dakika 90 V'ta yürütüldü. Jel görüntüleme (BIO-RAD, USA) cihazında genlerin varlığı kontrol edildi.

Tablo 3.6: PCR termal döngüsü.

Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	13 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	29
Bağlanma	55°C	45 sn	
Uzama	75 °C	20sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1

Tablo 3.7.: PCR basamağında tez kapsamında tasarlanan primerlere ait diziler ve PCR ürün boyutları.

Gen Adı	Primer Adı ve Dizisi	PCR ürün boyutu
phoA	PhoA F CCATCGACAAGCAGGACCAT PhoA R GATGATCTGGCTGGAGTGGG	158 bp
GCD	GCD F CTA CTGCGCCGTTGAAGCAGA GCD R GGGTGTTCTCGTTGGTCAGT	122 bp
phoC	phoC F CGGCTCCTATCCGTCCGG phoC R CAACATCGCTTTGCCAGTG	155 bp

3.5.3. Araştırılan 3 gen içerisinde *Gcd* Varlığı Gösterilen İzolatın Besiyesinde pH Takibi

Gcd varlığı gösterilen izolat (18 numaralı izolat) glukonik asit üretebilme yeteneğinin de desteklenmesi amacıyla besiyerindeki pH düşüşü takip edilmek üzere seçildi. Hazırlanan besiyerinden 7 gün boyunca günde 2 defa (12/24 sa) olmak üzere örnek alınarak pH'ları ölçüldü ve kaydedildi. Bunun için sıvı Pikovskaya's besiyeri hazırlandı ve başlangıç pH'sı 7.0 ± 3 'a ayarlandı. Besiyerine seçilmiş bakteri izolatının taze kültüründen Steril FTS (%0,85 w/v) ile 0.5 McFarland'a ayarlanmış hücre süspansiyonundan %2 (v/v) aşılama yapıldı. 7 günlük toplam 14 örneğin üst sıvıları pH ölçümü için pelletleri ise RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere olası RNA izolasyonları için toplanarak -80°C 'ta derin dondurucuya kaldırıldılar.

3.5.4. Seçilen İzolata Ait *GCD* Gen Ekspresyon Seviyesinin Moleküler Yöntemler ile Gösterilmesi

- RNA izolasyonu için izolatın hazırlanması

Bölüm 3.2.5.1'de tarif edildiği gibi izolatın pelletlerin içinden pH ölçümlerinde en düşük ölçümün yapıldığı gün örneği kullanılmak üzere seçildi.

- RNA izolasyonu

Thermo PureLink RNA mini kit prosedürüne göre seçilmiş 18 numaralı izolatın (≤ 1.109 hücre /ul) pelletinden RNA izolasyonu yapıldı. Pellete 100 ul hazırlanmış lizozim çözeltisi eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve yeniden süspanse edildi. Üzerine 0,5 ul %10 SDS solüsyonu eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Karışım

oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi. 2-merkaptoetanol (β -ME) (%2 v/v) ile hazırlanmış 350 ul liziz tamponu eklendi. Lizat 1.5 ml'lik yuvarlak tabanlı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. ve en az 45 sn boyunca max hızında homojenizatör kullanarak homojenize edildi. Homojenat oda sıcaklığında 5 dk 2.600 g'de santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant temiz RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

Bağlama-yıkama-elüsyon basamağında bakteri hücre homojenatının her hacmine 250 ul %100 etanol eklendi. Etanol eklendikten sonra oluşabilecek herhangi bir görünür çökeltiyi dağıtmak için vorteks ile karıştırıldı. Numuneyi (kalan çökelti dahil) bir kolona aktarıldı. Hem kolon hem de toplama tüpünü 12.000 g'de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj edildi ve üst sıvı azaklaştırıldı ve ardından aynı kolon aynı toplama tüpüne yeniden takıldı. Kolona 700 ul yıkama tamponu 1 eklendi. Oda sıcaklığında 12.000 g 15 sn santrifüj edildi, üst sıvı ve toplama tüpünü atıldı ve yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona etanollü 500 ul yıkama tamponu 2 eklendi. Oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. Kolon aynı toplama tüpüne yeniden yerleştirildi. Adım 6-7'yi bir kez daha tekrarlandı.

Bağlı RNA ile zarı kurutmak için kolonu ve toplama tüpünü 12.000 g'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünü attıktan sonra kolon bir yıkama tüpüne yerleştirildi. Kolonun ortasına 30-100 ul RNaz ari su eklendi. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kolonu ve yıkama tüpünü oda sıcaklığında 12.000 g'de 2 dk santrifüj edildi. İzole edilmiş RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

- DNase uygulaması ile elde edilen RNA'nın DNA'dan temizlenmesi:

Bu basamak Femantase DNase enzim protokolüne göre yapıldı. 1000ng RNA için; 1 ul 10X MgCl₂'li reaksiyon tamponu, 1ul Dnase I, 10 ul'ye apirojen su ile tamamlandı. 37 °C'ta 3 saat inkübe edildi. Ardından 1ul EDTA (50mm) reaksiyon tüpüne eklendi. 70 °C'ta 20 dk bekletilerek DNase reaksiyonu sonlandırıldı. Ortamdan DNA'nın uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı kurulan kontrol PCR'ı ile doğrulandı.

- Saf RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi:

Bioline cDNA kit prosedürünü takiben RNA 10ul, tampon 4ul, revers transkriptaz 1ul, dH₂O 5ul eklenerek Tablo 3.8'de belirtilen PCR döngü programı

uygulanmıştır. Termal döngü programı bittikten sonra uygulanan protokolün çalışıp çalışmadığını gözlemlemek için kontrol PCR' ı yapılmıştır.

Tablo 3.8: cDNA termal döngü programı.

Primer bağlanma	25 derece 10dk
Revers transkriptaz	42 derece 15dk
İnaktivasyon	85 derece 5dk
Saklama	+4

Tez çalışmasının bu bölümünde PCR ile varlığı tespit edilen GCD geninin ifade seviyesine Real Time qPCR (RT-qPCR) ile bakılmıştır.

RT- qPCR için kullanılan primerler (*rpoD* (housekeeping 1) ve *GCD*), PRIMER3 programı kullanılarak tasarlandı ve Tablo 3.10'da verildi Primerlere ait olası self-dimer, heterodimer oluşumu ve ikincil yapılar için IDT OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., ABD) programı ile tarandı.

RT-qPCR, ABI 7500 StepOnePlus™ cihazında (Applied Biosystems, ABD) iTaq Universal SYBR Green (Thermo Scientific, USA) kullanılarak üreticinin protokolüne göre yapılmıştır. Kullanılan RT-qPCR döngü koşulları Tablo 3.9'da belirtilmiştir. Ürünlerin özgüllüğünü ve homojenliğini kontrol etmek için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Tüm deneyler kopya halinde 3 biyolojik tekrarlar yapılmıştır.

Tablo 3.9: RT-qPCR döngü koşulları.

Reaksiyon koşulları	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç denatürasyon	95°C	10dk	1
Denatürasyon	95°C	15sn	40
Bağlanma	60°C	30sn	
Uzama	60°C	30sn	

Tablo 3.10: RT-qPCR için kullanılan primerler.

Primer adı	Dizi	PCR ürün boyutu
GCD F	CTACTCGCCGTTGAAGCAGA	122 bp
GCD R	GGGTGTTCTCGTTGGTCAGT	

Tablo 3.10: Devam.

RpoD F	ACCAGCTTGATCGGCATGAA	91 bp
RpoD R	AGAAGGCCCTGAAGAAGCAC	

3.6. Seçilmiş Fosfat Çözebilen İzolatın Saksıda Sera Koşullarında Buğday Bitkisi Büyüme Parametrelerinin İncelenmesi

Saksı denemelerinde kullanılan toprak Gebze Teknik Üniversitesi Kampüs arazisinden alındı. Toprak 1:1 oranında ticari dış mekan toprağı ile karıştırılarak karışım toprak elde edildi. Drenajın arttırılması amacıyla, karışım toprağına 1:1 oranında kum ilave edilerek oluşturulan karışım iyice homojen bir dağılım olması için tekrar karıştırıldı. Hazırlanan saksı toprağı 121°C’de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Denemelerde kullanılan karışım toprağından alınan 3 farklı toprak örneğı analiz edilmek üzere Konya Gıda Tarım Üniversitesi Toprak analiz laboratuvarına gönderildi. Bu deneyde 21cm kenar uzunluğına ve 30 cm derinliğe sahip 11 lt hacimli kare saksılar kullanıldı. Her bir saksıya 7 buğday tohumu olacak şekilde ekim yapıldı. Saksılarda makarnalık buğday (*Triticum durum L.*) Emin Bey çeşidi kullanıldı. Eklenecek gübre miktarı saksı yüzey alanına ve toprak miktarına göre 12 kg/da olacak şekilde hesaplandı [Web 7, 2022].

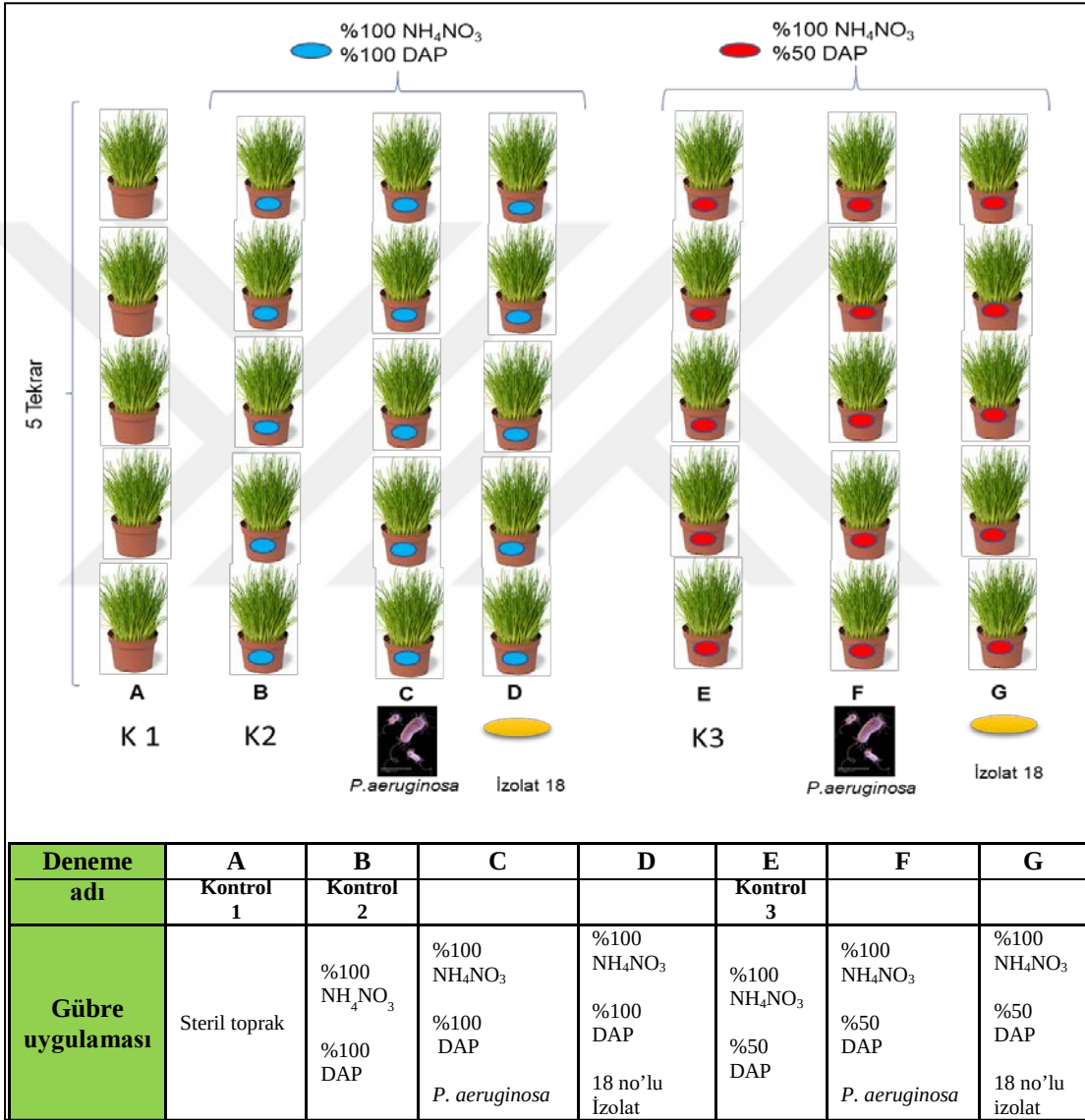
Fosfat çözebildiğini tespit ettiğimiz bakteri ile aşıl原因 saksılar, önerilen DAP dozunun %50’si ve %100’ ü ile desteklendi. Sadece %50 DAP ve %100 DAP ile hazırlanan, bakteri inokülasyonu yapılmayan saksılar kontrol olarak kullanıldı. Tüm saksılara ekimden 1 ay sonrasında sapa kalkmasını takiben %100 doz amonyum nitrat gübresi eklendi (Şekil 3.4).

Ekimde kullanılacak tohumlar, aynı büyüklükte olmalarına göz önünde bulundurularak seçildi. Her saksıya 12 adet olacak şekilde ve toprağın 2 cm altına tohumlar ekildi. Ekim sonrasında her tohumun üzerine, 10^8 CFU/ mL yoğunluğındaki bakteri kültüründen 1 ml eklendi. Sapa kalkma dönemi öncesi her bitki köküne 1ml (10^8 CFU/ mL) dökülerek ve her bitkinin yaprağına yaklaşık 1ml spreyleme yöntemi ile bakteri inokülasyonu tekrarlandı. Aşıl原因mamış tohumlar negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak tasarlanan saksılardaki

tohumlar ise yine PGPR özellikleri ile bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edildi. Çimlenmenin ardından saksı başına düşen bitki sayısı 7'ye indirilmiştir.

Fosfat çözünürlüğü için yapılan saksı deney planı 3 ana gruptan oluşmaktadır (Şekil 3.4).

Morfolojik ve fizyolojik değişimler ve verim parametrelerine ilişkin gözlemler 8,16.20 ve 24.haftalar takip edilerek kaydedildi.



Şekil 3.4: Saksı deney planı.

3.7. İstatiksel analizler

Elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki farklar, asgari önemli fark testi (LSD, $P \leq 0.05$) kullanılarak ANOVA ile karşılaştırılmıştır.



4.SONUÇLAR

4.1. Tekirdağ İli Tarım Alanlarından İzole Edilen 45 *Pseudomonas* sp İzolatlarının Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

4.1.1. Gram boyama, Hareketlilik Testi ve İndol Testi

Gram boyama testi sonuçlarına göre; bütün izolatların Gram negatif özellikte ve morfolojik olarak basil şeklinde oldukları mikroskopik gözlemlerle doğrulanmıştır (Tablo 4.1).

Aynı zamanda tüm izolatlar hareketli ve indol negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1; Şekil 4.1; Şekil 4.2).

Tablo 4.1: Seçilmiş 45 izolatın Gram boyama, hareket ve indol testi sonuçları.

Kontrol Bakterileri* ve İzolatlar	Gram boyama	Hücre morfolojisi	Katalaz ve oksidaz test*	Hareketlilik testi	İndol testi	İnorganik fosfatlı bileşikleri çözebilme
<i>P. aeruginosa</i> *	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++++
<i>B. cereus</i> DSM 4312	Pozitif	Basil	X	X	X	-
<i>E. coli</i> *	Negatif	Basil	X	-	Pozitif	X
<i>E. faecalis</i> *	Pozitif	Kok	X	Hareketsiz	Negatif	X
1	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
2	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
3	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
4	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
5	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
6	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
7	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
8	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
9	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+

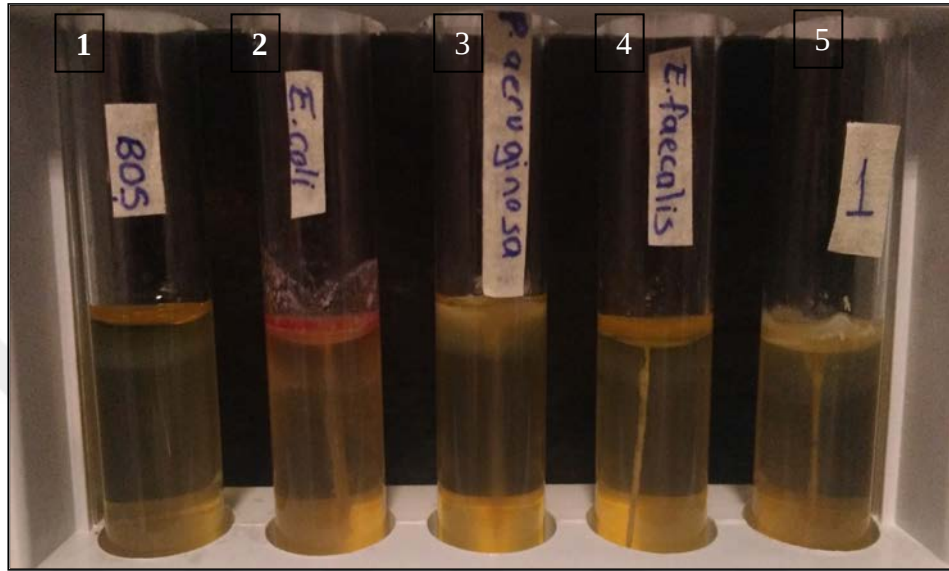
Tablo .4.1: Devam.

10	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
11	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
12	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
13	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
14	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
15	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
16	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
17	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
18	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
19	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
20	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
21	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
22	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
23	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
24	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
25	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
26	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
27	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
28	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
29	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
30	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
31	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
32	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
33	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
34	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
35	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
36	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	-
37	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
38	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
39	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
40	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
41	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++
42	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+++

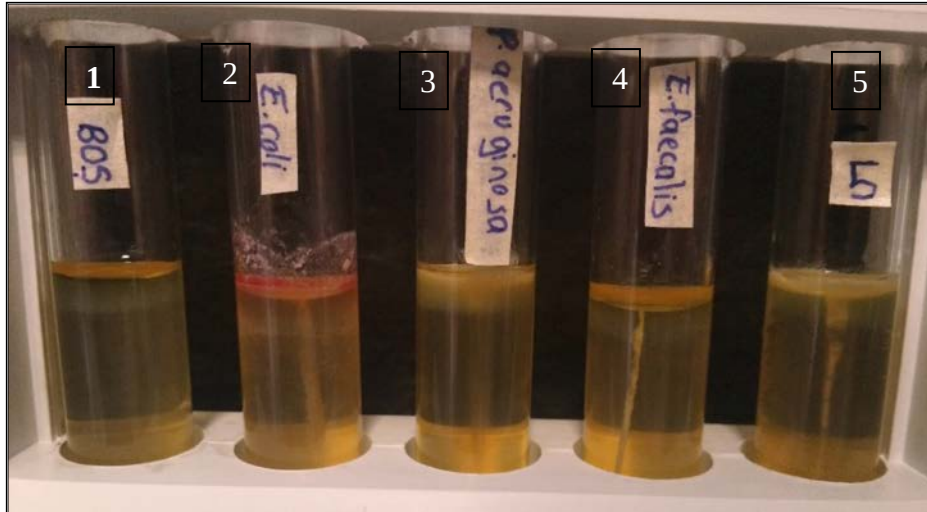
Tablo 4.1: Devam.

43	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	++
44	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+
45	Negatif	Basil	Pozitif	Hareketli	Negatif	+

X: söz konusu deneylerde kontrol bakterisi olarak kullanılmamıştır; *: 2018 A-105-01 xxx no'lu BAP projesinden alınmıştır.



Şekil 4.1: Hareketlilik ve indol testi sonucu örnek fotoğrafı; 1, inokülasyon yapılmamış negatif kontrol; 2, Indol pozitif kontrol (*E.coli*); 3, hareketlilik pozitif kontrol (*P.aeruginosa* ATCC 15692); 4, hareketlilik negatif kontrol (*E.faecalis* ATCC 29122); 5, İzolat (1).



Şekil 4.2: Hareketlilik ve indol testi sonucu örneği fotoğrafı; 1, inokülasyon yapılmamış negatif kontrol; 2, Indol pozitif kontrol (*E.coli*); 3, hareketlilik pozitif kontrol (*P.aeruginosa* ATCC 15692); 4, hareketlilik negatif kontrol (*E.faecalis* ATCC 29122); 5, İzolat(5).

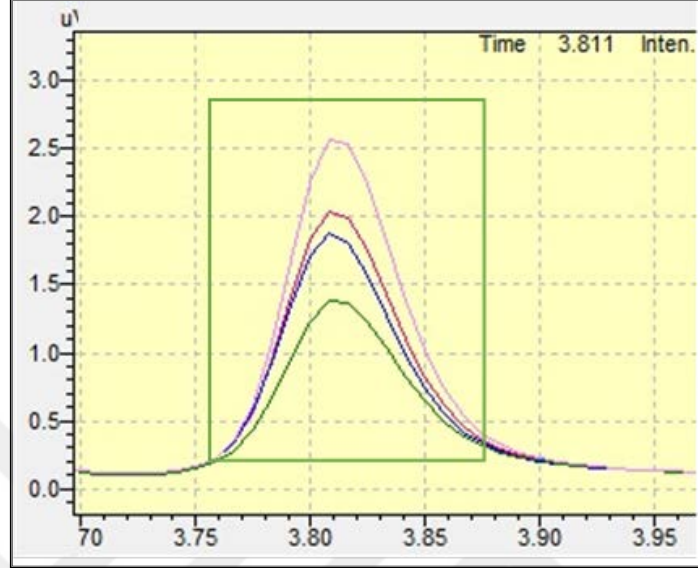
4.2. Herbisit (Nikosülfüron) Parçalayabilen İzolatların HPLC ile Tayini

Herbisit eklenmiş besiyerleri kullanılarak daha önceden BAP projesi kapsamında izole edilen, farklı yerlerden izole edilmiş olmalarına ve 16SrDNA ile moleküler tanımlamaları yapılmış olmasına da dikkat edilerek [Gül Şeker, 2021] 5 izolat (13, 15, 18, 38, 42) seçildi [Tablo 4.3, Gül-Şeker, 2021'den alındı]. 18 numaralı izolatın daha önceki Bap projesi kapsamında gerçekleştirilen dizi analizi sonuçları, çift yönlü (Forward ve Reverse) gerçekleştirilen dizileme sonuçları BioEdit Sequence Aligment programı ile eksik ve hatalı okumaların normalize edildiği konsensus dizileri oluşturuldu. Elde edilen dizi NCBI veri bankasındaki dizilerle karşılaştırılması (Nukleotit BLAST analizi) ile izolatın %98 *P. baetica*, *P. koreensis* ve *P. moraviensis*'e benzerlik gösterdiği tespit edildi (BKZ Ek1). İlgili izolatın dizisi konsensüs dizisi NCBI veribankasına yüklenerek bir erişim numarası MZ976856 alındı.

Tablo 4.2: 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre, NCBI veri bankasından elde edilen tanımlama sonuçları ve benzerlik yüzdeleri.

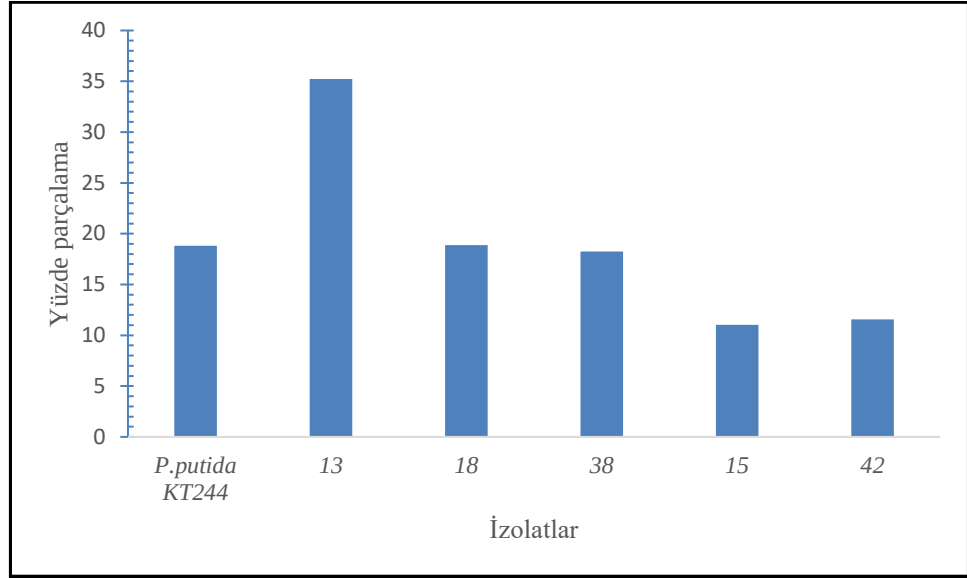
İzolat No*	Skor	Benzerlik Yüzdesi	Sonuç
13	1434	%100	<i>P. cremicolorata</i> DSM 17059 = NBRC 16634 <i>P. parafulva</i> NBRC 16636 = DSM 17004 <i>P. putida</i> strain ICMP 2758
18	1475	%98	<i>P. baetica</i> <i>P. koreensis</i> <i>P. moraviensis</i>
28	1407	%100	<i>P. plecoglossicida</i> NBRC 103162 <i>P. cremicolorata</i> DSM 17059 <i>P. parafulva</i> NBRC 16636
38	1389	%99	<i>P. reidholzensis</i> <i>P. putida</i> NBRC 14164 <i>P. putida</i> ATCC 12633
42	1434	%99	<i>P. reidholzensis</i> <i>P. putida</i> NBRC 14164 <i>P. putida</i> ATCC 12633

Bu izolatlar nikosülfüronlu (5mg/L) M9 besiyerinde büyütülerek HPLC ile degradasyon miktarı tayini yapıldı. Bu 5 izolatın içinden anlamlı sonuç veren 3 izolat seçilerek aşağıdaki grafik oluşturuldu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Seçilmiş izolatların nikosülfüron degradasyonuna ait HPLC grafiği. Pembe Eğri, negatif kontrol inoküle edilmemiş M9 medium; Kırmızı eğri, 38 numaralı izolat; Mavi eğri, 18 numaralı izolat; Yeşil eğri 13 numaralı izolat.

Şekil 4.3, incelendiğinde, yeşil eğri ile temsil edilen 13 numaralı izolat en iyi nikosülfüronu parçalayabilen izolat olarak öne çıkmaktadır. Bu izolatu mavi eğri ile temsil edilen 18 numaralı izolat ve kırmızı eğri ile temsil edilen 38 numaralı izolat takip etmektedir. Adı geçen izolatların kontrole görece degradasyon yüzdeleri için ilk aşamada, Şekil 3.3’ de verilen standart eğri grafiğinden elde edilen formül kullanılarak örneklerdeki nikosülfüron miktarları $\mu\text{gr/ml}$ olarak hesaplandı. Elde edilen değerler kontrole görece oranlanarak yüzde indirgeme miktarları belirlendi ve Şekil 4.4’te verildi.

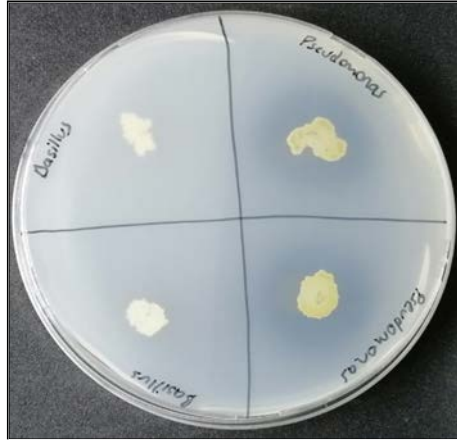


Şekil 4.4: Seçilmiş izolatların nikosülfüronu yüzde (%) degradasyon grafiği.

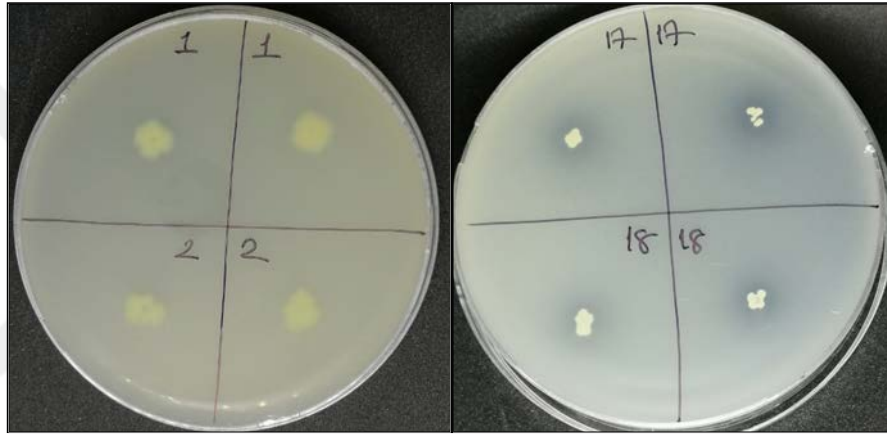
Şekil incelendiğinde yüzde parçalanma oranı en yüksek izolatın %35,22 ile 18 numaralı izolat olduğu ve kontrole görece (%18.8) yaklaşık 2 kat daha fazla nikosülfüronu parçalayabildiği gösterildi.

4.3. İnorganik Fosfatı Çözebilen Bakterilerin Pikovskaya Agarda Taranması

Pikovskaya besiyeri kullanılarak inorganik fosfat çözünürlüğünün tarandığı ilgili besiyerinde, 5 günlük inkübasyon sonucunda oluşan şeffaf zonlar, pozitif olarak değerlendirilecek şekilde gözlemlendi. Test sonucunda 45 izolatın 32 tanesinin fosfatı çözdüğü, bunların içinden 10 tanesinin de fosfatı görece daha iyi çözebildiği oluşan zonlardan tespit edildi (Şekil 4.5; 4.6).



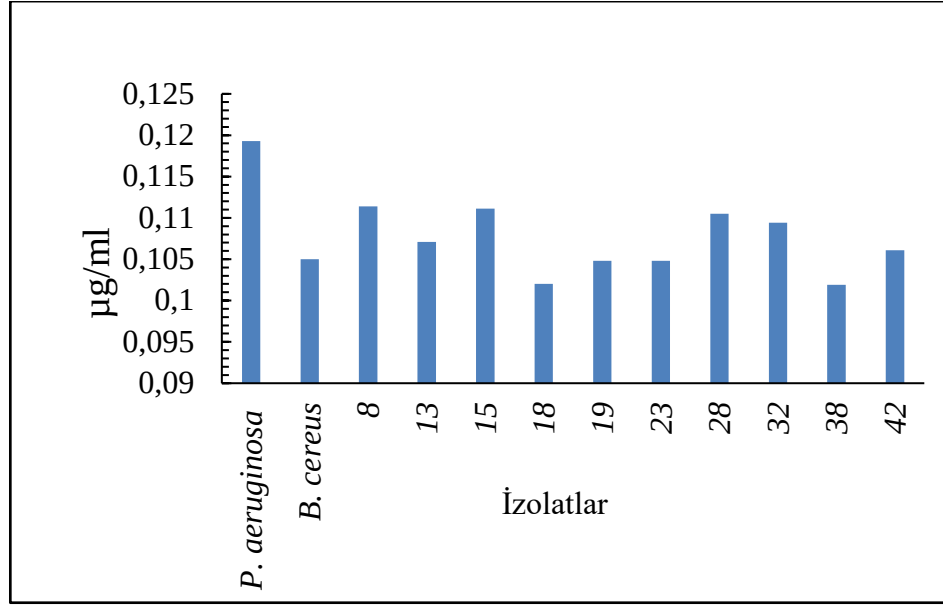
Şekil 4.5: İnorganik fosfat testi için kontrol grubu
B. cereus DSM 4312 (- kontrol), *P. aeruginosa* ATCC 15692 (+kontrol).



Şekil 4.6: İnorganik fosfat çözünürlüğü için örnek Petri görüntüleri.

4.3.1. İnorganik Fosfat Çözünürlüğünün Spektrofotometrik Olarak Tayini

45 izolatın içinden fosfatlı bileşikleri çözebilen ve aynı zamanda farklı bölgelerden izole edilmiş olup, diğer PGPB özelliklerin (azotu fikse edebilme, PO_4 'ı çözebilme, proteolitik ve lipolitik enzim aktivitelerine sahip vb.) birine ve/veya birkaçına sahip 10 izolat için kantitatif olarak spektrofotometrik analiz yolu ile 430 nm'de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: İzolatların kontrol bakterilerine görece çözünmüş P miktarları.

Kontrol bakterilerin ve izolatların spektrofotometrede elde edilen absorbanları Şekil 3.2’ de verilen standart eğri grafiğinden elde edilen formül ($y=0,1423x + 0,0631$)’e göre üst sıvılarının içindeki çözünmüş P miktarı $\mu\text{gr/ml}$ olarak hesaplanmıştır. İlgili sonuçlar kontrol bakterileri ile kıyaslandığında seçilmiş tüm izolatlar kontrol bakterisi *P. aeruginosa* kadar olmasa da fosfatlı bileşikleri çözebilme kabiliyetlerini ortaya koymuşlardır. Elde edilen sonuçların aralarında çok önemli farklar gözlenmemiştir (Tablo 4.2).

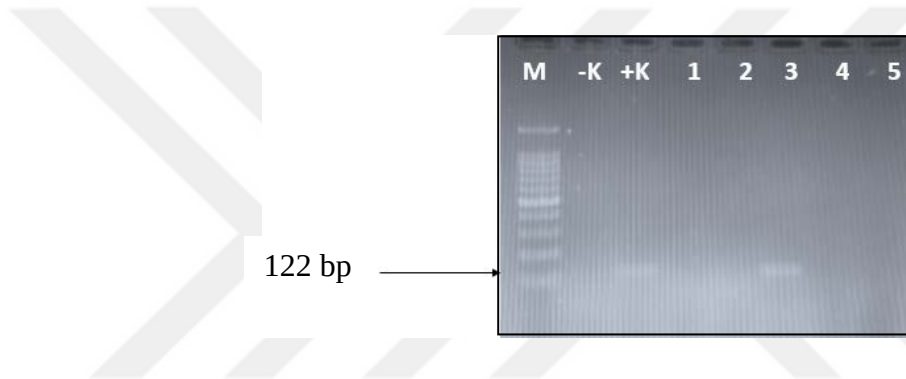
Tablo 4.3. Seçilmiş 10 izolatın kontrollerine görece çözünmüş fosfat miktarları ($\mu\text{gr/ml}$).

İzolat no	$\mu\text{gr/ml}$
<i>P. aeruginosa</i>	0,1193
<i>B. cereus</i>	0,105
8	0,1114
13	0,1071
15	0,1111
18	0,102
19	0,1048
23	0,1048
28	0,1105
32	0,1094
38	0,1019
42	0,1061

Tablo 4.3 incelendiğinde 8, 13 ve 28 numaralı izolatların 0,11µg/ml ile diğer izolatlardan görece daha fazla çözücü olabildiği gösterildi.

4.3.2. Fosfat Çözünürlüğünden Sorumlu Genlerin (*phoA*, *phoA* ve *GCD*) qPCR ile Varlığının Gösterilmesi

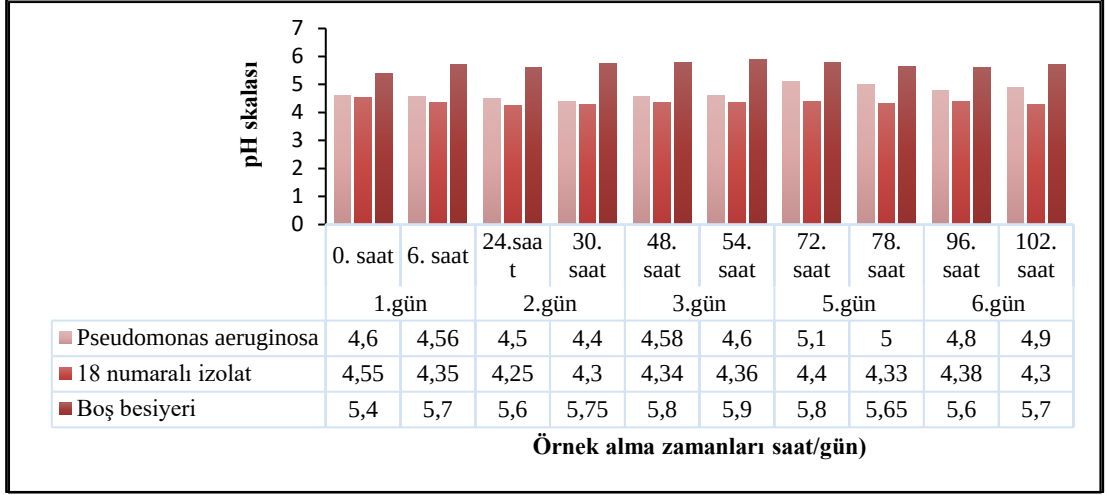
Seçilen 10 izolatta fosfat çözünürlüğü metabolizmasını kontrol eden üç farklı (*phoA*, *phoC* ve *GCD*) genin varlığı PCR ile kontrol edildi. Elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleme sonuçlarına göre; yalnızca 18 numaralı izolatta *GCD* geninin (122 bp) varlığı tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: *GCD* gen ürününün jel görüntüsü. -K: dH₂O kontrolü; +K: *Pseudomonas aeruginosa*; M: markır 100pb; 1: 8 numaralı izolat; 2: 15 numaralı izolat; 3: 18 numaralı izolat; 4: 28 numaralı izolat; 5: 32 numaralı izolat.

4.3.3. *GCD* Varlığı Gösterilen İzolatın Besiyerinde pH Takibi

GCD geni glukonik asit üretiminde görev almaktadır. Bu sebeple ilgili izolatın Ca₃PO₄ ile hazırlanmış Pikovskaya besiyerinde (başlangıç pH'sı 7.0) pH değeri takibi yapılmış (Şekil 4.9) ve diğer örnek saatlerine görece düşük pH ölçülen gün alınan örneğin pelletinden elde edilen RNA, gen anlatımının artışının gösterilmesinde (RT-qPCR) kullanılmıştır.



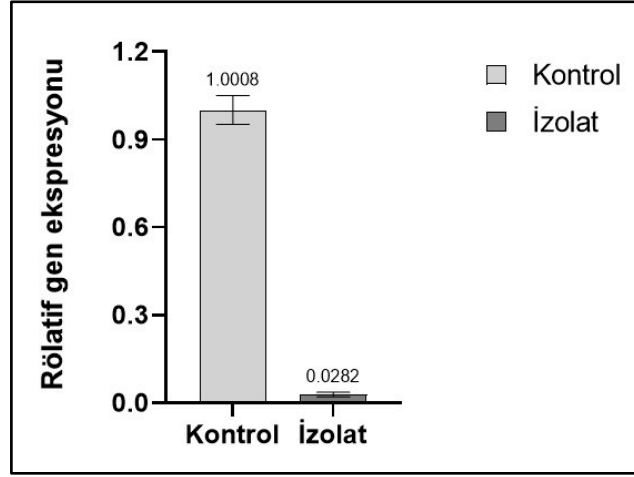
Şekil 4.9: 18 numaralı izolatın kontrole görece 96 saat boyunca pH takip sonuçları.

Bu verinin sonucunda pH'daki değişimin en çok 2.günde gerçekleştiği (pH 4,34) belirlendi. Böylece gen ekspresyonunun incelenmesi için 18 numaralı izolatın 2.gün örneklerinden alınan pelletlerin kullanılmasına karar verildi.

4.3.4. Fosfat Çözünürlüğü için Belirlenen Genin (*GCD*) İfadesinin Real-Time PCR Kullanılarak İncelenmesi

GCD varlığı tespit edilmiş 18 numaralı izolat ve kontrol bakterisine ait Ca_3PO_4 (5 g/L) ile hazırlanmış Pikovskaya besiyerinde aynı koşullarda kültüre edildi, ardından gen ifadesinin seviyesi RT-qPCR ile tespit edebilmek için pelletler ayrıldı.

Pelletlerden elde edilen RNA örnekleri, DNA açısından temiz hale getirildikten sonra, *GCD* ve *rpoD* genlerine ait primerler kullanılarak (122 bp ve 91 bp) RT-qPCR' da gen ekspresyon seviyelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlara göre, 18 numaralı izolatta kontrole görece düşük olsa da *GCD* ekspresyonunun mevcut olduğu gösterildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: 18 numaralı izolatın kontrole (*P. aeruginosa*) görece gen ekspresyon seviyesinin Real time-PCR sonuçları.

Şekil 4.10’da da görüldüğü gibi kontrol bakterisi (*P. aeruginosa*) Petri denemelerini de destekler şekilde 18 numaralı izolata görece daha aktif görünmektedir. Ancak yine de, ilgili izolatın fosfatlı bileşikler çözme yeteneğinin olması sebebiyle saksı denemelerinde kontrole görece topraktaki performansını gözlemlemek adına kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerinde Verim Parametrelerinin İncelenmesi Sonuçları

Yapılan fosfat özünürlüğü deneyleri sonucunda 18 numaralı izolat saksı denemeleri için seçilmiştir.

Saksı denemesinde kullanılmak için elde edilen toprak karışımından alınan 3 örneğin analizinden gelen değerlerin ortalamaları alınarak [Arıt, 2022], Tablo 4.4 oluşturuldu.

Tablo 4.4: Toprak analiz sonuçları.

Analiz Adı	Sınır değerler*	Sonuç	Birim
pH	6.50-7.50 (Nötr)	6,975±0,025	
EC	0,92 ms/cm (Türkiye Ort.)	1,076667±0,119	ms/cm
Toplam Tuz	0.00-0.15 (tuzsuz)	0,027333±0,001	%
Su ile Doygunluk	%30-50 (tınlı)	39,96667±1,869	%

Tablo 4.4: Devam.

Organik Madde	%3.0-4.0 (iyi)	3,45±0,532	%
Kireç(CaCO ₃)	%15.0-25.0 (fazla kireçli)	18,08±1,463	%
P (Fosfor)	>12 kg/da (çok yüksek)	24,46667±5,957	kg/da
K (Potasyum)	>40 kg/da (fazla)	71,9±14,689	kg/da
Azot (N)	%0-1,0 (düşük)	0,147667±0,010	%

*(Sınır değerler WEB 7 (2021)'dan alınmıştır).

Toprak analiz sonuçlarına göre; deneme toprağı nötr pH (6,9)' da, Normal EC (1,07 ds/cm) sınır aralıklarında, tuzsuz (%0,27), su doygunluk oranı %39,96 olması ile tınlı toprak toplam organik madde oranı (%3,45) iyi seviyede organik içeriğe sahip, CaCO₃ %18,08 olduğundan fazla kireçli, çok yüksek fosfor içeriğine sahip, fosfat içeriğı 71,9 kg/da ile bu yönden zengin, ancak %0,147 toplam azot oranı ile kullanılabilir azotça fakir bir toprak olduğu görüldü (Tablo. 4.4).

7 grup 5 tekrarlı oluşmak üzere 35 saksının 8.haftada boy, sap ve gövde kalınlığı ölçümleri alındı (Tablo 4.5).

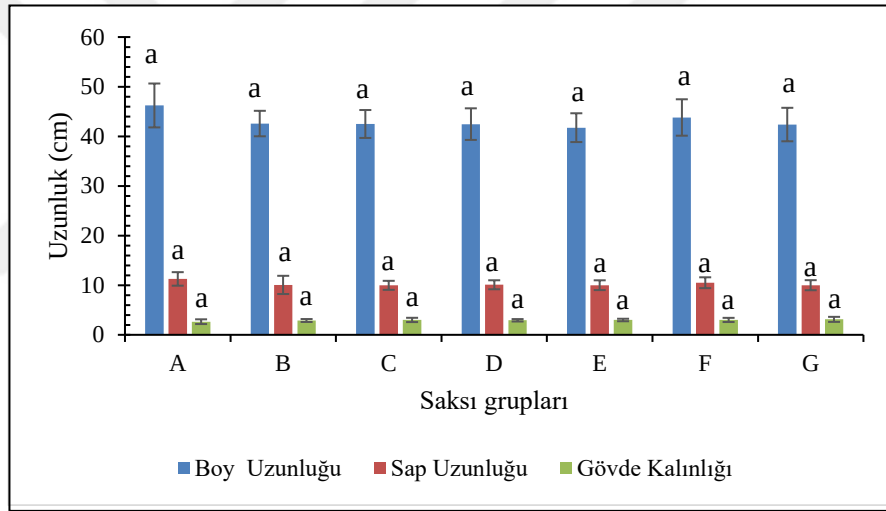
Tablo 4.5: 8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları ve gövde kalınlıkları.

Grup	Gövde Boyu(cm)	Sap Boyu(cm)	Gövde Kalınlığı (cm)
A Kontrol 1 Steril Toprak	46,22±4,42 ^a	11,26±1,36 ^a	2,65±0,47 ^c
B Kontrol 2 (%100 DAP+%100 amonyum nitrat)	42,57±2,56 ^{ab}	10,05±1,83 ^b	2,88±0,29 ^b
C (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+ <i>P.aeruginosa</i>)	42,48±2,81 ^{ab}	19,97±0,90 ^b	3±0,43 ^b
D (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+18 no'lu izolat)	42,45±3,18 ^{ab}	10,08±0,90 ^b	2,92±0,24 ^b
E Kontrol 3 %50 DAP+(%100 Amonyum nitrat)	41,74±2,90 ^b	10±0,98 ^b	2,98±0,25 ^b

Tablo 4.5: Devam.

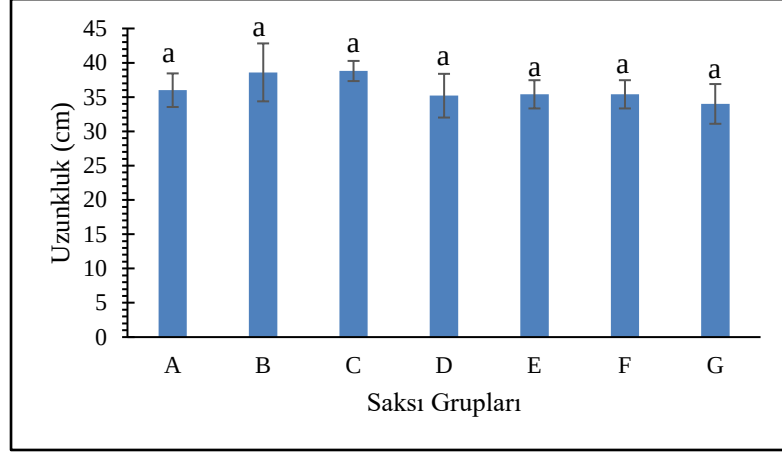
F (%50 DAP + %100 Amonyum nitrat + <i>P.aeruginosa</i>)	43,79±3,66 ^{ab}	10,5±0,09 ^b	3±0,42 ^b
G (%50 DAP+ %100 Amonyum nitrat +18 no'lu izolat)	42,37±3,37 ^b	10±1,01 ^b	3,11±0,50 ^a

8. haftada yapılan boy, sap uzunluğu ve gövde kalınlığı ölçüm sonuçları Şekil 4.11 ve 16.haftada yapılan 2. Boy ölçüm sonuçları ise Şekil 4.12'de gösterildi. 8. haftaya ait veriler incelendiğinde boy uzunluğunun saksı gruplarında 43 cm ile 46 cm, sap uzunluklarının da 93,97 cm ile 11,2 cm ve gövde kalınlıklarının ise 3,11 ile 2,64 cm arasında değiştiği ve aralarında istatistiki olarak fark olmadığı hepsinin tek bir grup altında toplandığı görüldü (Şekil 4.11)



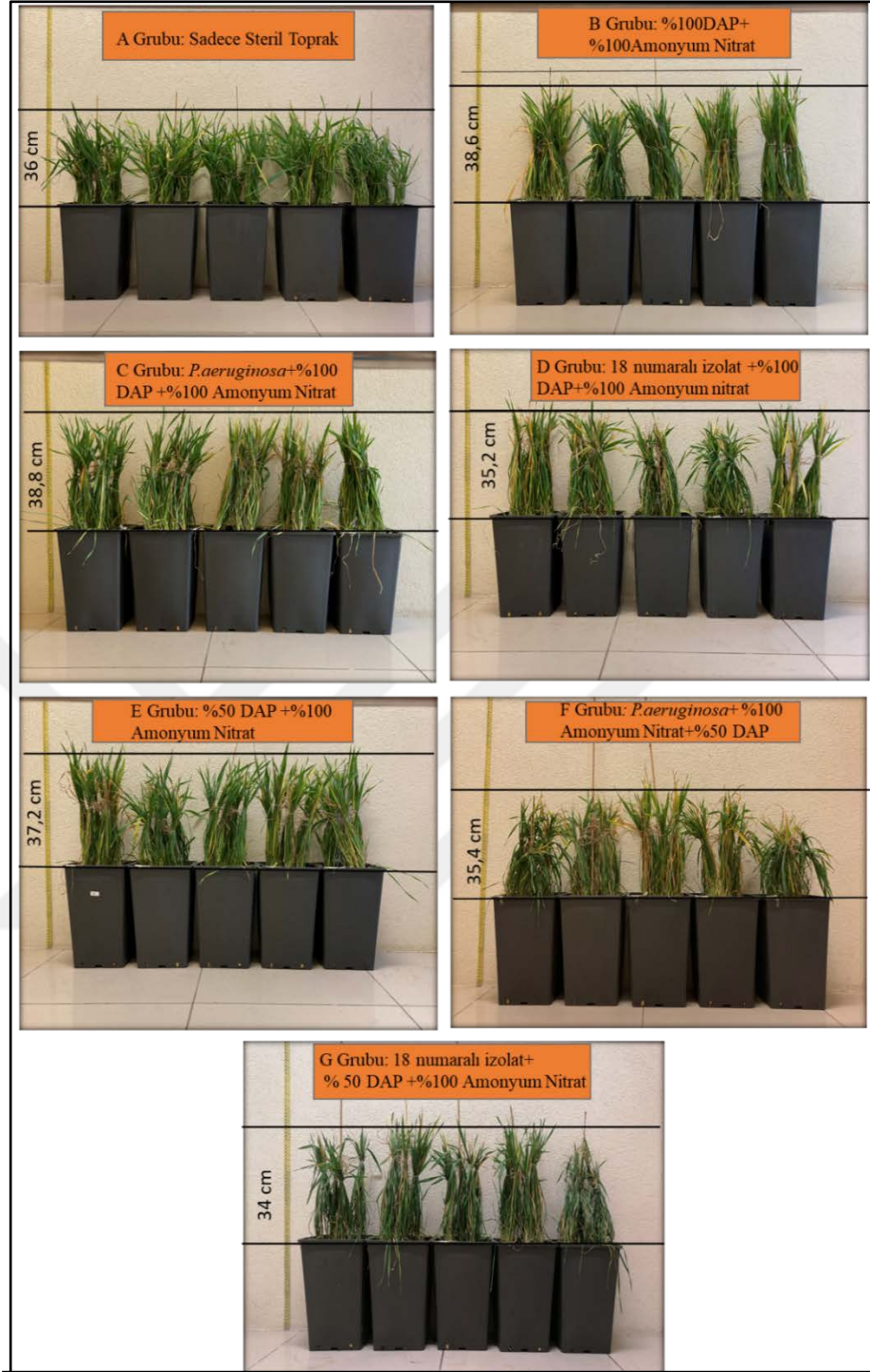
Şekil 4.11: 8. haftada buğday boy, sap ve gövde kalınlığına (cm) ait ölçüm sonuçları.

Şekil 4.12' de 16.haftaya ait 2. boy ölçümleri incelendiğinde ortalama boy uzunluklarının saksı denemeleri arasında 38,8 ile 34 cm arasında değiştiği buğday bitkisinin gelişim sürecinin bu aşamasında istatistiki bir fark olmadığı ve aynı grup içinde yer aldıkları görüldü (Şekil 4.12).



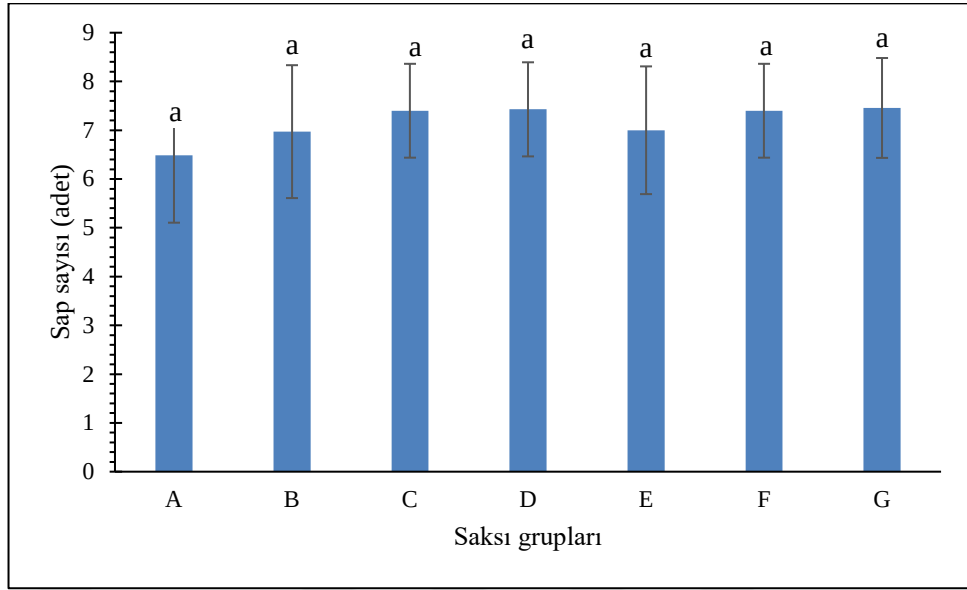
Şekil 4.12: 16.haftada buğday boy uzunlukları (cm).

16.hafta saksı denemesinin tüm grupları fotoğrafları çekilerek görselleştirildi (Şekil 4.13).



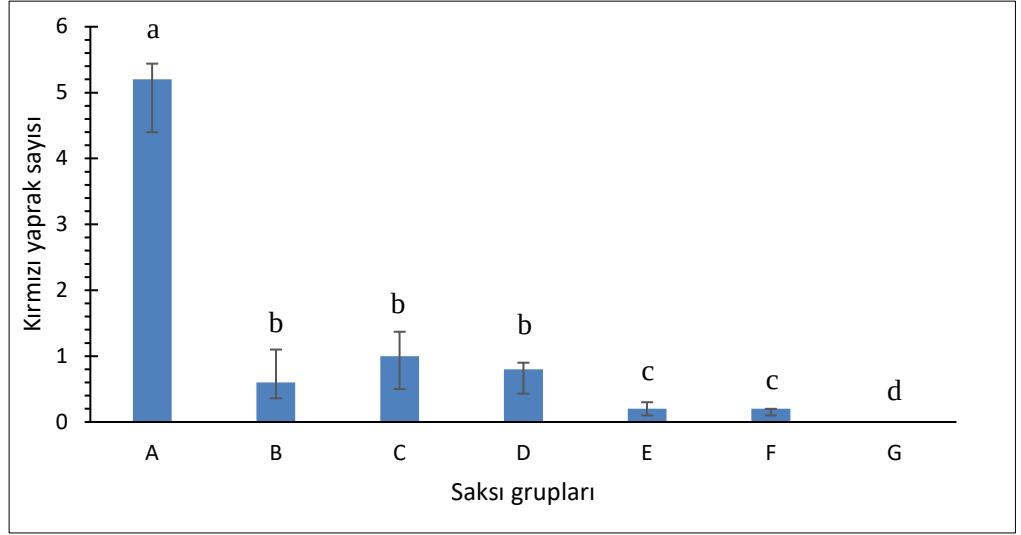
Şekil 4.13: 16.haftaya ait saksı fotoğrafları (Bitkilerin toprak üstü boyları görsellerde daha iyi ayırt edilmeleri için ortalamalarına göre bir çizgi çizilerek fotoğraflara yansıtılmıştır).

20.haftaya gelindiğinde ise 2. sap sayısı ölçümü yapıldı. Elde edilen verilere göre ortalama sap sayıları 7,4 cm ile 6,4 cm arasında değiştiği görüldü ve istatistiksel değerlendirme sonucunda ise yine saksı grupları arasında farklılık gözlenmedi, hepsi aynı grupta yer aldılar (Şekil 4.14).

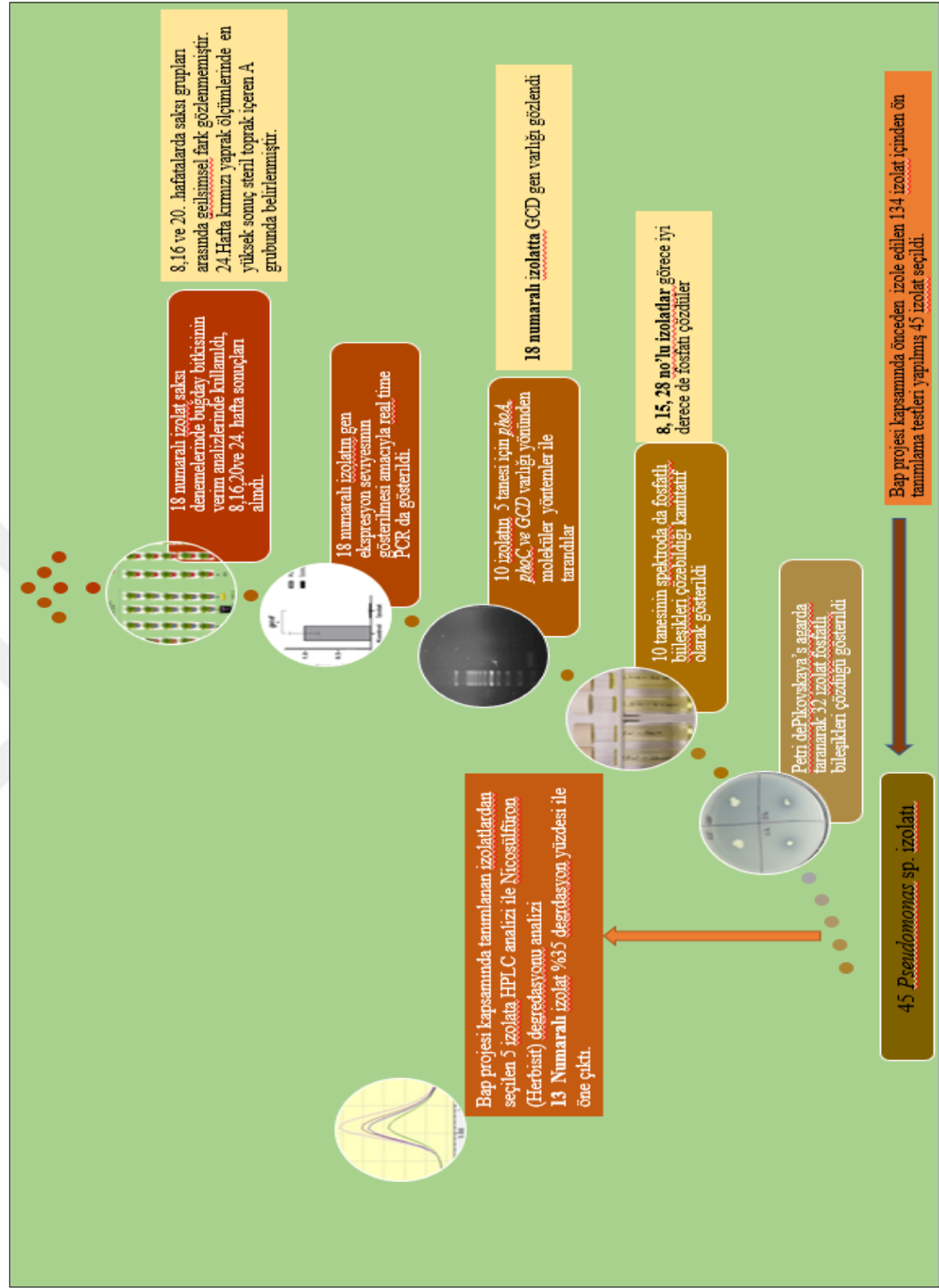


Şekil 4.14: 20.hafta sap sayısı.

Şekil 4.15 incelendiğinde 24.haftada yapılan kırmızı yaprak sayısı ölçümleri sonucunda en fazla kırmızı yaprak sayısına sahip grubun 5,2 adet ortalaması ile steril toprak içeren A grubu (Kontrol 1) olduğu ve diğer deneme gruplarından istatistiksel olarak ayrıştığı açıkça görülmektedir. Bunun yanında sırasıyla 0,6 adet, 1 adet, ve 0,8 adet kırmızı yaprak sayısı ortalaması ile B (%100 DAP+%100 amonyum nitrat-Kontrol 2, C (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+*P.aeruginosa*) ve D (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+18 no'lu izolat) grupları aynı istatistiki grup içerisinde yer aldı. 0,2 adet kırmızı yaprak sayısı ortalaması ile E (%50 DAP+%100 amonyum nitrat) ve F (*Pseudomonas aeruginosa*+%50 DAP+%100 amonyum nitrat) grupları aynı istatistiki grupta yer alırken, hiç kırmızı yaprak sayılmayan G (18 numaralı izolat+%50 DAP+%100 amonyum nitrat) grubu diğer gruplardan ayrıştı.



Şekil 4.15:24.haftaya ait kırmızı yaprak sonuçları.



Şekil 4.16: Tez Özet şeması.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında kullanılan 45 izolat fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre değerlendirildiğinde hepsinin Gram negatif, hareketli, katalaz pozitif, oksidaz pozitif ve 45 izolatın 45'i indol testi sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Hücre morfolojisi bakımından ise tamamının basil formunda olduğu tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa* ön tanımlamasında selektif katı besiyeri olarak kullanılan Cetremide agarda büyütülen 45 izolatın da cetremide dirençli olduğu belirlendi. İzolatlarımız özellikleri bakımından kontrol bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* ile karşılaştırıldığında izolatların tamamının genus seviyesinde *Pseudomonas* sp. olarak değerlendirilmiştir [Gül Şeker, 2021; Palleroni,2015].

Bu tez çalışmasında inorganik fosfat çözebilme yeteneği Ca_3PO_4 içeren Pikovskaya besi yerinde zon oluşumunun taraması ve spektrofotometrik bir yöntem olan VMYA yöntemiyle incelendi. 45 izolata Pikovskaya besiyerinde yapılan inorganik fosfat çözebilme testi sonucunda 45 izolattan 32 tanesinden pozitif sonuç alındı. Hem Petride hemde spektrofotometrik yöntem ile fosfat çözebildiği gösterilen 10 izolat üzerinde fosfat çözünürlüğünden sorumlu genlerin (alkalin fosfataz *phoA*, asit fosfataz *phoC* ve glukonik dehidrojenaz *GCD*) varlığı yönünden tarandı. Glukonik dehidrojenaz özellikle Gram negatif bakterilerde fosfat çözünürlüğü için ana mekanizma olarak kabul edilir, fosfat çözünürlüğü, glikozun zara bağlı glikoz dehidrojenaz *GCD* tarafından glukonik aside doğrudan oksidasyonu ile gerçekleşir *Pseudomonas* sp'de bu genin varlığına dair çalışmalar literatürde mevcuttur [Whang, 2018; Chen, 2015].

Tez kapsamında tasarlanan primerler (Tablo 3.7) ile qPCR yardımı ile 18 numaralı izolatta *gcd* gen varlığı gösterildi. Devamında ilgili genin aktivitesi RT-qPCR ortaya kondu (Şekil 4.10). Kontrole görece daha az gen ifadesi söz konusu olmasına rağmen söz konusu izolatın herbisit indirgeme özelliğine bakıldığında, herbisit indirgemesi pozitif kontrol bakterimiz *P. putida* KT244 ile aynı yüzde oranında (%18,8) indirgeyebildiği görüldü. Bu açıdan bakıldığında saksı denemelerinde davranışlarının görülmesi adına kullanılması da önemlidir.

Organik veya inorganik kirleticilerin parçalanması veya gideriminde etkin olan başta *P. aeruginosa*, *P. acidovorans*, *P. fluorescens* ve *P. putida* olmak üzere pek

çok *Pseudomonas* sp. türü bakteri rapor edilmiştir [Wasi ve ark., 2013]. *P. putida* ve bazı *Pseudomonas*'ların herbisit indirgeme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir [Sarı, 2002; Güngör, 2005]. Bu tez çalışması kapsamında 16S rDNA dizilerinin NCBI veri bankasından elde edilen tanımlama sonucuna göre 13 numaralı izolat *Pseudomonas cremicolorata*, *Pseudomonas parafulva* ve *Pseudomonas putida*'ya %100 benzerlik göstermiştir (Tablo 4.2). Yapılan HPLC ölçümlerinde herbisit indirgediği bilenen *P. putida* KT244 pozitif kontrol olarak kullanıldı. *P. putida* (%18,8)'ya görece daha yüksek seviyede herbisit indirgeme yüzdesine sahip olan en iyi izolat numaralı izolat 13 (%35,22) olarak belirlendi. HPLC ölçümüyle iyi bir herbisit indirgeyici olduğu belirlenen 13 numaralı izolat yapılacak herbisit indirgeme çalışmaları için diğer bakterilere rakip olabilecek nitelikte olup literatüre kazandırılmıştır

Tez kapsamında kullanılan 13 numaralı izolat 16S rDNA dizisi seviyesinde *P. putida*'ya yüksek benzerlik oranlarında (%100) benzese de degradasyon performansı ile ilgili türden ayrılmaktadır. Bu durum bir yandan izolatın diğer iki türden biri olduğunu düşündürse de *P. putida*'nın bir alt türü olduğu da göz önünde bulundurulmaktadır. Ushino vd., (2001) yayınladığı bir çalışmada *P. fulva*'yı 3 yeni türe bölmüş (*P. fulva*, *P. parafulva* ve *P. cremicolorata*) ve elde ettiği dizileri NCBI veribankasında kayıt etmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak bir örneklendirme yapan başka bir makalede ise veribankasına yeni türlere ait olduğu iddiası ile yapılan dizi yüklemelerinde, geçmişe yönelik güncellemelerin gerektiği gibi yapılamaması nedeniyle bazı karşılıklıkların ortaya çıktığı ifade edilmektedir [Federhen, 2014]. Bu nedenle veribankasındaki dizilerle yapılan karşılaştırmalarda tıpkı bu tez çalışmasında yapılan BLAST analiz sonuçlarında olduğu gibi, sisteme yüklenen diziler farklı türlerle de %100 benzerlik gösterebilmektedir. Bu oluşan kafa karışıklığının ortadan kaldırılarak, tür tayininin yapılabilmesi bazı ek testleri ve moleküler analizleri gerektirmektedir. Bu nedenle de detaylı tanımlama için genetik belirteçlerin ve varsa biyokimyasal testlerin araştırılarak nihai tanımlanmanın yapılması önemlidir.

Yukarıda seçilme gerekçeleri detaylı olarak ifade edilen 18 numaralı izolat çalışmanın son aşamasında saksı denemelerinde buğday bitkisi ile bir araya getirildi, Bu amaçla kullanılan deneme toprağının analiz sonuçlarına (Tablo 4.4) göre deneme toprağı; nötr, ülkemiz için belirlenen EC sınır aralık değerleri ile uyumlu, tuzsus, tınlı, iyi seviyede organik madde içeriğine sahip, fazla kireçli, çok yüksek fosfor

içeriğine sahip, toplam azot oranı bakımından azotça fakir bir toprak olduğu tespit edildi.

Fosfat çözübilme yeteneği için seçilmiş 18 no'lu izolatın deneme bitkisi olan makarnalık buğday Emin Bey çeşidinin gelişimine etkilerinin tespit edilmesinde, tasarlanan saksı denemelerinin kurgusu ve özellikle organik maddece zengin olan deney toprağının steril edilerek mikroorganizmalardan arındırılmış hale getirilmesi ulaşmak istenen hedefler açısından önemlidir. Böylelikle inokülasyon sonucu mikroorganizmaların toprakta varolan organik içeriği ve sonradan ilave edilen farklı oranlardaki kimyasal gübre katkısının [DAP (%50 ve %100) ve Amonyum nitrat] bitki için uygun hale getirerek bitki gelişimine katkısının takibi için bir başlangıç noktası olmuştur. Kullanılan deney toprağındaki organik ve inorganik madde içeriği her zaman bitkinin kullanabileceği formda olmayabilir. Bu aşamada toprağın kimyasal potansiyelini hareketlendiren mikroroganizmaların katkısı yadsınamaz [Sokol et al.,2022]. Kullanılan deney toprağı aynı zamanda CaCO_3 açısından zengin yani kireçli bir topraktır. Üstelik toprağın pH'sının nötr (6,9) değerlerde olması asidik ortamda yıkımı gerçekleştirilen çözünmeyen fosfatlı bileşiklerin (örn; Ca_3PO_4) kullanılan bakteri izolatı ve kontrol bakterisi tarafından indirgenerek bitkinin kullanabileceği hale getirmesi için belli bir zaman geçmesinin gerekliliğine işaret etmektedir.

Bu noktada, tez çalışması kapsamında elde edilen bitki büyümesine ve gelişimine yönelik gözlem ve ölçümlerden elde edilen sonuçlar toprak analizinden elde edilen sonuçları ve öngörülleri destekler nitelikte olmuştur. Fosfat eksikliğinde boy kısalığının bir semptom olması göz önünde bulundurularak örneğin; bitki boyu, sap sayısı ve sap kalınlıkları açısından 8. ve 16. haftada yani bitki gelişiminin ilk safhalarında istatistiksel farklar ortaya çıkmamış kontrole görece bitki gelişimi tüm saksı denemelerinde yakın seyretmiştir (Şekil 4.11, 4.12 ve 4.14).

Aynı zamanda kullanılan toprak organik madde açısından zengin olsa da azot bakımından da fakir olması nedeniyle DAP ve Amonyum nitrat gübresi ile saksılarımızın desteklenmesi seçilmiş izolatın kontrollerine görece etkinliğinin ortaya konmasında oldukça önemlidir. Böylece toprak içeriği ve kimyasal hareketliliği bozulmadan belki de toprağın yorgun ve içerik bakımından fakirleşmesi mikroorganizmalar aracılığı ile önlenmiş olacaktır. Tez çalışmasının bu bölümünde verilen kimyasal gübrelerin (DAP açısından %100 ve %50'lik reçetelerde) kullanımının ve verime yansıtılmasının sonuçları takip edilmiştir (Şekil 3.4). Aşağıda

tarif edildiği üzere azaltılan (%50) DAP oranlarında fosfat eksikliğinde ortaya çıkan kırmızı yaprak oluşumu dikkate değer bir şekilde azalmıştır.

Fosfat çözebilme yeteneği olan bakterilerin bitkilere verim artışını gösteren literatür çalışmaları mevcuttur. Cattelan ve diğerleri 1999'da ki çalışmalarında beş rızosferik izolattan fosfat çözebilme yeteneği olan ikisinin fosfat alımı konusunda soya gelişimi üzerinde olumlu etki gösterdiğini belirlemişlerdir [Cattelan, 1999].

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada fosfat çözebilme kabiliyetine sahip bakterilerin mısır, marul, pirinç gibi önemli kültür bitkilerinde verimde artış sağladığı gösterildi [Chabot,1996; Rodríguez et al., 1996; Murty and Ladha 1988]. Literatürde fosfat çözebilme yeteneği olan *Pseudomonas*'ın bitki gelişimi üzerine etkisi incelendiğinde Özyılmaz ve diğerlerinin (2012) yaptığı deney sonucunda *Pseudomonas* sp ile kaplanan tohumların verticillum hastalığına daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. *Pseudomonas putida*'nın bitki kök ve gövde gelişimini teşvik ettiği ve kanolada P alımını arttırdığı belirlenmiştir [Lifshitz et al., 1987]. Sonuçları detaylı değerlendirmek gerekirse, fosfor yetersizliğinde buğday bitkisi kısa kalır ve az kardeşlenir, sap incelik, kök gelişmesi zayıf olur, yapraklar küçülür ve koyu yeşil renk alır, olgunlaşma gecikir. Bazı buğday çeşitlerinde kırmızı veya pembe yaprak ayası rengi fosfor noksanlığı için bariz semptomdur [Mızrak, 2018]. Bu bilgiler ışığında 8 haftalık (boy, sap sayısı ve gövde kalınlığı) ve 16 haftalık (boy) ölçüm sonuçları incelendiğinde gelişimin ilk haftalarında kardeşlenme dönemine karşılık gelen dönemde ekim yapılan tüm saksı deneme gruplarında (A, B, C, D, E, F, G) gelişim açısından istatistiki olarak önemli bir farklılık göstermemiştir. İnokülasyon yapılan ve yapılmayan saksı grupları arasında fark gözlenmemesi gelişimin ilk 8 ve 16. haftalarında toprağın mevcut içeriğinin bitkiye gelişimini destekleyebildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Fosfat gibi mobil(hareketli) elementler ise bitki tarafından kökten alınarak yaprağa taşındığı için yaşlı yapraklar fosfatça fakir kalır bu yüzden fosfat eksikliği bitkilerde geç evrelerde yaşlı yapraklarda gözlemlenir. Bitkilerde fosfat eksikliği yapraklarda önce kırmızı yaprak ayası oluşumuna (antosiyon birikimi), kök zayıflığına, cansızlığına ve saçak köklerin oluşmamasına veya yumuşamasına neden olur. Sürgünler kısalır, incelik ve ipliksi görünüm kazanır, gövde boğum aralarında daralmalar gözlenir. Fosfat hücre bölünmesini arttırdığı için verimi de arttıracak ve ileri ki evrelerde en çok kök ve tane miktarında artış sağlayacaktır [Bolat ve Kara, 2017].

Buğdayda fosfat eksikliğinin en yaygın belirtilerinden biri yukarıda tarif edildiği gibi kırmızı yaprak oluşumudur. Oluşan kırmızı yaprak sayısı erken evrelerde fark edilemeyebilir. 24. haftada tüm deneme saksıları gözden geçirilmiş ve fosfor eksikliğine bağlı olarak gelişen kırmızı pembe yaprak ayası oluşumu gözlenmiştir. Bu sebeple kırmızı ayalı yapraklar sayılarak kaydedilmiştir. Deney planı gereği fosfor eksikliğinin kendini açıkça göstermesini beklediğimiz Kontrol 1 (steril toprak) saksı denemelerinde oluşan kırmızı yaprak sayısı tıpkı beklendiği gibi çıkmış ve en yüksek ortalama ile 5,2 adet sayılmıştır (Şekil 4.15). Sırasıyla 0,6 adet, 1 adet, ve 0,8 adet kırmızı yaprak sayısı ortalaması ile B (%100 DAP+%100 amonyum nitrat- Kontrol 2, C (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+*P.aeruginosa*) ve D (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+18 no'lu izolat) grupları aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır. İlgili grupların kontrole görece oldukça düşük sayıda kırmızı yaprak ayası ortalamasına sahip oldukları görülmektedir. İlginç bir şekilde %100 Amonyum nitratın yanında %50 DAP verilen E ve F grupları beklendiği gibi fosfor eksikliğine işaret eden ancak kontrole görece oldukça düşük kırmızı ayalı yaprak sayısı ortalaması ile benzer sonuçlar göstermişlerdir. G grubu ise aynı gübre oranlarına rağmen 18 numaralı izolatın uygulandığı saksı grubu olup 24. Haftaya gelindiğinde bile bitkide fosfor eksikliğine işaret eden söz konusu belirtileri göstermemiştir. Bitki gelişiminin ilerleyen aşamalarında, gözlemlere devam etmek kaydıyla, deney planlaması sırasında öngörüldüğü gibi izolatların *in vitro* koşullarda ve toprakta davranışları birbirinden farklı olabileceğini destekleyen sonuçların elde edildiği söylenebilir.

Sonuçların değerlendirilmesi ve Gelecek öngörülleri

Yapılan deneyler sonucunda fosfat çözebilme yeteneği için seçilen izolat buğdayla bir araya getirildi. İlgili izolatın buğday verimi üzerindeki nihai sonuçlarını tartışmak için buğday bitkisinin hasadını beklemek gerektiği açıktır. Ancak, tezin savunulması sürecine denemelerin bu bölümü yetiştirilememiştir. Tezin yayına dönüştürülmesi sürecinde ilgili verilerin elde edilerek literatüre kazandırılması planlanmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan HPLC analiz sonuçları oldukça dikkat çekicidir. Dünyada çevre kirliliği önemli bir sorun teşkil etmektedir. Literatürdeki çalışmalarda *Pseudomonas putida*'nın bioremediasyon yeteneğine dair çalışmalar mevcuttur [Gong, 2008; Parakhia, 2014].

Yapılan HPLC deneyinde bioremediasyon yeteneği bilinen *Pseudomonas putida* KT244 pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrolden daha fazla herbisit indirgeyebilmesi açısından 13 numaralı izolat herbisit indirgeme konusuna dair ilerleyen çalışmalarda kullanılabilir.

Tez alışması herbisit indirgeme ve fosfat çözebilme kabiliyetine sahip izolatların eldesi ile ileride çalışılması planlanan model bitki bakteri ilişkisini konu edinen çalışmaların yapılması için gerekli çalışma materyalini sağlayacaktır. Bu bağlamda incelediğimiz izolatların gelecekte tarlada ikinci üründe oluşan zararları en aza indirmek üzere ve bitkiye fosfat sağlayarak verimi arttırmak bağlamında preparatların hazırlamasında kullanılması yönündeki planlamalara yardımcı olacağına. Böylece kalıntı problemi ve ürün zararlarının en aza indirgenmesi, kültür bitkisinde verimde artış mümkün olabilecektir. Ayrıca bu tez çalışmasının yine ülkemiz kaynaklı literatürlerde sülfonilüre grubu herbisitlerin biyolojik olarak mikroorganizmalar ile parçalanmalarını ve bakterilerin fosfat çözebilme yeteneğini konu alacak daha sonraki araştırmalar için örnek olması ve bir eksikliği doldurması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd-Alla, M. H., (1994), "Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovarviceae phosphatases", *Biol. Fertil Soils* 18, 216–218.
- Akgün M., (2015), "Yerel mısır (*Zea mays* L.) genotiplerinin fosfor kullanım etkinliğinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alori E. T., Glick B. R., Babalola O. O., (2017), "Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture", *Front Microbiol.*, 8, 971.
- Andersen S. M., Hertz P. B., Holst T., Bossi R., Jacobsen, C. S., (2001), "Mineralisation studies of ¹⁴C-labelled metsulfuron-methyl, tribenuron-methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron-methyl in one Danish soil and groundwater sediment profile", *Chemosphere*, 45(6-7), 775-782.
- Aydoğan M. N., Algur Ö. F., Özdemir M., (2013), "Trikalsiyum fosfat çözebilen bazı bakteri ve mikrofungusların izolasyonu ve karakterizasyonu", *ADYUTAYAM Dergisi*, 1(1), 11-20.
- Başaran M. S., Serim A. T., (2010), "herbisitlerin toprakta parçalanması", *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 24(2), 54-61.
- Beever R. E., Burns D. J. V., (1986), "Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi, *Advances in Botanical Research*", 8:127-219.
- Belimov A. A., Kojemiakov P. A. and Chuvarliyeva, C. V., (1995), "Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphatesolubilizing bacteria", *Plant Soil* 173, 29–37.
- Bellinder R. R., Gummesson G., Karlsson C., (1994), "Percentage driven government mandates for pesticide reduction the Swedish model", *Weed Technology* 8, 350–359.
- Berker E., (1972), "Fosfat Kimyası, Kullanılış Alanları ve Super fosfat", *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 11(4), 59-62.
- Bishop M.L., Chang A.C., Lee, R.W.K., (1994), "Enzymatic mineralization of organic phosphorus in a volcanic soil in Chile", *Soil Sci.* 157, 238–243.
- Blair A. M., Martin T. D., (1988), "A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides", *Pesticide Science*, 22(3), 195-219.
- Bolat İ., Ömer, K. A. R. A. (2017), "Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları", *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(1), 218-228.

Boldt T. S., Jacobsen C. S., (1998), "Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil FEMS Microbiology Letters", 161(1), 29-35.

Boschin G., D'Agostina A., Antonioni C., Locati D., Arnoldi A., (2007), "Hydrolytic degradation of azimsulfuron, a sulfonylurea herbicide", Chemosphere, 68(7), 1312-1317.

Bolton E. E., Hepworth H. M., (1972), "Tillage Research in Turkey, Proceedings of Regional Wheat Workshop Beirut", Lebanon.

Boschin G., D'Agostina A., Arnoldi A., Marotta E., Zanardini E., Negri M., Sorlini C., (2003), "Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger* in laboratory conditions", Journal of Environmental Science and Health, Part B, 38(6), 737-746.

Brown H. M., (1990), "Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides", Pesticide Science, 29, 263-281.

Burnet M., Hodgson B., (1991), "Differential effects of the sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and sulfometuron methyl on microorganisms", Archives of microbiology, 155(6), 521-525.

Chabot R., Antoun H., Cescas M. P., (1996), "Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli", Plant and soil, 184(2), 311-321.

Chen W., Yang F., Zhang L., Wang, J., (2016), "Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources", Geomicrobiology Journal, 33(10), 870-877.

Çakmakçı R., (2005), "Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı", Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36(1), 97-107.

Çakmakçı R., Kantar F., Algur Ö. F., (1999), "Sugar beet and barley yield in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var *Phosphaticum* inoculation", J Plant Nutr Soil Sci., 162, 437-442.

Çakmakçı R., Kantar F., Şahin F., (2001), "Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley", J Plant Nutr Soil Sci., 164, 527-531.

Cattelan A. J., Hartel P. G., Fuhrmann J. J., (1999), "Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth", Soil Sci. Soc. Am J, 63, 1670-1680.

Curran W. S., Knake E. L., Liebl R. A., (1991), "Corn (*Zea mays*) injury following use of clomazone, chlorimuron, imazaquin, and imazethapyr" Weed Technology, 5(3), 539-544.

Çelikten M., Bozkurt İ. A., (2018), “Buğday Kök Bölgesinden İzole Edilen Bakterilerin Buğday Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi”, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(1), 33-48.

Data M., Banish S., Gupta R. K., (1982), “Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland”, Plant Soil, 69, 365–373.

De Freitas J. R., Banerjee M. R., Germida J. J., (1997), “Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.)”, Biol. Fertil Soils, 24, 358-364.

Dejordjevic M. A., Gabriel D.W., Rolfe B. G., (1987), “Rhizobium-the refined parasite of legumes”, Annu. Rev Phytopathology, 25, 145-168.

Dindar E., Şağban F. O. T., Başkaya H. S., (2010), “Kirlenmiş toprakların biyoremediasyon ile Islahı”, Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering, 15(2).

Doğan M. N., Ünay A., Boz Ö., Albay F., (2004), “Determination of optimum weed control timing in maize (*Zea mays* L.)”, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 28(5), 349-354.

Donald C. M., (1963), “Advances in Agronomy in Competition among crop and pasture plants”, 15, NewYork, Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60397-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60397-1)

Döbereiner J., (1997), “Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions”, Soil Biol. Biochem, 29, 771-774.

Duffy M. J., Hanafey M. K., Linn D. M., Russell M. H., Peter C. J., (1987), “Predicting sulfonyleurea herbicide behavior under field conditions”, In Proceedings of the British Crop Protection Conference-Weeds.

El-Sawah M. M. A., Hauka F. I. A., El-Rafey H. H., (1993), “Study on some enzymes cleaving phosphorus from organic substrates in soil”, J Agric. Sci. 18, 2775–2785.

Euzéby J. P., (1997), “List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet”, Int. J Syst. Bacteriol. Microbiology Society. 47 (2): 590–2.

Federhen S., (2015), “Type material in the NCBI Taxonomy Database”, Nucleic Acids Research, 43(D1), D1086-D1098.

Fernández H. M., Carpena A. O., Cadakia L. C., (1984), “Evaluacion de la solubilizacion del fósforo mineral en suelos calizos por *Bacillus cereus*”, Ensayos de invernadero, Anal Edaf Agrobiol 43, 235–245.

Ferreira M. C. B., Fernandes M. S., Döberner J., (1987), "Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants", *Biol. And Ferti. of Soils*, 4: 47-53.

Gadd G., (1999), "Fungal production of citric and oxalic acid: Importance of metal specification, physiology and biogeochemical processes", *Adv. Microb Physiol* 41, 47-92.

Garcia C., Fernandez T., Costa F., Cerranti B., Masciandaro G., (1992), "Kinetics of phosphatase activity in organic wastes", *Soil Biol. Biochem* 25, 361–365.

Gaur A. C., Ostwal K. P., (1972), "Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop", *Indian J Exp. Biol.* 10, 393–394.

Geçit H. H., Çiftçi C. Y., Emeklier Y., İkinci Karakaya S. Ü., Adak M. S., Kolsarıcı Ö., Ekiz H., Altınok S., Sancak C., Sevimay C. S., Kendir H., (2009), "Tarla Bitkileri", Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 1569, Ders Kitabı: 521

Goldstein A. H., (1995), "Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria", *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185-193.

Glick B. R., Changping L., Sibdas G., Dumbroff E. B., (1997), "Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2", *Soil Biol. Biochem* 29, 1233–1239.

Güneş A., Turan M., Güllüce M., Şahin F., Karaman M. R., (2013), "Farklı bakteri uygulamalarının kaya fosfatının çözünürlüğü üzerine etkisi", *Toprak Su Dergisi*, 2(1), 377-393.

Gyaneshwar P., Kumar G. N., Parekh L. J., Poole P. S., (2002), "Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants" *Plant and Soil*, 245, 83-93.

Hadler A. K., Mishra A. K., Bhattacharyya P., Chakrabartty P. K., (1990), "Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*", *J Gen Appl. Microbiol* 36, 81–92.

Hanif M. K., Hameed S., Imran A., Naqqash T., Shahid M., Van Elsas J. D., (2015), "Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.)", *Front, Microbiol*, 6,583.

Harder P. A., O'Keefe D. P., Romesser J. A., Leto K. J., Omer C. A., (1991), "Isolation and characterization of *Streptomyces griseolus* deletion mutants affected in cytochrome P-450-mediated herbicide metabolism", *Molecular and General Genetics MGG*, 227(2), 238-244.

Hang B. J., Hong Q., Xie X. T., Huang X., Wang C. H., He J., Li S. P., (2012), "SulE, a sulfonamide herbicide de-esterification esterase from *Hansschlegelia zhihuaiae* S113", *Applied and environmental microbiology*, 78(6), 1962-1968.

Hanif M. K., Hameed S., Imran A., Naqqash T., Shahid M and Van Elsas J. D., (2015), "Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.)", *Front, Microbiol*, 6,583.

Hecht-Buchholz C., (1998), "The apoplast- habitat of endophytic dinitrogen - fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonlegumious plants", *Z. Pflanzenernähr, Bodenk*, 161, 509-520.

Huang X., He J., Sun J., Pan J., Sun X., Li S., (2007), "Isolation and characterization of a metsulfuron-methyl degrading bacterium *Methylopila* sp. S113", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3), 152-158.

Hynes R. K., Leung G. C., Hirkala D. L., Nelson L. M., (2008), "Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil and chickpea grown in Western Canada", *Can. J. Microbiol.*, 54, 248-258.

Ismail B. S., Goh K. M., Kader J., (1996), "Effects of metsulfuron-methyl on microbial biomass and populations in soils", *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 31(5), 987-999.

Ismail B. S., Lee H. J., (1995), "Persistence of metsulfuron-methyl in two soils", *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 30(4), 485-497.

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.

Johri A. K., Dua M., Tuteja D., Saxena R., Saxena D. M., Lal R., (1996), "Genetic manipulations of microorganisms for the degradation of hexachlorocyclohexane", *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 69-84.

Jones D. L., Darrah P. R., (1994), "Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere", *Plant Soil* 166, 247-257.

Joshi M. M., Brown H. M., Romesser J. A., (1985), "Degradation of chlorsulfuron by soil microorganisms", *Weed Science*, 33(6), 888-893.

Kadioğlu A., (1998), *Trabzon, Bitki Fizyolojisi*, s. 82-83.

Kloepper J. W., Leong J., Teintze M., Scrotch M. N., (1980), "Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria", *Nature* 286, 885-886.

Kirchner M. J., Wollum A. G., King L. D., (1993), "Soil microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems", *Soil Sci. Soc. Amer J* 57, 1289–1295.

Kremer R. J., (1994), "Determination of soil phosphatase activity using a microplate method", *Comun Soil Sci Plant Anal* 25, 319–325

Kucey R. M. N., Janzen H. H., Legett M. E., (1989), "Microbially mediated increases in plant available phosphorus", *Adv Agron* 42, 199-228.

Kucharski J., Ciecko Z., Niewolak T., Niklewska-Larska T., (1996), "Activity of microorganisms in soils of different agricultural usefulness complexes fertilized with mineral nitrogen", *Acta Acad Agric. Tech.-Olst.* 62, 25–35.

Kumar V., Narula N., (1999), "Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*", *Biol. Fert. Soils*, 28, 301-305.

Kurtoğlu C., Ceylan F., Cömertpay S., Akyol İ., (2020). "Glifosat uygulanmış topraktan izole edilen bakterilerin herbisit degradasyon potansiyellerinin belirlenmesi", *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 13(2), 102-108.

Leyval C., Berthelin J., (1989), "Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth", *Plant and Soil*, 117(1), 103-110.

Li Y., Cockburn W., Kilpatrick J., Whitlam G. C., (1999), "Selection of rabbit single-chain Fv fragments against the herbicide atrazine using a new phage display system", *Food and agricultural immunology*, 11(1), 5-17.

Li Y., Liu X., Hao T., Chen S., (2017), "Colonization and maize growth promotion induced by phosphate solubilizing bacterial isolates", *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1253.

Lifshitz R., Kloepper J. W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E. M., Zaleska I., (1987), "Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions", *Can J Microbiol* 33, 390–395.

Lu P., Jin L., Liang B., Zhang J., Li S., Feng Z., Huang X., (2011), "Study of biochemical pathway and enzyme involved in metsulfuron-methyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil", *Current microbiology*, 62(6), 1718-1725.

Madigan M; Martinko J., (2005), "Brock Biology of Microorganisms (11th ed.)" Prentice Hall.

Mårtensson A. M., Nilsson Å. K., (1989), "Effects of chlorsulfuron on *Rhizobium* grown in pure culture and in symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*)", *Weed Science*, 37(3), 445-450.

Malkomes H. P., (1989), "Influence of the herbicide Gropper (metsulfuron-ester) on microbial activities in soil under laboratory conditions", *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* (Germany, FR).

Mårtensson A. M., (1992), "Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes", *Soil Biology and biochemistry*, 24(5), 435-445.

Matsumura F., Benzet H. J., Patil K. C., (1976), "Factors affecting microbial metabolism of γ -BHC", *Journal of Pesticide Science*, 1, 3-8.

Mayak S., Tirosh T., Glick B.R., (2004), "Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress", *Plant physiol, Biochem*, 42,565-572.

Mengüç Ç., (2018), "Herbisit Toksisitesi ve Yabancı Otlara Karşı Alternatif Mücadele Stratejileri", *Turkish Journal of Weed Science*.

Mızrak G., "Topraktan Sofraya BUĞDAY", Gürbüz Mızrak.

Murty M. G., Ladha J. K., (1988), "Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions", *Plant Soil* 108, 281-285.

Nautiyal C. S., Bhadauria S., Kumar P., Lal H., Mondal R., Verma D., (2000), "Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils" *FEMS Microb Lett* 182, 291-296.

Nelieu S., Perreau F., Guichon R., Seguin F., Bry C., Einhorn J., (2005), "Monitoring and effects of nicosulfuron in aquatic mesocosms: development of a simple analytical procedure and evidence for low toxicity to phytoplankton communities", *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(1), 108-114.

O'Keefe D. P., Gibson K. J., Emptage M. H., Lenstra R., Romesser J. A., Litle P. J., Omer C. A., (1991), "Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*", *Biochemistry*, 30(2), 447-455.

Omer C. A., Lenstra R., Litle P. J., Dean C., Tepperman J. M., Leto K. J., O'Keefe, D. P., (1990), "Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*", *Journal of bacteriology*, 172(6), 3335-3345.

Oppong F. K., Saga G. R., (1992), "Degradation of triasulfuron in soil under laboratory conditions", *Weed research*, 32(3), 167-173.

O'Sullivan J., Thomas R. J., (2001), "Injury and yield effects on crops grown in CGA 152005-treated soil", *Weed technology*, 15(3), 594-597.

Öztürk A., Çağlar O., Sahin F., (2003), "Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization", *J Plant Nutr Soil Sci* 166, 1-5.

Özyılmaz Ü., Benlioğlu K., (2012), “Fosfat çözen bakterilerin pamuk bitkisinin gelişimine ve *Verticillium* Solgunluğuna etkileri”, Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 3(1), 47-62.

Pal S. S., (1999), “Interaction of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops”, Plant Soil, 213, 221-230

Palleroni N. J., (2015), “*Pseudomonas*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria”, 1-1.

Peña A., Busquets A., Gomila M., Mulet M., Gomila R. M., Reddy T. B. K., Lalucat, J., (2016), “High quality draft genome sequences of *Pseudomonas fulva* DSM 17717T, *Pseudomonas parafulva* DSM 17004T and *Pseudomonas cremoricolorata* DSM 17059T type strains”, Standards in genomic sciences, 11(1), 1-10.

Perucci P., Dumontet S., Bufo S. A., Mazzatura A., Casucci C., (2000), “Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass” Biology and Fertility of Soils, 32(1), 17-23.

Perkins J. H., Patterson B. R., (1997), “Pests, pesticides and the environment: a historical perspective on the prospects for pesticide reduction”, Techniques for reducing pesticide use, 13-33.

Pingale S. S., Virkar P. S., (2013), “Study of influence of phosphate dissolving micro-organisms on yield and phosphate uptake by crops” Eur. J. Exp. Biol, 3, 191-193.

Pons N., Barriuso E., (1998), “Fate of metsulfuron-methyl in soils in relation to pedo-climatic conditions” Pesticide Science, 53(4), 311-323.

Ram R. L., Maji C., Bindroo B. B., (2013), “Role of PGPR in different crops-an overview”, Indian J. Seric, 52(1):1-13

Ray T. B., (1984), “Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants”, Plant physiology, 75(3), 827-831.

Reddy M. S., Kumar S., Babita K., Reddy M. S., (2002), “Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*”, Bioresource Technology, 84: 187-189.

Regitano J. B., Koskinen W. C., (2008), “Characterization of nicosulfuron availability in aged soils” Journal of agricultural and food chemistry, 56(14), 5801-5805.

Regitano J. B., Koskinen W. C., Sadowsky M. J., (2006), “Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine” Journal of agricultural and food chemistry, 54(4), 1373-1379.

Richardson A. E., Simpson R. J., (2011), "Soil microorganisms mediating phosphorus availability", *Plant Physiol.* 156:989–96.

Rodríguez H., Goire I., Rodríguez M., (1996), "Caracterización de cepas de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo", *Rev ICIDCA* 30, 47– 54.

Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y., (2006), "Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287:15–21.

Rost T. L., (1984), "The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical treatments on root tip meristems. III. Chlorsulfuron", *Journal of Plant Growth Regulation*, 3(1), 51-63.

Sarapatka B., Kraskova M., (1997), "Interactions between phosphatase activity and soil characteristics from some locations in the Czech Republic", *Rostlinna-Vyroba* 43, 415–419.

Sarmah A. K., Sabadie J., (2002), "Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review", *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6253-6265.

Sarı M., (2002), "Dicamba ((3,6-dichloro-2-metoxibenzoic acid) Degradation By *Pseudomonas maltophilia*", *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, Cilt 23 Sayı 1, pp 73-80.

Schilling G., Gransee A., Deubel A., Ležovič G., Ruppel S., (1998), "Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere", *Z Pflanzenernähr Bodenk* 161, 465-478.

Skrary F. A., Cameron D. C., (1998), "Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for D-alpha-glycerphosphate", *Arch Biochem Biophys* 349, 27–35.

Sikkema P. H., Kramer C., Vyn J. D., Kells J. J., Hillger D. E., Soltani N., (2007), "Control of *Muhlenbergia frondosa* (wirestem muhly) with post-emergence sulfonylurea herbicides in maize (*Zea mays*)", *Crop protection*, 26(10), 1585-1588.

Sokol N. W., Slessarev E., Marschmann G. L., Nicolas, A., Blazewicz, S. J., Brodie, E. L., Pett-Ridge, J., (2022), "Life and death in the soil microbiome: how ecological processes influence biogeochemistry", *Nature Reviews Microbiology*, 1-16.

Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M., (2004), "Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet" *Crit, Rev, Microbiol*, 30, 205-240.

Song I. J., Bae T. W., Ganesan M., Kim J. I., Lee H. Y., Song P. S., (2013), "Transgenic herbicide-resistant turfgrasses", *Herbicides-current research and case studies in use*.

Sönmez İ., Kaplan M., Sönmez S., (2008), “Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri” *Derim*, 25(2), 24-34.

Sözeri S., Solmaz A., (1996), “Effects of root, leaf and flower extracts of Oriental Lakspur (*Consolida orientalis* (Gay) Schröd.) on germination and seedling growth of wheat”, *The Journal of Turkish Phytopathology* 25 (3) 89– 92.

Sukhovitskaya L. A., (1998), “Survival rates and growth-stimulating effects of *Bacillus megatherium* and *Arobacterium radiobacter* strains introduced into soil”, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 34, 81-83.

Şeker M. G., “Sülfonilüre Grubu Herbisit Kullanılan Tekirdağ Tarım Alanlarından İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Karakterizasyonu”, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 36(1), 10-19.

Tarafdar J. C., Junk A., (1987), “Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus”, *Biol. Fertil. Soil* 3, 199–204.

Thaller M. C., Berlutti F., Schippa S., Iori P., Passariello C., Rossolini G.M., (1995), “Terogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass Polipeptides in members of the family Enterobacteriaceae”, *Int. J Syst. Bacteriol* 4, 255–261.

Thompson D. G., Solomon K. R., Wojtaszek B. F., Edginton A. N., Stephenson G. R., Relyea R. A., (2006), “The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities:[with response]”, *Ecological applications*, 16(5), 2022-2034.

Tiwari V. N., Lehri L. K., Pathak A. N., (1989), “Effect of inoculating crops with phosphomicrobes”, *Exp. Agric.*, 25, 47-50.

Tiryaki O., Canhilal R., Horuz S., (2010), “Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(2), 154-169.

Torun H., Uygur S., (2012), “Herbisit uygulamalarının bazı kültür bitkileri üzerinde oluşturduğu zararlanmalar”, *Türkiye Herboloji Dergisi*, 15(1-2), 1-12.

Vassileva M., Azcon R., Barea J. M., Vassilev N., (2000), “Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*”, *Proc. Bioch*, 35 693-697.

Wada H., Senoo K., Takai Y., (1989), “Rapid degradation of gamma-HCH in upland soil after multiple applications”, *Soil Science and Plant Nutrition*, 35, 71–77.

Walker A., Welch S. J., (1989), “The relative movement and persistence in soil of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl and triasulfuron”, *Weed Research*, 29(5), 375-383.

Wang H., Lin K., Hou Z., Richardson B., Gan J., (2010), "Sorption of the herbicide terbuthylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars", Journal of Soils and Sediments, 10(2), 283-289.

Wani P. A., Khan M. S., (2010), "Bacillus species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils", Food Chem, Toxicol, 48, 3262-3267.

Ahemad M., Khan M. S., (2012), "Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain", Acta Physiol, Plant, 34, 245-254.

Wasi S., Tabrez S., Ahmad M., (2011), "Suitability of Immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 Strain for Remediation of Phenols, Heavy Metals, and Pesticides from Water, Air, and Soil Pollution", 220 (1-4), 8899.

Wasi S., Tabrez S., Ahmad M., (2013), "Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review", Environmental Monitoring and Assessment, 185, 8147-8155.

Web1, (2021), http://www.tarimkutuphanesi.com/yabanci_otlara_karsi_kulturel_mucadele_uzm_isl_am_emrah_suer_erdal_ates, (Erişim Tarihi: 3/01/2021).

Web 2, (2020), <https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/>

Web 3, (2022), <https://www.toros.com.tr/tr/fosforlu-gubreler>, (Erişim Tarihi: 3/01/2022).

Web 4, (2022), <https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile>, (erişim tarihi:2/02/2022).

Web 5, (2022), <https://www.google.com/search?q=Triticum+aestivum+L.%2C+Triticum+durum+L> (erişim tarihi:2/02/2022).

Web 6,(2022), <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes>, (erişim tarihi:2/02/2022).

Web7, (2022), <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM>, (erişim tarihi:1/02/2022)

Web2, (2020), <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/TOPRAKSU>, (erişim tarihi:3/02/2022)

Whitelaw M. A., Harden T. J., Helyar K. R., (1999), "Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*", Soil Biol Biochem 31, 655-665.

Xu H., Murray M., McLachlan A. J., (2009), "Influence of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of sulfonylurea drugs", Current drug metabolism, 10(6), 643-658.

Xu J. G., Johnson R. L., (1995)., “Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oilcontaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea”, *Plant Soil* 173, 3–10.

Yu L., Qin W., Li S. F. Y., (2005), “Ionic liquids as additives for separation of benzoic acid and chlorophenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis”, *Analytica chimica acta*, 547(2), 165-171.

Zanardini E., Arnoldi A., Boschini G., D’Agostina A., Negri M., Sorlini C., (2002), “Microbial degradation of sulfonylurea herbicides: chlorsulfuron and metsulfuron-methyl”, In *Microbiology of composting* (pp. 309-319), Springer, Berlin, Heidelberg.

Zhang H., Mu W., Hou Z., Wu X., Zhao W., Zhang X., Zhang S., (2012), “Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80”, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(3), 153-160.

Zhou Q. Y., Liu W. P., Zhang Y. S., Liu K. K., (2008), “Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides”, *Pesticide Biochemistry Physiology*, 89, 89–96.

USDA (2017), “World Agricultural Production” <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/>

Waller G. R., (1989), “Allelochemical action of some natural products, in *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and insect Pheromones and Allomones*”, Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No:9, Taipei, 129-153s..

Wasi S., Tabrez S., Ahmad M., (2013), “Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review”, *Environmental monitoring and assessment*, 185(10), 8147-8155.

Williams M. C., (1984), *Poisonous plants part 3, Poisonous alkaloids in plants*, *Weeds Today*, 15: 2, 1–2, (Weed abstr. 33 (6),1755)

Zimdahl R. L., (2007), “*Fundamentals of weed science*”, Elsevier Academic Press, ISBN: 978-0-12-372518-9.

ÖZGEÇMİŞ

İlkay İLHAN, 2014 yılında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamladıktan sonra 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.



EKLER

Ek A: İzolata Ait 16S Rdna Bölgesinin NCBI Veri Tabanındaki Analiz Sonuçları



JMKGY0013-Alignment 44 İlkaynı - Not Defteri
 Dosya Düzen Biçim Görünüm Yardım
 RID: JMKGY0013
 Job Title: Consensus 2018-A-105-A-04/44
 Program: BLASTN
 Database: rRNA typestrains/16S ribosomal RNA 16S ribosomal RNA (bacteria and Archaea type strains)
 Query #1: Consensus 44 Query ID: 1c1|Query_14241 Length: 1400

Sequences producing significant alignments:

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Query Score	E Value	Per. Ident	Len	Acc.	Accession
Pseudomonas baetica strain a390 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	674054	2507	2507	100%	0.0	98.57	1496	NR_116899.1
Pseudomonas koreensis strain Ps 9-14 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	198620	2479	2479	100%	0.0	98.21	1455	NR_025228.1
Pseudomonas moraviensis strain 184 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	321662	2473	2473	100%	0.0	98.15	1524	NR_043314.1
Pseudomonas umsongensis strain Ps 3-10 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	198618	2473	2473	100%	0.0	98.14	1455	NR_025227.1
Pseudomonas helmanticensis strain OHM1 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1471301	2468	2468	100%	0.0	98.07	1472	NR_126220.1
Pseudomonas reinekei strain MT1 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	77258	2466	2466	100%	0.0	97.93	1515	NR_024918.1
Pseudomonas vancoverensis strain Dha-51 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	395598	2453	2453	100%	0.0	97.86	1492	NR_042541.1
Pseudomonas vancouverensis strain Dha-51 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	395600	2429	2429	100%	0.0	97.36	1459	NR_024543.1
Pseudomonas lutea strain OK2 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	243924	2418	2418	100%	0.0	97.43	1531	NR_091031.1
Pseudomonas migulae strain CIP 109470 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	78543	2407	2407	100%	0.0	97.29	1462	NR_114221.1
Pseudomonas agarici strain ATCC 25941 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	48677	2403	2403	100%	0.0	97.21	1453	NR_024927.1
Pseudomonas macleod strain R410 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	109538	2401	2401	100%	0.0	97.22	1454	NR_115608.1
Pseudomonas fluorescens strain 105 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	395599	2401	2401	100%	0.0	96.79	1459	NR_137215.1
Pseudomonas graminis strain DSM 11363 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	136227	2401	2401	100%	0.0	97.22	1531	NR_029063.1
Pseudomonas taiwanensis DSM 21285 strain BCR 17751 16S...	Pseudomonas ...	NA	1292830	2396	2396	100%	0.0	97.14	1469	NR_026395.1
Pseudomonas montellii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	70759	2396	2396	100%	0.0	97.14	1517	NR_116172.1
Pseudomonas agarici strain 71A 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	48677	2394	2394	100%	0.0	97.14	1491	NR_024918.1
Pseudomonas montellii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2392	2392	100%	0.0	97.07	1462	NR_114224.1
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 strain AJ 2129 16...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2390	2390	100%	0.0	97.07	1484	NR_104280.1
Pseudomonas fulva strain NBRC 16637 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2386	2386	100%	0.0	97.00	1462	NR_113857.1
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	70775	2385	2385	100%	0.0	97.00	1462	NR_113855.1
Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	384676	2385	2385	100%	0.0	97.00	1526	NR_114226.1
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1387231	2385	2385	100%	0.0	97.00	1526	NR_102854.1
Pseudomonas aestus strain CMAA1215 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	2895231	2385	2385	100%	0.0	97.00	1526	NR_169429.1
Pseudomonas qingdaonensis strain J13 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	78327	2385	2385	100%	0.0	97.00	1513	NR_024924.1
Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	70775	2385	2385	100%	0.0	97.00	1498	NR_024662.1
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2381	2381	100%	0.0	96.93	1462	NR_113856.1
Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2381	2381	100%	0.0	96.93	1462	NR_113651.1

Şekil A1.1: 18 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.