

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIM ARAZİLERİNDEN ELDE EDİLEN PSEUDOMONAS
SP. İLE OLUŞTURULAN YENİ BİR
BİYOFORMÜLASYONUN BUĞDAY BÜYÜMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MİHRİBAN AYDOĞAN GEMİCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIM ARAZİLERİNDEN ELDE EDİLEN
PSEUDOMONAS SP. İLE OLUŞTURULAN
YENİ BİR BİYOFORMÜLASYONUN
BUĞDAY BÜYÜMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MİHRİBAN AYDOĞAN GEMİCİ
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 EFFECTS OF A
NEW BIOFORMULATION CREATED WITH
PSEUDOMONAS SP. ISOLATED FROM
AGRICULTURAL LANDS ON GROWTH OF
THE WHEAT**

MİHRİBAN AYDOĞAN GEMİCİ
**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 30/06/2022 tarih ve 2022/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Mihriban AYDOĞAN GEMİCİ'nin tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Dr.Öğr.Üyesi Mine GÜL ŞEKER

ÜYE

: Prof.Dr.Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Dr. Öğr.Üyesi Veysel SÜZERER

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, BAP projesi (2018-A-105-04) kapsamında izole edilmiş 134 *Pseudomonas* sp. izolatı kullanıldı. 134 *Pseudomonas* izolatı mikrobiyal bir biyoformülasyon tasarlanması için aday olabilecek ve bitki büyümesini teşvik eden izolatların belirlenmesi amacıyla fizyolojik ve biyokimyasal testler ile tarandı. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde 134 izolat içerisinde 49 izolatın azot fiksasyonu yeteneğine sahip olduğu, 34 izolatın pozitif kontrole görece daha yüksek miktarda İndol Asetik Asit üretim yeteneğine sahip olduğu, 123 izolatın siderofor üretim yeteneğine sahip olduğu, 116 izolatın fosfat indirgeme yeteneğine sahip olduğu belirlendi. Yapılan testler ile bitki büyümesini teşvik edebilecek en iyi özelliklere sahip olduğu belirlenen 3 adet izolat ile biyoformülasyon hazırlandı.

En güçlü PGPB adayı olarak seçilen 35, 104 ve 129 numaralı izolatlar ile hazırlanan biyoformülasyon buğday bitkisi ile saksıda bir araya getirilerek makarnalık buğday bitkisinin (*Triticum durum* L., Eminbey) büyümesi üzerindeki etkileri 21. haftada incelendi. Biyoformülasyon ile birlikte farklı oranlarda DAP ve Amonyum nitrat gübreleri ile desteklenen topraklarda yetiştirilen buğday bitkileri kontrole görece kıyaslandığında bitki boyu, gövde kalınlığı, sarı yaprak sayısı ve kardeş sayıları açısından buğday bitkilerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas* sp., PGPB, makarnalık buğday, sürdürülebilir tarım.

SUMMARY

In this thesis, 134 *Pseudomonas* sp isolates isolated within the scope of the BAP project (2018-A-105-04) were used. 134 *Pseudomonas* isolates were screened by physiological and biochemical tests to identify isolates that could be candidates for designing a microbial bioformulation and promote plant growth. When the physiological and biochemical test results were evaluated, it was determined that 49 isolates out of 134 isolates had nitrogen fixation ability, 34 isolates had a higher amount of Indole Acetic Acid production ability compared to the positive control, 123 isolates had siderophore production ability, and 116 isolates had phosphate reduction ability. . Bioformulation was prepared with 3 isolates, which were determined to have the best properties to promote plant growth.

The bioformulation prepared with the isolates 35, 104 and 129 selected as the strongest PGPB candidate was combined with the wheat plant in the pot and its effects on the growth of the durum wheat plant (*Triticum durum* L., Eminbey) were examined at the 21st week. When wheat plants grown in soils supplemented with bioformulation with DAP and ammonium nitrate fertilizers at different rates were compared to the control, it was observed that there was a statistically significant difference in wheat plants in terms of plant height, stem thickness, number of yellow leaves and number of siblings.

Keywords: *Pseudomonas* sp., PGPB, durum wheat, sustainable agriculture .

TEŞEKKÜR

Kıymetli danışmanım Dr. Öğr üyesi Mine GÜL ŞEKER'e verdiği destek ve yüksek lisans tez çalışmam boyunca gösterdiği anlayış için çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak hiçbir konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye

Tez çalışmam boyunca karşılaştığım her zorlukta yanımda olan, bilgi, tecrübe, dostluğuyla hep yolumu aydınlatan, değerli laboratuvar arkadaşlarım Seray TOPÇU, Tuğçe ARIT, İlkay İLHAN, Sena ACET, Nida ARSLAN, tez çalışmalarımı yürütürken yardımlarını esirgemeyen bitki biyoteknolojisi grubu üyelerine çok teşekkür ederim.

Çalıştığım süre zarfı boyunca gerek bazı deneylerimi iş yerimde yapmama olanak sağlayan gerekse okulum ile ilgili her konuda izin vererek her konuda anlayış gösteren Kazlıçeşme Ar-Ge Merkezindeki kıymetli yöneticilerim ve değerli çalışma arkadaşlarıma

Yüksek lisans eğitimim sırasında veya hayatın her alanında, her konuda verdikleri destekleri ve dostlukları ile yanımda olan sevgili arkadaşlarım Açelya YAŞAR ve Büşra Nur ÇEVİK'e

Dünyalara değişmeyeceğim, her zaman desteklerini, sevgilerini ve güvenlerini arkamda hissettiğim, yeri geldiğinde deli dolu neşemi yeri geldiğinde de kahrımı çeken ve bu konuma gelmemi sağlayan canım babam Esat Aydoğan'a, canım annem Sadet Aydoğan'a, canım kardeşlerim Tolgahan ve Melike Aydoğan'a ve ailemin bir parçası olan canım dostlarıma hayatımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim. Her zaman yanımda olup, başarılarımı destekleyen ve ufkumu genişletmemi sağlayan, duyduğu güvenle, sabırla destek vererek bana çok şanslı hissettiren canım eşim Mertcan Gemici'ye varlığı için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Tarımda Gübre Kullanımı	5
2.1.1. Kimyasal Gübrelerin Kullanımı ve etkileri	7
2.1.2. Mikrobiyal Gübrelerin Kullanımı ve Etkileri	8
2.2. Mikrobiyal Gübre Bileşeni Olarak Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler (PGPB)	9
2.2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakterilerin Özellikleri	10
2.3. Buğday Bitkisi	11
2.3.1. Eminbey (Triticum Durum L.) Makarnalık Buğday Çeşidi	13
3. MATERYAL VE METOTLAR	18
3.1. Materyaller	18
3.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	18
3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal ve Toprak	18
3.1.3. Kimyasallar ve Markaları	18
3.1.4. Kitler	19
3.1.5. Besiyerleri	19
3.1.6. Ayıraçlar	21
3.1.7. DNA Moleküler Belirteci	21
3.1.8. Solüsyonlar	22

3.1.9. Cihazlar	23
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Azot Fiksasyonu Testi	25
3.2.2. İndol-3 Asetik Asit Oluşumu Testi	25
3.2.3. Siderofor Üretimi Testi	26
3.2.4. Fosfat Çözünürlüğü Testi	27
3.2.5. Biyofilm Oluşumu	27
3.2.6. Cross Streak Plate	28
3.2.7. Biyoformülasyonun Biki Büyümesini Teşvik Etme Özelliklerinin İncelenmesi	29
3.2.8. Pseudomonas İzolatları ile Biyoformülasyon Hazırlanması	29
3.2.9. Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlama	30
3.2.10. Saksı Deneyleri	33
3.2.11. İstatiksel Analiz	35
4. SONUÇLAR	36
4.1. Pseudomonas İzolatlarının Azot Fiksasyonu Yeteneklerinin Belirlenmesi	36
4.2. Pseudomonas İzolatlarının İndol-3 Asetik Asit Üretimi Yeteneklerinin Belirlenmesi	38
4.3. Pseudomonas İzolatlarının Siderofor Üretimi Yeteneklerinin Belirlenmesi	40
4.4. Fosfat Çözünürlüğü Testi Sonuçları	42
4.5. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi	46
4.6. Bakterilerin Üst Üste Çizilerek Birlikte Yaşayabilme Durumlarının Değerlendirilmesi	47
4.7. Biyoformülasyonun Bitki Büyümesini Teşvik Etme Özelliklerinin in vitro Değerlendirilmesi	48
4.8. Pseudomonas İzolatları İle Konsorsiyumun Hazırlanması	50
4.9. Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlama	51
4.9.1. DNA Miktarının Belirlenmesi	51
4.9.2. PCR İle 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması ve Analizi	51
4.10. Pseudomonas İzolatları ile Hazırlanan Biyoformülasyonun Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin	53

İncelenmesi Sonuçları	
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKÇA	67
ÖZGEÇMİŞ	74
EKLER	75



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
--	--------------------

μl	: Mikrolitre
G	: Gram
μg	: Mikrogram
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
%	: Yüzde
ATP	: Adenozin trifosfat
<i>B. cereus</i>	: <i>Bacillus cereus</i>
Ca_3PO_4	: Kalsiyum trifosfat
CFU	: Colony forming unit
cm	: santimetre
DAP	: Diamonyum fosfat
dH_2O	: Distile su
ddH_2O	: Double distile su
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilen diamidin tetraasetik asit
$\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$	: Ferric chloride hexahydrate
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
HCl	: Hidroklorik Asit
HDTMA	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
KH_2PO_4	: Monopotasyum fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
LB	: Luria Bertani
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH_4Cl	: Amonyum klorür
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>

PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
pH : Power of hydrogen
rpm : rounds per minute



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bitki köklerinde bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin yeri.	9
2.2: PGPR'lerin bitki büyümesi üzerindeki direkt ve dolaylı etki mekanizmaları.	11
2.3: Üretimi yapılan buğday türleri.	16
2.4: Buğdayın gelişim evrelerini gösteren Zadoks skalası.	16
3.1: A-Hibrigen 100 bp DNA Ladder Plus (1x50 µg), MG-LDR-100P.	22
3.2: IAA üretimi miktarını belirlemek için hazırlanan standartlar.	26
3.3: IAA standart eğrisi.	26
3.4: Cross-streak plate bakterilerin çizim planı.	29
3.5: A) 50 ml LB Broth içeren boş kontrolü, B) Biyoformülasyonun LB broth içinde 35, 104 ve 129 numaralı izolatların karışık kültürü.	30
3.6: Saksı deney planı.	36
4.1: A) +Kontrol <i>P.aeruginosa</i> B) -Kontrol <i>E.coli</i> .	37
4.2: İzolatların <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile karşılaştırılarak yapılan azot fikse etme seviyeleri.	38
4.3: Siderofor üretimi testi (+) Kontrol; <i>P.aeruginosa</i> , (-) Kontrol; <i>S.aureus</i>	41
4.4: Siderofor üretme yeteneğine sahip olan bazı izolat örnekleri.	42
4.5: (+) Kontrol; <i>P.aeruginosa</i> ve (-) Kontrol; <i>B.cereus</i> B) Bazı izolatlara ait Pikovskaya agar Petri sonuçları.	44
4.6: Cross-streak yöntemi ile izolatların üst üste çizilmesi sonucu oluşan petri görüntüleri.	49
4.7: Seçilen izolatların bitki büyümesini teşvik etme özelliklerinin in vitro değerlendirilmesi için hazırlanan petrilerin görüntüleri.	50
4.8: A) 35 numaralı izolatın B) 104 numaralı izolatın C) 129 numaralı izolatın Gram boyama görüntüleri.	52
4.9: 1) Marker; GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0314; 2) 35 numaralı izolat; 3) 104 numaralı izolat; 4) 129 numaralı izolata ait 16 S rDNA dizisi jel görüntüsü.	53

4.10:	A) Nemli kağıtlar arasında bekletilen vernalizasyon işlemi uygulanan tohumlar B) Tohum vernalizasyonu sırasında çimlenen tohumların gö	54
4.11:	Buğdayların 21. haftadaki bitki boyu karşılaştırmaları.	55
4.12:	Buğdayların 21. haftadaki gövde kalınlığı karşılaştırmaları	56
4.13:	Buğdayların 21. haftadaki kardeş sayıları karşılaştırmaları.	57
4.14:	Buğdayların 21. haftadaki sarı yaprak sayısı karşılaştırmaları.	58
4.15:	21 haftalık buğday bitkileri.	59



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kullanılan kimyasallar ve markaları.	18
3.2: Kullanılan kitler.	19
3.3: Kullanılan ayırıcılar.	21
3.4: Kullanılan çözelti .	22
3.5: Kullanılan cihazlar.	23
3.6: 16S rDNA tanımlamasında kullanılan genlere ait primer bilgileri.	31
3.7: PZR reaksiyonu için kullanılan malzemelerin isim, hacim ve final konsantrasyonları.	32
3.8: PZR döngü programı.	32
3.9: Toprak analizi sonuçları.	34
3.10: Saksı deneyi grupları ve ilave edilen gübre oranları.	35
4.1: <i>Pseudomonas</i> izolatlarının Azot fiksasyonu testi sonuçları.	38
4.2: İzolatların IAA üretim miktarları.	40
4.3: <i>Pseudomonas</i> izolatlarının siderofor üretimi testi sonuçları.	42
4.4: <i>Pseudomonas</i> izolatlarının fosfat çözme testi sonuçları.	44
4.5: Seçilen 44 izolatın toplu test sonuçları.	45
4.6: Seçilen 44 adet izolat ile yapılan biyofilm testi sonuçları.	47
4.7: Nanodrop ölçüm sonuçları.	52
4.8: İzolatların NCBI veri tabanındaki erişim numaraları ve benzetildikleri <i>Pseudomonas</i> türlerine benzerlik oranları.	54

1. GİRİŞ

Dünya genelinde nüfus artışına bağlı olarak artan gıda talebi ve hızla değişen iklim koşulları nedeniyle gelecek nesiller için gıda güvenliğini sağlayacak teknolojik çözümler aranmaktadır [Shelar et al., 2021]. Tarımda üretimi artırmak için farklı kimyasal gübreler kullanılmaktadır. Fakat yoğun kimyasal gübre kullanımı suların kirlenmesine, besin maddelerinin kaybolmasına ve toprak yapısının bozulmasına sebep olur [Chojnacka et al., 2020]. Kimyasal gübrelerin bu olumsuz etkilerini azaltabilmek ve ekosisteme verilen zararı onarmak için yeşil devrime katkıda bulunabilecek yeni, tutarlı ve sürdürülebilir tarımsal üretim yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır [Shelar et al., 2021]. Bu noktada teknolojik yöntemler ile sürdürülen modern tarım, küresel gıda ve enerji güvenliği için tehdit oluşturan birçok zorlukla karşı karşıyadır. Birçok bitki büyümesini teşvik edici (plant growth promoting- PGP) özelliğe sahip olan bitki ile ilişkili mikroorganizmalar, bu zorlukların çözülmesine yardımcı olabilecek güçlü bir potansiyele sahiptir [Ke et al., 2021].

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin bir bölümü tıpkı bitkinin kendi iç dokularında yaşayan endofitler veya doku / organların yüzeyinde yaşayan epifit mikroorganizmalar gibi bitki rizosferinde kolonize olarak yaşarlar. Bu mikroorganizma çeşitleri genelde serbest yaşayan toprak bakterileridir ve bunlar bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) olarak adlandırılır. Genel tanımı ile bakterilerin yanında bitki büyümesini mikorizalar gibi bazı mantar türleri vb. mikroorganizmalar da teşvik etmektedir. Bitkilerin rizosfer (kökün hemen yakın çevresi) bölgesinde yoğunlaşan bu bakterilere bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) denir. Bu bakteriler bitki büyümesini teşvik etme ve çeşitli bitki hastalık etkenlerine karşı koruma sağlayarak bitki-patojen ilişkilerini kontrol etme özelliklerine sahiptir. PGPR'ler, *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter salinestris*, *Burkholderia phytofirmans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas floescens*, *Pseudomonas stutzella* gibi mikroorganizmaların dahil olduğu geniş bir taksonomik çeşitliliğe sahiptir [Kumar et al., 2021]. PGPB'ler, bitkilerin abiyotik (sıcaklık, kuraklık, tuz stresi, toprak pH'sı vb.) ve biyotik (patojen bakteri, mantar, nematod vb.) streslere karşı direncini artırma özelliğine sahiptir [Raio and Puopolo, 2021]. Ek olarak PGPB'ler, bitkilerin antioksidan aktivitelerini ve fenolik içeriklerini

de arttırır. Böylelikle ekonomik anlamda önemli kültür bitkilerinin besin içeriklerini de iyileştirme yeteneğine sahiptir [Khatoon et al., 2020].

Bitki köklerinin etrafında kolonize olan PGP bakteri konsantrasyonu, genellikle toprağın tamamında bulunan bakteri konsantrasyonundan çok daha yüksektir. Bunun nedeni, bitki köklerinden bakteriler için uygun besin kaynağı olarak kullanılan şekerler, organik asitler ve amino asitler gibi küçük moleküllerin fazlaca salınmasıdır. PGPB'ler, doğrudan ve dolaylı etki mekanizmaları ile bitki büyümesini teşvik edebilmektedir. Bitki büyümesini doğrudan destekleyen mekanizmalara bir oksin hormonu çeşidi olan İndol Asetik Asit (IAA) üretimi, sitokinin, giberellin, azot fiksasyonu, fosfor çözünürlüğü ve bakteriyel sideroforların üretimi örnek verilebilir [Olanrewaju et al., 2017]. Dolaylı mekanizmalara ise bitki için patojenik aktivitenin baskılanması ve organik kirleticilerin mineralizasyonu yoluyla toprak sağlığını koruyarak bitkilere fayda sağlanmak örnek olarak verilebilir [Kumar et al., 2021]. Ek olarak; ACC deaminaz, antibiyotikler, hücre duvarını parçalayan enzimler, hidrojen siyanür, uyarılmış sistemik direnç (Induced systemic resistance –ISR) de dolaylı mekanizmalar arasında yer alır [Olanrewaju et al., 2017].

Yeryüzünde yarım milyondan fazla bitki türü olmasına rağmen bu bitki türleri arasından tahıllar ve baklagiller gıda ve beslenme güvenliği için en önemlileridir. Tahıllar, dünya çapında tüketilen kaloringin çoğunu üretirler. Dünyada yetiştirilen başlıca tahıllara örnek olarak pirinç (*Oryza sativa*), mısır (*Zea mays*), buğday (*Triticum aestivum*), arpa (*Hordeum vulgare*) verilebilir [Thudi et al., 2021]. Tüm bu tahıllar arasında buğday, insan gıdasının önemli bir protein kaynağı olarak hizmet eder [Han et al., 2019]. Buğday; ekmek çeşitlerinde, bulgur, erişte, makarna, kuskus, atıştırmalık gıdalar, poğaç, kahvaltılık gevrekler, simit, nişasta, çerez gıdalar gibi pek çok gıdanın üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır [Gül vd., 2021].

Dünyada artan nüfusun beslenmesi, değişen isteklerin karşılanması için mısır, pirinç, buğday, soya gibi temel tarla ürünlerinin günümüz koşullarındaki üretime oranla ikiye katlanması gerekmektedir. Bu durumu çözebilmenin yolu ise temel gıda üretimini sürdürülebilir ve yenilikçi modern tarım uygulamaları ile artırmaktan geçmektedir [Atar, 2017]. Bu noktada, PGPB'ler, tarımsal üretim ve toprak yapısının korunmasında kimyasalların kullanımına karşı çevre dostu bir alternatif olup, girdi maliyetlerini azaltması bakımından tarımsal mücadelede ekonomik ve sürdürülebilir çözümler sağlayabilen bir potansiyel barındırmaktadır [Ke et al., 2021; Santoyo et al., 2021].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışması ile, 2018-A-105-A-04 numaralı GTÜ BAP projesi kapsamında tarım alanlarından izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının yeni ve orjinal bir biyoformülasyonun oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla 134 *Pseudomonas* sp. izolatı arasından azotu iyi derecede fikse etme yeteneğine sahip, İndol-3 asetik asit üretimi iyi olan, siderofor üretim yeteneği yüksek, iyi derecede fosfat çözebilme yeteneğine ve iyi derecede biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *Pseudomonas* sp. izolatlarının seçilmesi hedeflenmiştir. Ardından, biyoformülasyonu oluşturmak için bir arada yaşayabilen ve bir network (iletişim ağı) oluşturabilen ve beraberken PGPB yeteneklerini de koruyabilen 3 adet izolatın belirlenerek seçilmesi amaçlanmıştır. Belirlenen 3 *Pseudomonas* sp.'den oluşan yeni biyoformülasyonunun makarnalık buğday olarak ekilen ve yerli bir çeşidimiz olan Emin Bey (*Triticum durum* L.)'nin verim parametrelerine [bitki boyu, başak boyu, bayrak yaprak uzunluğu, ana başak dane sayısı, ana başak tane verimi (gram) ve başaktaki başakçık sayısı (adet)] etkileri belirlenerek ilgili çeşidin üzerindeki fizyolojik sonuçları araştırılmıştır.

Bu tez çalışması ile son dönemlerde sürdürülebilir tarımda giderek artan mikrobiyal gübre formülasyonları için aday olabilecek PGPB özelliğine sahip *Pseudomonas* bakterileri tespit edilerek literatüre kazandırılması amaçlanmıştır. Yukarıda belirtilen proje kapsamında izole edilen ve özgün/ daha önce üzerine bu yönde araştırma yapılmamış olan yerel *Pseudomonas* izolatlarının PGPR özellikleri ortaya konmuş ve mikrobiyal gübre formülasyonlarının oluşturulmasına aday bakteriler olduğu belirlenmiştir. Böylelikle günümüzde hem tarım alanları hem de çevrede büyük zararlara yol açan kimyasal gübrelerin kullanımını hafifletmeye yönelik alternatif mikrobiyal gübre formülasyonlarının oluşturulabilmesi açısından katkı sağlamıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar yaklaşık 9,73 milyar 77 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir. Bu nüfus artışına bağlı olarak gıda üretimi ihtiyacının artmasını tetikleyeceği öngörülmektedir. 2050 yılına kadar artan nüfusa bağlı olarak öngörülen küresel gıda taleplerini karşılamak için, mevcut olan bitkisel üretimin iki katına çıkması ve yılda yaklaşık % 2,4'lük bir büyüme oranı ile ilerlemesi gerekecektir [Silva et al., 2022]. Tarım, ülke nüfusunun beslenmesi, milli gelire ve istihdama katkısı, sanayi sektörüne hammadde sağlaması, sanayiye sermaye aktarması, ihracata doğrudan ve dolaylı olarak katkısı, biyolojik çeşitlilikle ekolojik dengeye katkıları nedeniyle tüm dünyada vazgeçilmez olan, gıda üretiminin güvenliği nedeniyle de ülke ekonomilerini oluşturan, temel ve stratejik bir sektör niteliğindedir [Doğan ve ark., 2015]. Tarım, insanlar için gıda ve giysinin ana kaynağı (pamuk, keten vs.) olmasının yanı sıra ekonomik kalkınma ve sosyal ilerlemenin de öncüsüdür. Sanayi devriminden önce, tarımsal üretimdeki gelişmeler toprak verimliliğinin kendi kendini iyileştirmesi veya hayvan gübresi kullanımı sayesinde gerçekleşiyordu. Bu nedenle tarımın gelişimi yavaştı. 19. yüzyılın ortalarına gelindiğinde, kimyasal gübreler keşfedildi. Kimyasal gübrelerin tarımda kullanılmaya başlaması ile, tarımsal sisteme dışarıdan malzeme akışını gerçekleştirdi ve enerji döngüsünün içeriği genişledi. Böylelikle tarımsal üretim büyük ölçüde genişledi. Bu dönemlerde kimyasal gübrelerin uygulanması toprak verimliliğini artırmış ve insanlığın hayatta kalmasına ve gelişmesine büyük katkı sağlamıştır [Guo and Wang, 2021]. Sürekli artan dünya nüfusuna paralel olarak gıdaya olan ihtiyaç da her geçen gün artmaktadır. Bununla birlikte, modern tarım için en büyük zorluk, bitki verimliliğini çevresel açıdan sürdürülebilir bir şekilde artırmaktır. Gelişmekte olan ülkelerde ve özellikle kaynakları kısıtlı çiftçiler arasında tarımsal üretim verimini kısıtlayan önemli bir neden de toprağın yetersizliğidir [Singana et al., 2006; Silva et al., 2022]. Bu noktada devreye giren kimyasal gübreler, hem toprak verimliliğini hem de verimi artırmak için sıkça kullanılan temel verim artırıcılarıdır. Günümüzde modern tarımın temel bir bileşeni olan kimyasal gübreler, optimum ürün gelişimi için toprakta ve/veya diğer mevcut organik kaynaklarda bulunmayan besin maddelerini sağlarlar [Kumar et al., 2016; Singana et al., 2006]. Kimyasal gübrelerin verim artırıcı olarak çok fazla ve bilinçsiz kullanımı ürün verimini artırsa da toprak yapısının (pH ve asidite –redox potansiyelinin değişmesi vb. açısından) bozulmasına

neden olarak insan ve çevre sağlığı, tarımsal üretimin geleceği açısından ciddi tehdit oluşturmaktadır [Gautam et al., 2021; Silva et al., 2022]. Bu alanlarda verimlilik yeniden sağlanmadığı takdirde, çiftçiler gelişmiş gıda çeşitliliği bakımından ve daha verimli kültürel uygulamalardan yararlı sonuçlar elde edemeyecektir [Singana et al., 2006]. Bu bağlamda, bitkiler tarafından toprakta bulunan bitki büyümesi için yararlı besin emilimini iyileştirecek ve kimyasal gübre kullanımını azaltacak teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır [Silva et al., 2022].

Tarımda kimyasal gübre kullanımının yanı sıra verimi olumsuz etkileyen en önemli etkenlerden diğeri de biyotik ve abiyotik streslerdir. Biyotik ve abiyotik stresler bitki büyümesini, gelişmesini, ürün verimini ve ürünlerin biyokütle üretimini olumsuz etkilemektedir [Chaudhary et al., 2012]. Bu noktada bitki büyümesini teşvik eden ve PGPB olarak adlandırılan bakteriler, biyotik ve abiyotik stres kaynaklı etkileri en aza indirerek, geleneksel tarım uygulamalarına yenilikçi bir alternatif olarak sürdürülebilir ve çevre dostu tarımsal üretim sistemlerinde kullanılabilirler [Hashem et al., 2019]. PGPB'lerin baskın cinsleri arasında *Pseudomonas* ve *Bacillus* sp. yer almaktadır. PGPB'lerin bitki rizosferinde uygulanması, benzersiz özellikleri, çeşitliliği ve bitkilerle olan ilişkileri nedeniyle bitki streslerini hafifletmek için kullanılabilir. Böylelikle PGPB'ler dolaylı olarak da bitkilerin stres koşullarını dengeleyerek ürüne dayalı verimin artmasına destek olabilirler [Ali et al., 2014].

2.1. Tarımda Gübre Kullanımı

Gübreler bitkilerin büyümesi ve daha iyi beslenebilmesi için gerekli maddeleri bitkilere sunan, toprağın bitkiler için fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri açısından verimli olabilmesi için toprağa eklenen doğal veya yapay maddelerdir. Gübreler genellikle fosfat, nitrat, amonyum ve potasyum tuzlarını içerirler [Katip, 2020]. Bitkiler, optimal büyüme ve üretimleri için makro ve mikro besinlere ihtiyaç duyarlar. Bitkiler için topraktan yararlanabileceği besin maddesi miktarını ve kullanılabilirliğini arttırmak amacıyla, bitkiye gerekli makro ve mikro besinleri sağlayan kimyasal gübreler kullanılır. Dünya nüfusunun hızla artmasıyla birlikte kimyasal gübre kullanımı ve dolayısıyla çevre kirliliği olasılığı büyük ölçüde artmıştır. Gübrenin aşırı kullanımının olumsuz etkileri arasında sucul ekosistemlerin sızması, yüzey akışı, emisyonu ve ötrofikasyonu yer almaktadır. Bu nedenle, bitkinin besin

gereksinimlerini doğru şekilde belirleyebilmek ve yeterli ölçüde karşılamak için ve çevre kirliliği riskini en aza indirmek için kimyasal gübrelemenin kullanımını optimize etmek önemlidir [Miransari, 2011]. Gübreleme yapmadan önce toprakta mevcut bulunan besin elementi miktarının bilinmesi doğru dengeli bir gübre uygulaması için oldukça önemli kritik bir noktadır. Bilinçli gübre uygulamaları aynı zamanda bitki besin elementlerinin kullanım etkinliğinin artırılması, çevresel risklerin ve ekonomik kayıpların azaltılması açısından da oldukça gereklidir [Karaşahin, 2012]. Aksi taktirde sentetik kimyasal gübrelerin tarımda, bilinçsiz ve aşırı kullanılmasıyla birlikte günümüzdeki tarım uygulamalarından elde edilen tarımsal ürünlerin insan sağlığı açısından potansiyel riskleri olduğu açıktır [Vejan et al., 2016].

Sürdürülebilir tarım için toprağın dinamik doğası çok önemlidir [Gouda et al., 2018]. Günümüz koşullarında sürdürülebilir tarımın amacı, sağlıklı bitkilerin dünya üzerindeki artan nüfus için güvenli gıda kaynaklarını sunması ve bu güvenli gıdaları sağlarken uygulanan tarım uygulamalarının da çevre üzerindeki olumsuz etkilerini en aza indirecek uygulamaların hayata geçirilmesidir [Svircev et al., 2018].

Hem bitki zararlıları ve hastalıkları ile başa çıkmak için hem de bilinçsiz tarım uygulamalarının olumsuz etkilerini en aza indirgeyerek tarım ve bahçe bitkilerinin verimli ve sürdürülebilir üretiminde yararlı mikroorganizmaların kullanımı son dönemlerde oldukça ilgi çekmektedir [Meraklı ve Memon, 2020]. Bitki büyümesi için yararlı bakteriler, funguslar ve diğer organizmalar; tarım zararlıları ve kimyasal gübrelerin neden olduğu olumsuz sonuçlarla mücadele etmede biyolojik yöntemler içerisinde mikrobiyal gübre ve biyopestisitler dünyada en çok kullanılan biyolojik çözümlerdir [Avan ve Kotan, 2021]. Bitkisel üretimde çoklu fonksiyonel ve PGP özelliklerine sahip fonksiyonel bakteri suşlarının kullanılması, sürdürülebilir tarımsal verimi destekler. Bu durum aynı zamanda kimyasal gübre uygulamasına oranla maliyeti en aza indirmek için iyi bir seçenek sunar [Tang et al., 2020]. Giderek artan nüfusun gıda ihtiyacını karşılayabilmek; ileri tarım teknolojilerinin yaygınlaştırılması, tarım alanlarının daha etkin ve bilinçli kullanımı, genetik çalışmalar, sulama ve dengeli gübreleme ile birlikte verim artışı sağlayarak mümkün olacaktır [Karaşahin, 2012]. Bu nedenle, mikroorganizmaların uygun miktarlarda ve birbirleri ile topluluk oluşturabilenlerinin bir araya getirilmesi ile elde edilen mikrobiyal gübreler, tarımsal verimliliğin sürdürülmesinde ve çevre sağlığının korunmasında kimyasal gübre girdilerini azaltma potansiyeline sahiptir. Ayrıca mikrobiyal gübrelerin kullanımı hem kolaydır hem de kimyasal gübrelere görece maliyetleri daha düşüktür. Mikrobiyal

gübreler, bitkilerin topraktan kökleri sayesinde daha iyi besin almasını, daha fazla büyüme hormonu üretimini ve daha yüksek miktarda ve kaliteli üretimine yol açan faydalı fitokimyasalları salgılayan azot fiksasyonu yapan fosfat ve kükürt çözen bakteriler ve fosfatlı bileşikleri çözebilen bakteriler gibi bir veya daha fazla faydalı bakteri içerir [Gautam et al., 2021].

Gübreleme, topraktaki mevcut besinlerin dönüşümünü ve depolanmasını etkiler, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere yol açar ve toprak bakterilerinin çeşitliliğini ve sayısını etkiler. Bu şekilde bitki büyümesini ve kalitesini etkileyebilir. Gübrelemenin topraktaki bakteri topluluğu çeşitliliği ve sayısı üzerindeki etkisinin incelenmesi, toprak mikrobiyal topluluk yapısının düzenlenmesinde, bitki verimliliğinin artırılmasında ve toprağın sürdürülebilir olarak tarımda kullanımının teşvik edilmesinde önemlidir [Yang et al., 2021].

2.1.1. Kimyasal Gübrelerin Kullanımı ve etkileri

Kimyasal gübreler, yeşil devrimin önemli bileşenlerinden biridir. TÜİK (2018) verilerine göre 10.567,457 ton kimyasal gübre kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasal gübrenin %68.82'si azotlu gübre, %28.99'u fosforlu gübre ve %2.19'u potasyumlu gübredir [Yüzbaşıoğlu, 2020]. Kimyasal gübreler, ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinin verim artışında önemli bir paydaş olmuşlardır. Bu nedenle, gıda güvenli üretiminin ulusal düzeyde sağlanması ve sosyal istikrarın garanti altına alınmasında kritik bir rol oynamışlardır [Guo and Wang, 2021]. Kimyasal gübreler fosfat, nitrat, amonyum ve potasyum tuzları içerir [Savcı, 2012]. Bununla birlikte, geleneksel tarım uygulamaları ve uygun olmayan gübreleme yöntemleri nedeniyle, kimyasal gübre uygulamaları tarımsal alanlardaki kirliliğinin ana kaynaklarından da biri olmuştur. Ekolojik uygarlığın inşası ve insanların ekolojik bilincinin artmasıyla birlikte, aşırı kimyasal gübre kullanımından kaynaklanan su kirliliği, hava kirliliği ve arazi bozulması gibi kaynak ve çevre sorunlarının giderilmesine insanlık giderek daha fazla ilgi göstermektedir. Kimyasal gübreler sadece verimi artırarak olumlu etkilere sahip değildir. Bunun yanı sıra tarımsal kaynakların kirliliği gibi birçok olumsuz etkiyi de beraberinde getirir [Guo and Wang, 2021]. Dünya çapında gıda kıtlığını önlemek ve verimi en üst düzeye çıkarmak için son birkaç on yılda ekilebilir alanlara büyük miktarlarda kimyasal gübre uygulaması yapılmıştır. Ancak kimyasal gübrelerin aşırı

kullanımı, ciddi toprak bozulması, topraktaki azot miktarının artışına bağlı olarak toprağın asitleşmesi, toprak sıkışması, toprak organik maddesinde azalma ve toprak karbon kaybı gibi çeşitli sorunlara yol açmıştır. Aynı zamanda, kimyasal gübrelerin bitki verimi üzerindeki etkinliği zamanla azalmaktadır. Bu endişeler nedeniyle, organik tarımın geliştirilmesi dünyadaki en büyük ihtiyaçlardan biridir. [Lin et al., 2019].

2.1.2. Mikrobiyal Gübrelerin Kullanımı ve Etkileri

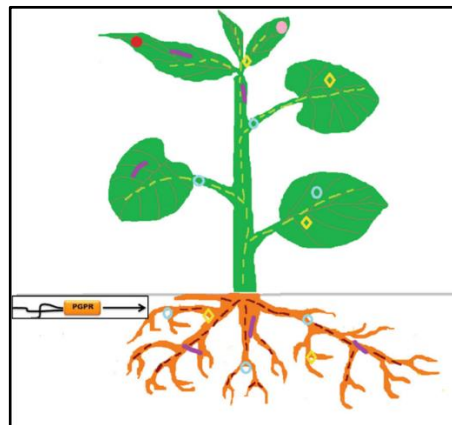
Toprak mikroorganizmaları, toprak ekosisteminin işleyişine ve düzenine aracılık eden önemli rollere sahiptir. Toprağın barındırdığı mikrobiyal yük toprak kalitesinin bir göstergesi olarak kabul edilir [Sharma ve diğerleri, 2010]. Mikrobiyal gübre, organik tarım için küresel ölçekte önemli bir kaynak haline gelmektedir. İmkrobiyal gübreler, canlı mikroorganizmaları içeren gübreler olarak tanımlanabilir. Bunlar, tohumlara, bitki yüzeylerine veya toprağa uygulandıklarında, rizosferde veya bitkinin içinde kolonize olurlar ve konukçu bitkinin ihtiyaç duyduğu besinleri bitkiye sağlayarak bitki büyümesini teşvik ederler [Vejan et al., 2016]. Genel olarak toprak mikroorganizmaları organik madde ayrışmasını düzenler ve besin maddelerini geri dönüştürerek ve bunların bitkilere erişilebilirliğine aracılık ederler. Böylelikle yer üstü ve yer altı ekosistemlerini birbirine bağlarlar. Buna karşılık, bitki büyümesi, topraktaki mikroorganizmaların aktivitelerini etkiler. Aslında, bitki ve mikrobiyal topluluklar arasındaki yararlı ilişkiler bitki büyümesi ve üretkenliğini etkileyen en önemli etkenlerden biridir [Guo et al., 2020]. Bunun yanında, bitki rizosferinde yaşayan rizobakteriler, bitkilerin besin ve su alımını artırır. Rizobakteriler abiyotik ve biyotik streslere karşı bitki direncini artırır. Böylelikle bitki büyümesine yardımcı olurlar. Bu nedenle rizobakteriler çevre kirliliğinin önemli nedenlerinden biri olan sentetik kimyasal gübrelere kıyasla ekonomik ve güvenli bir bitki besin aracıdır. Bu mikroorganizmalar hem tarımsal üretim ve toprak verimliliğinin artırılmasında hem de yenilenebilir ve çevre dostu bir bitki destekleyicisi olarak büyük potansiyele sahiptir [Vurukonda et al., 2018]. Söz konusu mikroorganizma içeriklerinden oluşturulan biyogübreler diğer adıyla biyoinokulantlar, bitki kökleri ile faydalı etkileşimleri, bitki verimini iyileştirmeleri ve bitkileri topraktaki patojenlere karşı

korumaları sayesinde sürdürülebilir tarım için yaygın olarak kullanılmaktadır [Sharma et al., 2021].

Maliyetlerinin düşüklüğü ile de kimyasal gübrelerin girdi maliyetlerinin düşürülmesinde iyi bir alternatif olan mikrobiyal gübreler, kimyasal azotlu gübreler gibi toprağın asitlik seviyesini yükseltmez ve bitkiler için toksik değildir. Üstelik tüm bu olumlu özelliklerinin yanı sıra topraktan bitki besin elementlerinin alınımını daha etkin hale getirerek bitki gelişmesini desteklerler [Çakmakçı, 2005].

2.2. Mikrobiyal Gübre Bileşeni Olarak Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler (PGPB)

Biyogübre formülasyonlarında sıkça tercih edilen bir çok bakteri bitkinin köklerinin etrafındaki ince toprak tabakasında yoğunlaşmış olan rizosfer bakterileridir. Rizosfer, amino asitler, şekerler, yağ asitleri ve diğer organik bileşikler içeren mikroorganizmaların yoğun bir şekilde kolonize olduğu zengin bir ortamdır. Rizosfer içerdiği kök salgıları sayesinde bunları kullanan mikroorganizmaları köklerin etrafına çeker [Küçük ve Almaca, 2019]. PGPR aracılı bitki büyümesi, çeşitli maddelerin üretimi yoluyla rizosferde kolonize olan mikrobiyal topluluğun değiştirilip zenginleştirilmesiyle gerçekleşir [Sharma et al., 2021]. Topraktaki farklı PGPR türleri, organik maddelerin mineralizasyonu ve ayrışmasını gerçekleştirerek bitki büyümesini destekler [Yayla ve Şenol, 2020].



Şekil 2.1: Bitki köklerinde bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin yeri.

Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Actinoplanes, Azotobacter, Bacillus, Pseudomonas sp., Rhizobium, Bradyrhizobium, Erwinia, Enterobacter, Amorpha

sporangium, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* ve *Xanthomona* Genuslarına ait birçok farklı mikroorganizma türleri PGPR'lere örnek olarak verilebilir [Singana et al., 2006].

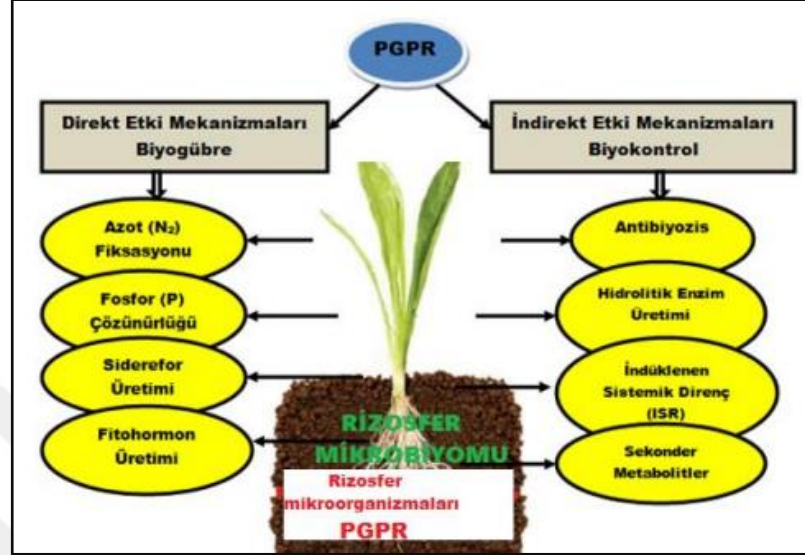
2.2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakterilerin Özellikleri

Tarımsal ürünlerin iyileştirilmesi konusunda mikrobiyal teknoloji ve genetik mühendisliğinin önemli katkıları olmuştur. Rizosfer mikroorganizmaları, bitki dokusunda endofitik olarak, simbiyotik olarak veya rizosferde kolonize olarak çeşitli metabolik aktif maddeler üretebilir. Bu sayede birbirleriyle iletişime geçerek bitki büyümesi için iş birliği yapabilirler [Küçük ve Almaca, 2020].

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler belirli özelliklere sahip olmalıdırlar. Örneğin kök yüzeyini kolonize etmek için yeterli sayıda olmaları gerekir. Kolonize oldukları bölgede ilk olarak hayatta kalmalı, çoğalmalı ve diğer mikroorganizmalar ile rekabet ve bitki büyümesini teşvik edebilmelidirler [Ahemad and Kibret, 2014]. PGPR, azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğü ve siderofor üretimi yoluyla bitki beslenmesini iyileştirebilir. Fitohormonların veya enzimatik aktivitelerin üretimi yoluyla kök gelişimini ve büyümesini teşvik edebilir ve ayrıca rizobiyal veya mikorizal simbiyozların kurulmasını destekleyebilirler. Farklı PGPR üyeleri, rekabet mekanizmaları sayesinde fitoparazitlerin inhibisyonunu ve/veya indüklenmiş sistemik direnç gibi bitki savunmalarını ortaya çıkararak bitkiyi koruyabilir [Vacheron et al., 2013].

PGPR'lerin abiyotik (pH, tuz stresi, kuraklık vb.) ve biyotik stres (bakteriyal/fungal patojenler, nematod vb.) koşullarına karşı bitki direncini artırarak bitkileri destekleme özellikleri vardır. Ayrıca bu grup bakterilerin bitkiler üzerinde doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı etkisi bulunmaktadır. Bunlar büyümeyi düzenleyebilen ve verimi artırabilen maddeler üreterek, su ve besin alımını artırarak bitkiye doğrudan fayda sağlayabilirler. Dolaylı olarak ise antibiyotik ve enzimlerin üretimi aracılığıyla patojenlerin inhibisyonunu sağlayan mekanizmalarda aktif rol alarak bitki ile faydalı etkileşimlerde bulunabilirler. Buna örnek olarak; PGPR'lerin salgıladıkları primer ve sekonder metabolitler sayesinde bitkileri fitopatojenlere karşı koruyarak bitki büyümesine katkı sağlamaları verilebilir [Yayla ve Şenol, 2020].

Ek olarak, PGPR'ler, toprakta oksidasyon ve indirgeme reaksiyonları yoluyla kimyasal bileşenleri işleyerek mikro besinlerin (Fe, Zn, Se alımı) mevcudiyetini artırır [Stamenković et al., 2018].



Şekil 2.2: PGPR'lerin bitki büyümesi üzerindeki doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt) etki mekanizmaları.

2.2.1.1. Doğrudan Etki Mekanizmaları

- Azot Fiksasyonu

Azot, tüm canlı hücrelerde bulunan nükleik asitler (DNA ve RNA), üre ve amino asitler (proteinler), adenosin trifosfat (ATP) ve nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD) temel bir bileşenidir. Azot, fotosentez için gerekli olan en önemli pigment olan klorofilin ana bileşenidir ve bitki büyümesi ve üretimi için kritik öneme sahiptir [Lindström and Mousavi, 2020]. Atmosferde bulunan nitrojen (N_2) amino asitlere, nükleotitlere ve diğer metabolitlerin yapısına dahil edilmeden önce kullanılabilir bir kimyasal forma dönüştürülmelidir. Ökaryotlar, atmosferdeki serbest azotu doğrudan kullanmazlar. Bu nedenle atmosferdeki serbest azottan biyoyararlanımları düşüktür ve bu da bitki büyümesi için önemli bir sınırlayıcı faktördür (Grady et al., 2016) Azotlu bileşikler sentez ederek bağlayabilen mikroorganizmalar nitrojenaz enzim sistemi ile karmaşık bir kimyasal sentez sürecini takiben atmosferik N_2 'u amonyağa dönüştüren biyolojik azot fiksasyonu ile bitkilerin kullanılabileceği formlara dönüştürebilirler [Ahemad and Kibret, 2014; Ladha et al., 1997; Raymond et al., 2004].

- Fitohormon Üretimi

PGPR bakteriler aynı zamanda çeşitli fitohormonların üretimi ile de bitki büyümesine destekler. Önemli bir bitki büyüme düzenleyicisi olan indol asetik asit (IAA) oksinin aktif bir formudur. Yaşam döngüsü boyunca IAA, bitki büyüme ve gelişmesinde çok önemli bir role sahiptir [Numan et al., 2018]. Çok önemli bir mikrobiyal metabolit olan indol-3-asetik asit tohum çimlenmesini uyarma, kök büyümesini hızlandırma, kök sisteminin mimarisini değiştirme, kök biyokütlesini artırma yetenekleri sayesinde bitkileri destekler [Hassen et al., 2016].

Sitokininler bitki dokularında hücre bölünmeleri esnasında rol alan, önemli bir bitki büyüme hormonudur [Kumlay ve Eryiğit, 2011]. Literatürde yapılan bir çalışmada, sitokinin sinyalizasyonundan sorumlu olan genler tanımlanmıştır. CRE1/AHK4/WOL, AHK2, AHK3 sitokinin reseptörleri için üç reseptördür. Bitki büyümesi üzerinde olumlu etkileri olan bu genler sitokinin bağımlı bir şekilde bu reseptörler tarafından aktive edilir. Artan bitki büyümesi, PGPR tarafından üretilen sitokininler ile ilişkilidir [López-Bucio et al., 2007]. Farklı bir çalışmada, *Bacillus megaterium* tarafından bitki büyümesinde rol oynayan sitokinin sinyalleme etkilerinin belirlenmesi için *Arabidopsis thaliana* bitkisi kullanılmıştır. Bitki büyümesini teşvik eden *Bacillus megaterium* tarafından sitokinin sinyal geni olan RPN12 geni ve iki veya üç reseptörden yoksun mutant *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin büyüme durumları karşılaştırılmıştır. AHK2-2 ve RPN12'nin tek tek veya ikisi birden mutant yapılarak oluşturulan kombinasyonları bitki büyümesi üzerinde olumsuz etkiler gösterdiği bildirilmiştir [Ortíz-Castro et al., 2008]. Benzer şekilde giberellin, tohumun dormansi halinde kalması, çimlenmesi, gövdenin uzaması, yaprak ve meyve yaşlanması gibi işlevlerde rol almaktadır [İmriz vd., 2014].

- Siderofor Üretimi

Sideroforlar, toprak verimliliğini ve biyokontrolünü geliştirmek, çevresel ve tıbbi uygulama gibi çeşitli alanlarda geniş uygulama alanına sahip çeşitli bakteriler tarafından üretilen küçük biyolojik moleküldür [Ellermann and Arthur, 2017; Sajeed Ali and Vidhale, 2013]. Demir, çoğu yaşam formunun hayatta kalması için temel bir mikro besindir [Ellermann and Arthur, 2017; Saeed et al., 2021]. Yeryüzünde en bol bulunan demir az çözünür formda olan Fe^{+3} 'dir. Ancak canlı organizmalar için mevcut olan kullanılabilir formda Fe^{+2} miktarı çok azdır. Bitkiler kök bölgesinde yeterli

miktarda çözünebilir Fe^{+2} 'ye ihtiyaç duyar. PGPR, demiri bitkiler için kullanılabilir hale getirmek için düşük moleküler ağırlıklı sideroforlar üretir. Böylece, rizosferik bölgede çözünebilir demir miktarını artırarak bitki büyümesini dolaylı olarak etkilerler [Saeed et al., 2021]. Yapılan bir çalışmada, siderofor üreten bir *Phyllobacterium* suşunun çileklerin büyümesini ve kalitesini desteklediğini gösterilmiştir [Vejan et al., 2016].

Sideroforların patojenler için toprakta bulunan demir miktarını sınırlayarak mantarların büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir [Ghosh et al., 2020]. Toprakta ağır metallerin birikmesi bitkiler için toksik etkiye sahip olduğu ve bu nedenle toprak verimliliği ve toprak mikrobiyal aktivitesi azaldığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada bu durumla mücadele etmek için çeşitli toprak ve su ortamlarında bir siderofor çeşidi olan hidroksamat sideroforlar ön plana çıkmıştır. *Pseudomonas putida* tarafından üretilen hidroksamat sideroforları metalleri hareketsiz hale getirerek bitkilerin büyümesi için uygun ortam sağlamada yardımcı olur [Sajeed Ali and Vidhale, 2013].

- Fosfatlı bileşikler çözme

Fosfor, bitki büyümesini ve verimini sınırlayan en önemli ikinci elementtir. Toprakta bol miktarda fosfor bulunmasına rağmen sadece %0,1'i bitki kökleri tarafından alınabilir formdadır; geri kalanı çözünmeyen mineral kompleksleri oluşturur veya organik madde içinde bağlanarak hareketsiz hale gelir [Grady et al., 2016]. Fosfor, asidik topraklarda çözünmeyen demir ve alüminyum fosfatları veya alkali topraklarda kalsiyum fosfatları olarak bileşiklere kovalent bağlandığından çoğu doğal toprakta genellikle eksikliği görülür. Mineral fosfat çözünürlüğünün ana mekanizmasının toprak mikroorganizmaları tarafından sentezlenen organik asitlerin etkisiyle olduğu bilinmektedir [Chauhan et al., 2017].

2.2.1.2. Dolaylı Etki Mekanizmaları

PGPB'lerin bitkiler üzerindeki dolaylı etkisi, toprak patojenlerini inhibe eden ikincil metabolitler (antibiyotikler ve hidrojen siyanür gibi) üretmeleridir. Aynı zamanda fitopatojenlerin hücre duvarını bozan enzimleri sentezleyebilirler [Mehta et al., 2014.].

Genel olarak PGPB'lerin dolaylı etkileri antibiyotiklerin üretimi, bitkide sistemik dayanıklılığın uyarılması, fungal hücre duvarlarının üretilen litik enzimler ile parçalanması, antifungal metabolitlerin üretimi, besin ve yer için rekabet ederek patojenleri önlemektir [Çelik ve Yarşı, 2020]. Çeşitli patojenik bakteri, mantar ve nematodlar bitkiyi enfekte edebilir ve böylece bitkide verimi büyük ölçüde azaltabilir. PGPR'ler, çeşitli antibiyotikleri, sideroforları, siyanürleri veya litik enzimleri sentezleyerek patojenlere karşı bitki direncinin indüklenmesini önemli ölçüde etkiler [Stamenković et al., 2018]. PGPB, antibiyotik üretimi yolu ile fitopatogenik ajanların büyümesini inhibe ederek bitki büyümesini teşvik eder ve *Pseudomonas spp.*, dünyadaki en yıkıcı bitki patojenlerinden ikisi olan *Rhizoctonia solani* ve *Phytophthora capsici*'yi inhibe ederek bitki büyümesine katkıda bulunur [Vejan et al., 2016].

2.3. Buğday Bitkisi

Türkiye'de iklim koşullarının tarıma elverişli olması nedeniyle tarım, Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahiptir. Buğday bitkisi dünyada tahıl üretiminde ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumunun 2018 verilerine göre tahıl üretimi için ayrılan alanların %62 sinde buğday yetiştirilmektedir. TÜİK 2018 raporu göz önüne alındığında yıllık tahıl üretiminin %37 sini buğday oluşturmaktadır [Kaya ve Polat, 2021]. İnsan beslenmesinde tarihin ilk çağlarından beri önemli rol oynayan buğday birçok ülkede halkın temel besin maddesidir. Hızla artan nüfusun beslenmesinde temel gıda hammadde olarak bilinen buğdayın üretimi dünyada ve ülkemizde de artmaktadır [Aydoğan vd., 2013]. Buğday, hem dünyada hem de ülkemizde ekim alanı ve üretimi en fazla olan tahıl bitkisidir (*Triticum aestivum* L.). Buğday, tüm besinlerden alınan kalenin %20'lik büyük bir payına sahiptir. Dünya buğday üretimi 751.5 milyon ton, ekim alanı $2.22 \cdot 10^8$ ha, verimi ise 338 kg da^{-1} 'dir.

Ülkemizde buğday ekim alanı 7671945 ha, üretimi 20.6 milyon ton ve verimi ise 269 kg da^{-1} olarak belirtilmiştir [Kars ve Ekberli, 2019].

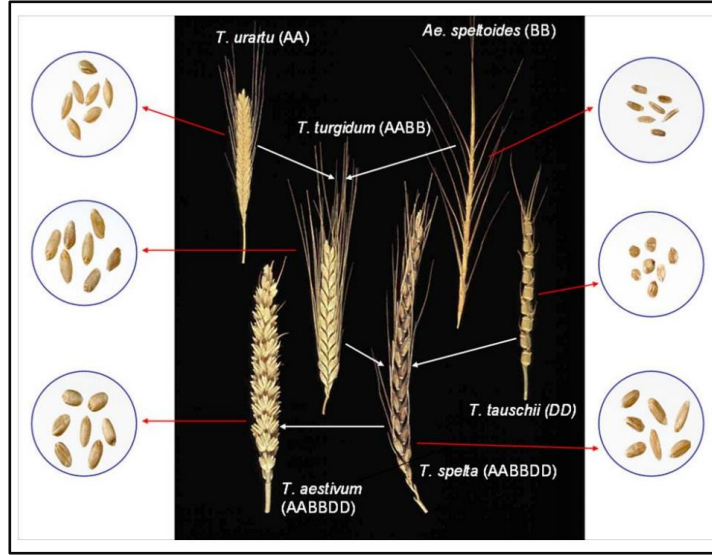
TÜİK verilerine göre 2019 yılında ülkemizde 107.721.600 dekar olan toplam buğday ekim alanına sahiptir. Bu ekim alanı içerisinde makarnalık buğdaylarının payı 10.955.635 dekar ile yaklaşık %10.17'luk bir paya sahiptir. Bu alanlarda buğday üretim miktarı toplam 34.401.704 tondur ve oranı ise %9.16'dır. 2020 yılında ise

toplam ekim alanının (111.432.162 dekar) içindeki ekilme payı 12.580.562 dekar ile %11.29 civarında iken, 2020 yılında ise üretim miktarı 37.187.508 ton ile makarnalık buğday oranı ise %10.76'dır. 2020 yılında ise toplam ekim alanının (111.432.162 dekar) içindeki ekiliş payı 12.580.562 dekar ile %11.29 civarındadır. Türkiye bazında makarnalık buğday verimi 2019 yılında 288 kg da-1; 2020 yılında ise 318 kg da-1'dır. Covid-19 salgını sebebiyle dünya genelinde makarnaya olan talep artmış ve ekilen alanda %14.83, üretim miktarında %26.98 ve verimde %10.42 artış olduğu bildirilmektedir [TÜİK, 2021].

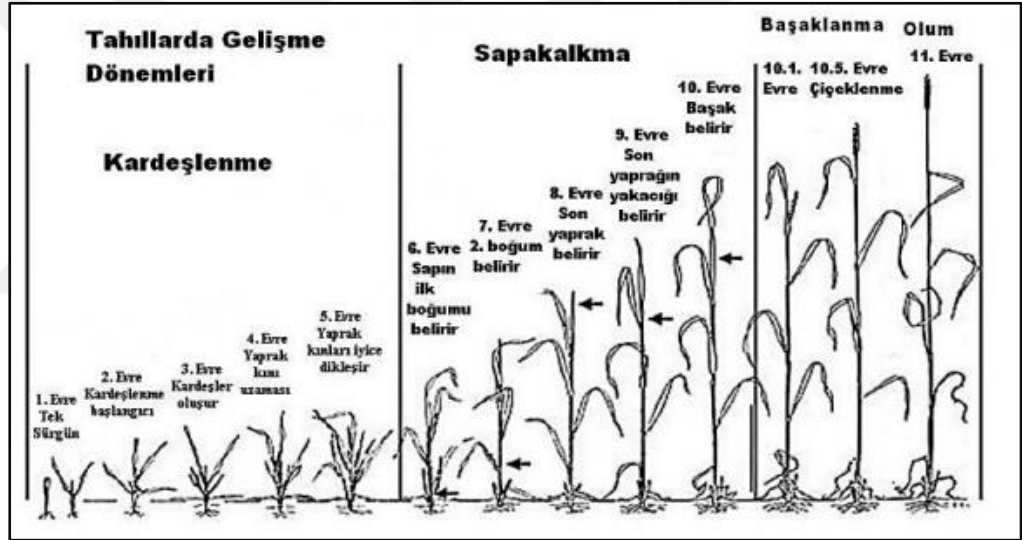
Ticari anlamda dünyada ve Türkiye'de üç tür buğday türü yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunlar; *Triticum aestivum* (ekmeklik), *Triticum compactum* (bisküvilik, topbaş) ve *Triticum durum* (makarnalık) buğdaylarıdır. *Triticum durum* türü buğdaylar; makarna, kuskus ve bulgur gibi gıdaların üretiminde kullanılmaktadır [Gül vd., 2021].

Makarnalık buğdaylar, kullanım özelliklerine göre ekmeklik ve topbaş buğdaylarından farklılık göstermektedir. Makarnalık buğdaylar ekmeklik buğdaylara göre çevresel etkilere karşı daha seçici olduğundan dolayı dünyanın belirli bölgelerinde yetiştirilmektedirler [Anonim, 2007]. Türkiye'de buğday ekim alanlarının 760 bin hektarlık kısmında makarnalık buğday üretimi yapılmaktadır [TÜİK, 2018].

Günümüzde üretimi yaygın yapılan buğday türleri Şekil 2.3'te gösterilen; heksaploid ekmeklik buğday, *T. aestivum* L. ($2n=42$, AABBDD) ve tetraploid sert makarnalık buğday *T. durum* Desf. ($2n=28$, AABB)'dir. Tetraploid ($2n=4x=28$, AABB) bitkiler olan makarnalık buğdaylar, kullanım alanları ve kalite özellikleri bakımından hexaploid ($2n=6x=42$, AABBDD) *T. aestivum* ve *T. compactum* buğdaylarından çok farklıdır [Özberk vd., 2010].



Şekil 2.3: Üretimi yapılan buğday türleri.



Şekil 2.4: Buğdayın gelişim evrelerini gösteren Zadoks skalası.

Buğdayın çimlenmesi gelişimin ilk evresidir (Zadoks 00-19). Uygun sıcaklık koşullarında buğday tohumlarının ekiminden 3-15 gün sonra gerçekleşir. Sonraki evrede ilk üç yaprak oluşumu ile birlikte fide dönemi başlar (Zadoks 10-19). Bir sonraki evre kardeşlenme evresidir, 4.yaprak oluşumu görüldüğünde başlar (Zadoks, 20-29), Ardından, yaprak kını dikleşmesi, sapın oluşması, boğum ve boğum aralarının görülmesi ile gerçekleşen sapa kalkma evresidir. Kardeşlenme ile sapa kalkma dönemi arasında kışlık buğday çeşitlerinde yapraklar yere paralel görünümündedir. Çimlenme ile sapa kalkma dönemi aralığında yazlık buğday çeşitleri 6-10 °C arasında sıcaklığa, kışlık çeşitler ise 1-5 °C arasında 5-60 günlük vernalizasyon adı verilen düşük

sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Vernalizasyonun sonunda bitkide otsu görüntü kaybolur. Ardından gebecik evresi yaprak kınının uzaması, kında şişme ile baş gösterir (Zadoks, 40-49). Başaklanma evresinde bayrak yaprağı kınından başak ucu çıkmaya başlar (Zadoks, 50-59). Sonrasında, çiçeklenme evresinde başağın ortasında ilk anterler görülür (Zadoks, 60-69). Süt olum evresinde tane oluşumu başlar ve tanelerde süt kıvamı yoğunlaşmaya başlar ve tanelerde protein ve karbonhidrat birikmeye başlar (Zadoks, 70-79). Hamur olum evresinde tane içi önce yumuşak sonra katı kıvamında olur (Zadoks, 80-89). Fizyolojik olum evresi Zadoks skalasının son evresidir ve burada tane olgunlaşır (Zadoks, 90-99). Bu evrelerin sonunda buğday gelişimi tamamlanır [Zadoks et al., 1974].

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

Eminbey bir makarnalık buğday çeşididir. Bu buğday çeşidi; kılçıklı ve beyaz başaklı yapıya sahiptir. Başakları orta uzun, orta sık ve diktir. Tane şekli uzamış yumurta biçimindedir. Eminbey buğday çeşidi, soğuğa ve kışa dayanıklı bir buğday türüdür. Ayrıca, yatmaya dayanıklılığı yüksek ve orta erkenci bir çeşittir. Verim potansiyeli, 300-350 mm yağış alan yerlerde 220-300 kg da⁻¹ , 350-400 mm yağış alan yerlerde 300-370 kg da⁻¹ , sulamalı şartlarda verim potansiyeli 350- 750 kg da⁻¹ 'a kadar çıkabilmektedir [Gül vd., 2021].

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. MATERİYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında gerçekleştirilen testlerde kontrol olarak kullanılan *P.aeruginosa* ATCC 15692, *E.Coli* ATCC 8739, *S.aureus* ATCC 25922, *Bacillus cereus* DSM 4312 (laboratuvar izolatları) hücre hatları GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyota Laboratuvarı stoklarından elde edilmiştir. Daha önce, 2018-A-105-04 sayılı BAP projesi (Gül-Şeker, 2021) kapsamında izole edilen 134 *Pseudomonas sp.* izolatları etz kapsamında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal ve Toprak

Tez çalışmasında gerçekleştirilen saksı deneylerinde makarnalık buğday *Triticum durum* L./Eminbey çeşidi kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasallar ve Markaları

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan kimyasallar.

Ürün	Marka
NaCl	Merck, Germany
NaOH	Sigma Aldrich, Germany
TRIS-Trizma Hydrochloride	Sigma Aldrich, Germany
Kristal Viyole	Merck, Germany
Agar	Merck, Germany

Tablo 3.1: Devam.

Red Safe	Chembio, Türkiye
HCl	Sigma Aldrich, Germany
96% EtOH	Alkomed, Turkey
Bradford Reagent	Sigma Aldrich, Germany
Agarose	Prona
L - (-) Malic Acid (C ₄ H ₆ O ₅)	Merck, Germany
DMSO	Sigma Aldrich, Germany
SDS	Sigma Aldrich, Germany
EDTA	Sigma Aldrich, Germany
KCl	Sigma Aldrich, Germany
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich, Germany
IAA	Sigma Chemicals
Immersion Oil	Merck, Germany
Gram Boyama Seti	Merck, Germany

3.1.4. Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan kitler ve markaları.

Ürün	Marka
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	USA

3.1.5. Besiyerleri

LB Agar Besiyeri: Neogen (UK) firmasından temin edilen 40 g LB broth besiyeri tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7’ye ayarlanarak, ve 121 °C’de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

LB Broth Besiyeri: Neogen (UK) firmasından temin edilen 25 g LB broth besiyeri tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7’ye ayarlanarak, ve 121 °C’de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

NFB Agar: 5 gram malik asit, 0,5 gram KH_2PO_4 , 0,2 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gram NaCl , 10 mg biotin, 20 mg pridoxin, 0,2 gram Na_2MoO_4 , 0,235 gram $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28 gram H_3BO_3 , 0,008 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0 24 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 gram agar, 2 ml %0,5 Bromtimol Mavisi, 4 ml %1,64 Fe-EDTA 100 ml dH_2O ile çözüldü ve 0,2 M KOH ile pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim dH_2O ile 1 litreye tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Nutrient Agar: Lamb (USA) firmasından temin edilen 28 g Nutrient Agar besiyeri tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7'ye ayarlanarak, ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Nutrient Broth: Merck (Germany) firmasından temin edilen 8 g Nutrient Broth besiyeri tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7'ye ayarlanarak, ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Tyryptic Soy Broth: Merck (Germany) firmasından temin edilen 30 gram besi yeri 1 L dH_2O ile çözüldü. pH 7'ye ayarlandı. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Pikovskaya Agar: 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 karıştırılarak hazırlandı. pH 7'ye ayarlandı. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Cas Blue Agar: 350 ml besiyeri için gerekli solüsyonlar tarif edildiği şekilde hazırlanarak birleştirilmiştir. Mavi Boya (Blue Dye) hazırlamak için solüsyon 1, solüsyon 2 ve solüsyon 3 hazırlandı. Solüsyon 1 için 0,06 gram CAS 50 ml ddH_2O ile çözüldü. Solüsyon 2 için 0,0027 gram $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 ml 10 mM HCl ile çözüldü. Solüsyon 3 için 0,073 gram HDTMA 40 ml ddH_2O ile çözüldü. Ardından, Solüsyon 1'den 25 ml, Solüsyon 2'den 4,5 ml Solüsyon 3'ten 20 ml alınarak plastik şişede karıştırıldı. Hazırlanan boya solüsyonu 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Karışım Solüsyonu hazırlandı. Minimal Media9 (MM9) Stok Solüsyonu için 0,75 gram KH_2PO_4 , 1,25 gram NaCl , 2,5 gram NH_4Cl 25 ml ddH_2O 'da çözüldü. %20 Glikoz Stok Solüsyonu hazırlamak için 2 gram glikoz 10 ml ddH_2O 'da çözüldü ve ardından filtre ile steril edildi. NaOH Stok Solüsyonu için 25 gram NaOH 150 ml ddH_2O ile çözüldü. Casamino Asit Solüsyonu için 3 gram casamino asit 13,5 ml ddH_2O ile çözüldü ve 13,5 ml kloroform içerisinde çözülmüş %3 8-hidroksikinolin eklendi ve +4 °C'de gece boyu inkübe edilerek ekstrakte edildi. İnkübasyon sonrasında solüsyonun iki faza ayrıldığı görüldü. Üst faz ayrılarak kalan kloroformun uzaklaştırılması amacıyla çeker ocakta 1 saat bekletildi. Hazırlanan solüsyon filtre ile

steril edildi. CAS hazırlamak için 11, 284 gram pipes 262,5 ml dH₂O ve 35 ml MM9 içeren solüsyonda çözüldü. pH 6'ya ayarlanarak pipesin tamamen çözünmesi sağlandı. pH 6,8'e ayarlandı. 5,25 gram bacto agar eklendi ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Steril besiyeri 50 °C sıcaklıkta 10,5 ml steril casamino asit solüsyonundan, 3,5 ml %20 glikoz solüsyonundan eklenerek iyice karıştırıldı. Karıştırma işlemi sırasında 35 ml blue dye yavaş yavaş eklendi ve besiyeri hazır hale getirildi. Cas Blue Agar besiyerini hazırlamak için kullanılan tüm malzemeler 1 gün önce 6 M HCl ile yıkandı ve dH₂O'dan geçirilerek kurumaya bırakıldı.

3.1.6. Ayıraçlar

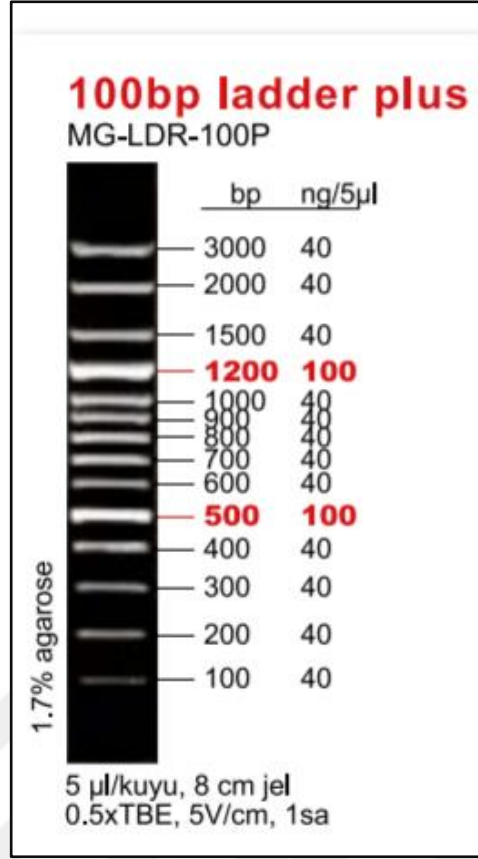
Bu tez çalışmasında kullanılan ayıraç Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan ayıraçlar.

Ürün	Hazırlanışı
Salkowski ayıracı	49 ml %35 HClO ₄ üzerine 1ml 0,5 M FeCl ₃ eklenerek yapılır.

3.1.7. DNA Moleküler Belirteci

Bu tez çalışması kapsamında Agaroz jel görüntülemesi için Şekil 3.1'de gösterilen Moleküler DNA Belirteci Hibriden 100bp Ladder Plus (Türkiye) kullanıldı.



Şekil 3.1: A-Hibrigen 100 bp DNA Ladder Plus (1x50 µg), MG-LDR-100P.

3.1.8. Solüsyonlar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Kullanılan çözeltiler.

Solüsyonlar	Hazırlanışları
FTS	8,5 gram NaCl 1 litre dH ₂ O ile çözüldü.
PBS	0.8% NaCl (pH=7.4) 0.144% Na ₂ HPO ₄ (pH=7.4) 0.002% KCl (pH=7.4) 0.0245% KH ₂ PO ₄ (pH=7.4)
10 X TAE	10 ml 50X TAE tamponundan alındı üzerine 500 ml steril dH ₂ O eklenerek 10X’ e seyreltilti.

Tablo 3.4 Devam.

1 X TAE	10 ml 10X TAE tamponundan alındı ve 90 ml steril dH ₂ O eklenerek 1X' e seyreltildi.
0,2 M KOH	0.5 gram tartılıp son hacmi dH ₂ O ile 50 ml'ye tamamlandı
%0,5 Brom Timol Mavisi (BTB)	5 mg BTM tartıldı 1ml dH ₂ O eklenerek çözülüp 0,2 M KOH ile son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
Fe-EDTA	3,8 gram Na ₂ H ₂ EDTAH ₂ O tartılarak 10 ml 1M NaOH ile çözüldü. 2,5 gram FeCl ₃ 6H ₂ O tartılıp üzerine 5 ml dH ₂ O eklendi. Isıtılıp karıştırılarak çözüldü. Hazırlanan iki farklı solüsyon yavaşça karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Filtre kağıdı ile süzüldü. Süzüntü alkolle 2 defa yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
1 M Tris-HCl	24,228 g Tris tartıldı. 200 ml steril dH ₂ O eklenerek çözüldü. pH' si HCl ile 8.0' a ayarlandı.

3.1.9. Cihazlar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan aletler Tablo 3.5'da gösterilmiştir.

Tablo 3.5: Kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz İsimleri ve Markaları
İnkübatör VWR Supplier Partnerships (Binder, USA), İnkübatör ES 120 (Nuve, Türkiye), İnkübatör Function Line (Heraeus Instruments, Almanya)
pH 211 Microprocessor pH Metre (Hanna Instruments, USA)
Isıticılı manyetik karıştırıcı MSH-A WiseStir Wisd (Daihan, Kuzey Kore)

Tablo 3.5 Devam.

Hassas terazi 0.001g-620g (Kern, Almanya)
Analitik terazi ATX224 (Shimadzu, Japonya)
NF 1200R Santrifüj (Nuve, Türkiye)
Soğutmalı santrifüj 124Br (Gyrozen, Kuzey Kore)
Spektrofotometre UV1800 (Shimadzu, Japonya)
Otoklav CL-40L (ALP, Japonya) Otoklav HICLAVE HVE-50 (HIRAYAMA, Japonya), Otoklav NC 40M (Nuve, Türkiye)
Mikrosantrifüj Z 216M (Hermle, Almanya)
Soğutmalı mikrosantrifüj 1730R (Labogene, Danimarka)
McFarland Cihazı BD CrystalSpec (Becton Dickinson, USA)
Vortex VM10 (Daihan Scientific, Kuzey Kore)
Jel görüntüleyici Azure Biosystems C600+ (Bio-Rad, USA)
Mikroskop (Nickon Eclipse E100)
-20°C Dondurucu (Bosch), -80°C Dondurucu (Heraeus, Danimarka), +4°C Buzdolabı (Vestel)
Sınıf 2 Biyogüvenlik kabini (Tezsan)
Çekerocak (Tezsan, Türkiye)
Buz makinesi (Scotsman AF80, İtalya)
TProfessional TRIO Thermocyclers (Biometra, Almanya)
NanoDrop™ Lite Spektrofotometre (Thermo Scientific™, USA)

3.2. Yöntemler

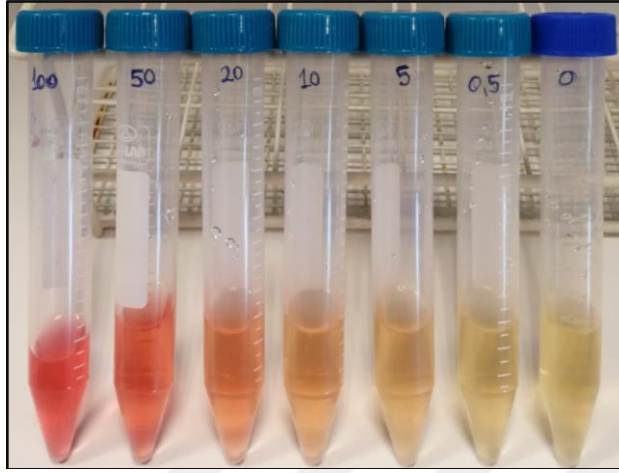
3.2.1. Azot Fiksasyonu Testi

Azot fiksasyonu testi, bitkilerin yaşam döngüsünde çokça ihtiyaç duyduğu elementlerden biri azottur. Bu test ile atmosferde bol miktarda bulunan elementel azotun bitkilerin kullanabileceği amonyum formlarına dönüştürme yeteneğine sahip olan *Pseudomonas* sp. izolatları belirlendi. Bu testte kullanılmak üzere NFb (Nitrogen free Medium) besiyeri 0.2 M KOH, % 0.5'lik Brom Tymol Blue (BTB) ve Fe-EDTA kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan besiyeri otoklav aracılığı ile steril edilerek aseptik koşullarda Petri kaplarına döküldü. Her bir izolatın 24 saatlik taze kültüründen iğne uçlu öze ile inoküle edildi. Pozitif kontrol olarak *P.aeruginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *E.coli* (ATCC 8739) kullanıldı. Petriler 7 gün boyunca 30°C'ta inkübe edildi. Azot fiksasyonu yeteneğine sahip pozitif izolatların besiyerinde mavi renk oluşumu gözlenirken azot fiksasyonu yeteneğine sahip olmayan negatif izolatların besiyerinde renk değişimi gözlenmez.

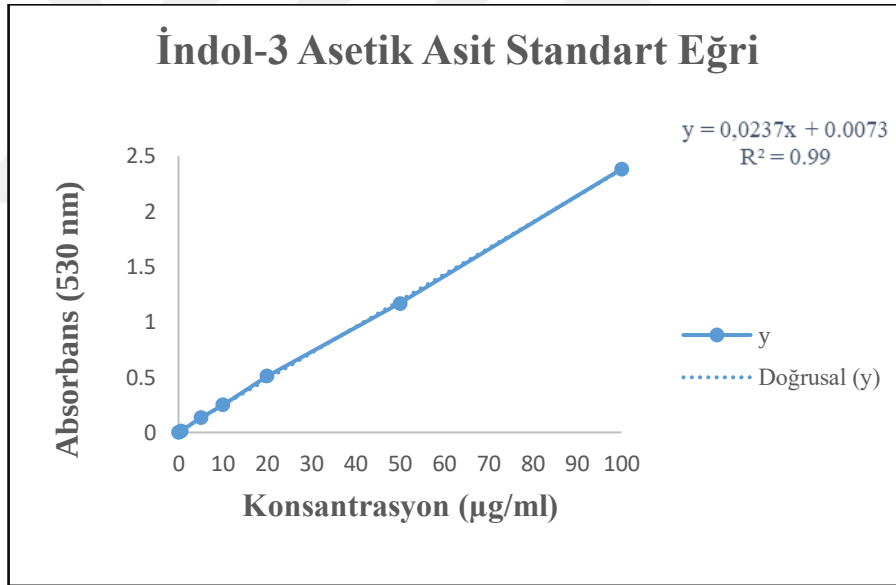
3.2.2. İndol-3 Asetik Asit Oluşumu Testi

İndol asetik asit önemli bir bitki büyüme hormonudur. Bitki büyümesini destekleyebilecek izolatları belirlemek amacı ile bu test yapıldı. *Pseudomonas* izolatlarının 24 saatlik taze kültürü için Luria-Bertani (LB) Broth besiyeri kullanıldı. 0,5 OD₆₀₀ (optical density) yoğunluğa erişen taze bakteri kültürlerinden 0,1g/L triptofan içeren LB Broth besiyerine bakteriler %2 v/v aşılama oranı ile inoküle edildi. 28° C'ta 2 gün inkübe edildi. Kültürler, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi Santrifüj sonrası süpernatant içerisine eşit hacimde Salkowski ayırıcı ilave edildi (Gordon ve Weber 1951). Bakteri içermeyen Triptofanlı LB besiyeri ve Salkowski ayırıcı karıştırılarak negatif kontrol (blank) olarak kullanıldı. Örnekler karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Renk oluşumunun gözlenmesi için Blank ve örnekler, OD₅₃₀ nm'de UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu, Japonya) okutuldu. Pozitif kontrol olarak *P. aureginosa* (ATCC 15692) ve *E.coli* (ATCC 8739) ve negatif kontrol olarak ise *S.aureus* kullanıldı. Sonuçları değerlendirmek ve üretilen IAA'ı kantitatif

olarak tayin edebilmek için 5-100 µg/ml IAA (Sigma Chemicals) kullanılarak standart eğri (Şekil 3.3) hazırlandı.



Şekil 1.2: IAA üretimi miktarını belirlemek için hazırlanan standartlar.



Şekil 3.3: IAA standart eğrisi.

3.2.3. Siderofor Üretimi Testi

Birçok bakteri, metabolizmalarının temel süreçleri için gerekli olan çevresel demiri elde etmek için çevreden ferrik demir (çözülebilir Fe^{+2}) alımı sürecine yardımcı olan sideroforları kullanır. *Pseudomonas sp.* izolatlarının siderofor üretimi yeteneğini belirlemek için Cas Blue Agar kullanıldı. CAS/HDTMA, mavi renk üretmek için ferrik

demir ile güçlü bir bağ yapar [Schwyn and Neiland,1987]. CAS blue agar ile Fe^{+3} boyası kompleks oluşturduğu için besi yeri mavi renktedir [Körçoban, 2020]. Siderofor varlığında Fe^{+3} – CAS kompleksi reaksiyona girer ve serbest boya açığa çıkarak mavi renk turuncuya dönüşür (Şekil 4.4). Cas blue agar (Louden et al., 2011) referans alınarak hazırlandı. Otoklav aracılığı ile $121^{\circ}C$ 'ta 15 dk steril edildi. Hazırlanan Cas Blue Agar aseptik şartlarda steril petrilere döküldü. İzolatlardan iğne uçlu öze ile besiyerine inokülasyon yapıldı. 2 gün $30^{\circ}C$ 'ta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda turuncu renk oluşturan izolatlar siderofor üretme özelliğine sahip pozitif izolarlar olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *Escherichia coli* (ATCC 8739) kullanıldı.

3.2.4. Fosfat Çözünürlüğü Testi

Bitki rizosferinde bulunan Fosfor (P) çözücü mikroorganizmalar, topraktaki bitki tarafından alınamayan çözünmeyen formdaki fosforun çözünmesini sağlamaktadır [Bektaş vd., 2021]. *Pseudomonas* izolatlarının fosfatı çözebilme yeteneğini belirlemek için Pikovskaya agar besiyeri hazırlandı [Suleman et al., 2018]. Otoklav aracılığı ile steril edilen besiyeri aseptik koşullarda Petri kaplarına döküldü. İzolatlar iğne uçlu öze yardımı ile Pikovskaya agara ekildi. 1 gün $30^{\circ}C$ 'ta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda izolatların zon çapı büyüklüğü pozitif kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *Bacillus cereus* (ATCC 4312) kullanıldı.

Bu aşamadan sonra 134 tane izolatın ilgili test sonuçları değerlendirilerek içlerinden en iyi 43 tanesi seçildi ve seçilen izolatlar biyofilm oluşturma yetenekleri açısından aşağıda açıklandığı gibi test edildi.

3.2.5. Biyofilm Oluşumu

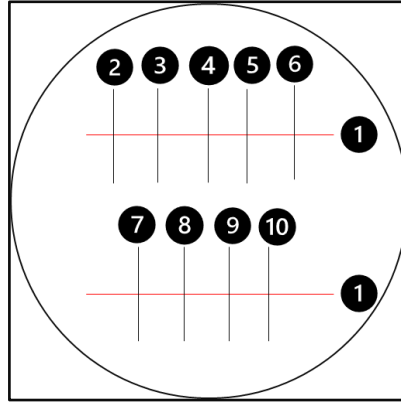
Doğada bakteri topluluklarını bir arada tutmak üzere özelleşmiş bir mimari yapı olan biyofilm oluşturma yeteneği seçilmiş 45 izolat için test edildi. Bunun için 43 adet izolatın kültürü %1w/v glikoz içeren TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerine başlatıldı. İzolatların her birinin yoğunluğu 0,5 Mc Farland'a ayarlanarak biyofilm testine başlandı. Kültürler 5 dk 10 000 rpm santrifüjlendi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı.

Hücreler 1'er ml %3 w/v glikoz içeren TSB içinde ile vortex ile karıştırılarak çözüldü. 96 kuyucuklu plaka'nın ilgili kuyularına bakteriler 3'er tekrarlı olacak şekilde (0,5 Mc Farland) 100'er µl ilave edildikten sonra 30 °C'ta 72 saat boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen %3 w/v glikoz içeren TSB besiyeri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 15692) kullanıldı. 72 saatlik inkübasyon sonrası 0,1 g Kristal viyole boyası tartılarak 10 ml distile su ile çözüldü ve filtre kağıdı ile süzüldü. 96 kuyucuklu plak içindeki besiyeri çekilip atıldı. Kuyucuklar musluk suyu ile yıkandı. Bu işlem 2 kez gerçekleştirildi. Kuyucuklara 125 µl Kristal viyole koyuldu. 10 dk oda şartlarında beklendi. Ardından kuyucuklar tekrar musluk suyu ile yıkandı ve 96 kuyucuklu plak ağzı yarı kapalı olacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra %30 asetik asit (14 ml dH₂O + 6 ml Asetik asit) çözeltisi her bir kuyuya 200 µl olacak şekilde ilave edildi. 15 dk oda sıcaklığında plağın ağzı kapalı olacak şekilde bekletildi. Bekleme süresi sonunda pipet ile karıştırılarak FLUOstar Omega (Almanya)'da OD₆₀₀ nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı.

Bu aşamadan itibaren azot fiksasyonu, IAA üretimi, siderofor üretimi, fosfat çözebilme yeteneklerine göre 43 adet izolat seçilerek biyofilm oluşturma yetenekleri açısından da değerlendirildi. İlgili 43 adet izolatın çinden biyofilm yeteneği iyi olan 10 adet izolat seçildi ve diğer testlere bu seçilen 10 izolat ile devam edildi.

3.2.6. Cross Streak Plate

Önceki 5 yöntem ile elde edilen sonuçlara göre seçilen 10 adet izolatın birbirleri ile yaşayıp yaşayamama durumunu belirlemek için bu yöntem kullanıldı. Nutrient agar besiyeri hazırlanarak aseptik koşullarda Petri kaplarına döküldü. Her bir izolatın 24 saatlik taze katı kültüründen Nutrient agara Şekil 3.1'de gösterilen deney planına uygun şekilde üst üste çizildi. Çizilen izolatlar 1 gün 30°C'ta inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında üst üste çizilen izolatların birbirleri ile yaşayabilme durumları değerlendirildi.



Şekil 3.4: Cross-streak plate bakterilerin çizim planı (Rakamlar seçilen 10 izolatı temsil etmektedir.).

Bu test ile 10 adet izolatın birlikte yaşayabilmeleri değerlendirilerek birlikte yaşayabildiği görülen 3 adet izolat seçildi ve diğer çalışmalara bu 3 *Pseudomonas* izolatı ile devam edildi.

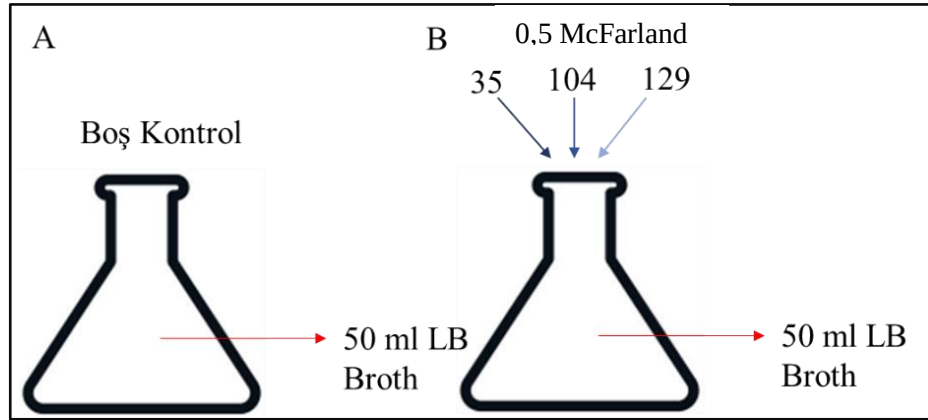
3.2.7. Biyiformülasyonun Biki Büyümesini Teşvik Etme Özelliklerinin İncelenmesi

Cross streak plate yöntemi ile en iyi şekilde birlikte yaşayabilen bakterilerin *in vivo* kontrolünü yapmak için 35, 104 ve 129 (ilk izolat numaralarına göre) numaralı izolatların LB Broth besiyerine kültürü başlatıldı. Bunun için her bir bakteri ayrı ayrı 5 ml besiyerinin içine 100 µl bakteri inoküle edildi ve 30 °C'ta inkübe edildi. 24 saat sonunda bakterilerin yoğunluğu 0,5 McFarland'a turbidimetre ile ayarlandı. 2 tekrarlı olacak şekilde 5 ml LB besiyeri içerisine 100'er µl (%2 v/v) 35, 104 ve 129 numaralı izolatlarından kültürlerinden inoküle edildi. Hazırlanan bu karışık kültürden 0, 24, 48 ve 72. saatlerde 100'er µl örnek alınarak Nf besiyerine, Cas Blue agara ve Pikovskaya agara damla şeklinde ekim yapıldı.

3.2.8. *Pseudomonas* İzolatları ile Biyiformülasyon Hazırlanması

Her bir bakteri ayrı ayrı 5 ml besiyerinin içine 100 µl bakteri inoküle (%2 v/v) edildi ve 30 °C'ta inkübe edildi. 24 saat sonunda Her bir izolatın sıvı kültüründen ayrı ayrı 0,5 McFarland'a ayarlandı. Steril bir erlen içerisine 50 ml LB Broth besiyeri eklendi. Ardından bu besiyerinin içine her biri 0,5 McFarland ayarlanmış bakteriden

4'er ml inokule edildi. 24 saat 30 °C'ta inkübe edildi. İnkübe edilen bu bakteri karışımı PGPR özelliklerin yeniden taranması testlerinde ve saksı denemelerinde kullanıldı.



Şekil 3.5: A) 50 ml LB Broth içeren boş kontrolü, B) Biyoformülasyonun LB broth içinde 35, 104 ve 129 numaralı izolatların karışık kültürü.

3.2.9. Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlama

3.2.9.1. Genomik DNA İzolasyonu

Seçilen 35, 104 ve 129 no'lu *Pseudomonas* izolatlarının LB broth içerisinde 24 saatlik taze kültürü %2 v/v aşılama ile hazırlandı. 24 saat 30 °C etüvde inkübe edildi.

24 saat inkübasyon sonrası, bakterilerin bulunduğu tüpler 4500 g'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pelletlerden ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit kullanılarak üretici firmanın (ZymoBIOMICS, USA) önerdiği şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.9.2. DNA Miktarının Belirlenmesi

İzolasyon sonrası her bir bakteriden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop cihazı (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer/USA) ile ölçüldü. Ölçüm için cihaza izole edilen DNA örneklerinden 1'er µl koyuldu ve Hesaplanan DNA miktarları (µg/ml) kaydedildi.

3.2.9.3. Genomik DNA'nın Görüntülenmesi

DNA'nın agaroz jelde görüntülenmesi için % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Jel tankına agaroz döküldü ve tarak takıldı. Jel polimerleştikten sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tarak çıkarıldı. Elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Her bir örnek 1X Loading Dye içerecek şekilde boya ile karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 5 µl örnek yüklendi. Örnekler 80 V'ta 50 dk yürütüldü. Jel görüntüleme cihazı Gel Imager Azure Biosystems C600+ (Bio-Rad, USA) kullanılarak DNA varlığı göreselleştirildi.

3.2.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lardan 16S rDNA ve rpoD bölgelerinin eldesi ve çoğaltılması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi. Termal Döngü Cihazı reaksiyon karışımı ve miktarları Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Reaksiyon final hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımının hacmi steril apirojen ampul su kullanılarak 25 µl ye ile tamamlandı (Tablo 3.7).

Üç izolatın tür bazında tanımlaması için 27F/1492R primerleri (Lane, 1991) kullanılarak PZR yöntemi ile 16 S rDNA bölgeleri çoğaltıldı. 16 S rDNA bölgesinin tanımlanmasında Tablo 4.6'da dizisi belirtilen 27F/1492R evrensel primeri kullanıldı.

Tablo 3.6: 16S rDNA tanımlamasında kullanılan genlere ait primer bilgileri.

Gen Adı	Primer Adı ve Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Bant Boyutu (bp)
16S rDNA	27F GAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R TACCTTGTTACGACTT	58 °C	1465

Tablo 3.7: PZR reaksiyonu için kullanılan malzemelerin isim, hacim ve final konsantrasyonları.

Malzeme	Stok Konsantrasyonu	1X	Final Konsantrasyonu
GoTaq® Green Master Mix, 2X (M712B) B yazılacak mı?	2 X	12,5 µl	1X
27 F, 10 µM (Forward Primer)	10 µM	0,5 µl	1 µM
1492 R, 10 µM (Reverse Primer)	10 µM	0,5 µl	1 µM
DNA Template	-	-	50 ng
Steril ajirojen ampul su	-	-	11 µl

Termal döngü cihazı programı, 1.adım olan ön denatürasyon 95 °C'ta 3 dk, 2.adım olan denatürasyon 95°C'ta 15 sn, 3.adım olan bağlanma primerlerin bağlanabilmesi için 58 °C'de derecede 1 dk, 4.adım olan uzama 72°C' ta 1 dk ve 5.adım olan son uzama 72°C' ta 10 dk olacak şekilde toplam 35 döngü olarak gerçekleştirildi (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: PZR döngü programı.

Adım	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	3 dakika
2	95 °C	15 saniye
3	58 °C	1 dakika
4	72 °C	1 dakika
5	72 °C	10 dakika
6	4 °C	∞

Elde edilen PCR ürünleri %1 (w/v) lik agaroz jele yüklendi. İlk kuyucuğa moleküler belirteç olarak kullanılan kaç 3 µL Hibrigen 100 bp µ Ladder Plus [(1x50 µg), MG-

LDR-100P] yüklendi. Ardından sırasıyla 35, 104 ve 129 numaralı izolatların PZR ürünlerinden 3'er µl olacak şekilde kuyulara yüklendi. 1500 baz çiftlik 16S rDNA bölgesinin varlığını görüntülemek için jel 50 dk 80 V'ta yürütüldü. Jel görüntüleme cihazı Gel Imager Azure Biosystems C600+ (Bio-Rad, USA) kullanılarak 16SrDNA dizisinin varlığı jel üzerinde görüntülendi.

Elde edilen PZR ürünlerinin dizilenmesi hizmet alımı yolu gerçekleştirildi. Elde edilen diziler çift yönlü olarak okunarak izolatlara ait 16S rDNA dizisi belirlendi.

3.2.10. Saksı Deneyleri

Saksı denemelerinde makarnalık buğday çeşidi (*Triticum durum* L. Eminbey) kullanıldı. Buğday tohumları saksıya ekilmeden önce nemli filtre kağıtları arasında 5 gün +4 °C'de ve karanlıkta bekletilerek tohum vernalizasyonu denilen ön işleme tabi tutuldu.

Saksı denemelerinde Kelebek Tarım'dan alınan ticari dış mekan toprağı kullanıldı. Drenajın arttırılması amacıyla, dış mekan toprağı 1:1 oranında kum ile karıştırıldı. Hazırlanan saksı toprağı 121°C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Toprak analiz sonuçları 3 örneğin analizinden gelen değerlerin ortalamaları alınarak Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

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. 3.9).

Tablo 3.9: Toprak analizi 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	%
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	%

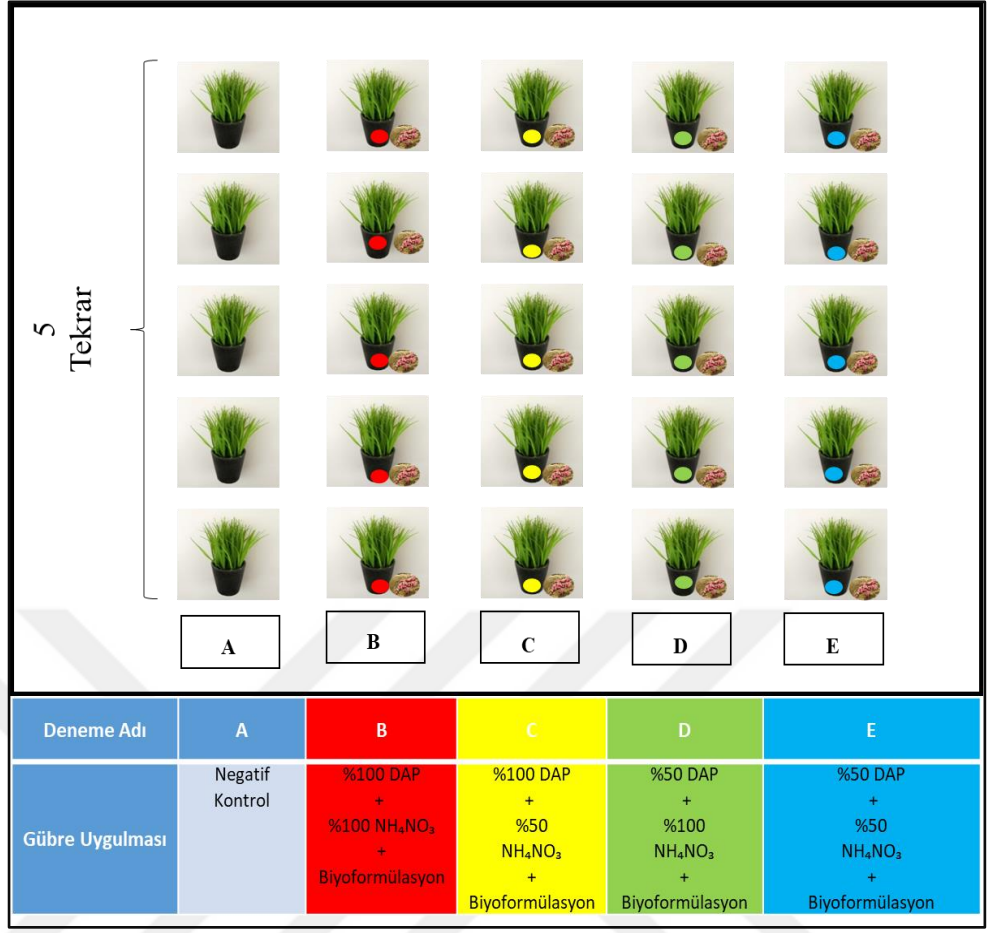
*[Sınır değerler WEB 7 (2021)'dan alınmıştır].

Denemelerde 21 cm kenar uzunluğuna ve 30 cm derinliğe sahip hacimi 12 lt olan kare saksılar kullanıldı. Eklenecek gübre miktarı saksı büyüklüğü ve saksılara eklenecek toprak miktarı göz önünde bulundurularak 12kg/da'a göre hesaplandı. Bu hesaba göre kullanılacak diamonyum fosfat (DAP) ve amonyum nitrat gübresi miktarları belirlendi. 5 farklı deney grubu oluşturuldu (Tablo 3.10). A grubu saksılar deneyin negatif kontrolüdür. A grubu (negatif kontrol grubu) sadece steril toprak içermekte olup herhangi bir gübre içermemektedir. Saksılara tohumlar ekilmeden önce %100 diamonyum fosfat (DAP) gübresi içeren deney gruplarına (B grubu ve C grubu saksılarına) 5,3'er g DAP ve %50 diamonyum fosfat (DAP) gübresi içeren deney gruplarına (D grubu ve E grubu saksılarına) 2,65'er g DAP toprak yüzeyine serpiştirilerek toprak yüzeyinde karıştırıldı. Ardından toprak yüzeyi hafif ıslatılarak vernalizasyon süreci tamamlanan tohumlar her saksıya olası bir çimlenmeme durumuna hazırlıklı olmak üzere 7 adet olacak şekilde, toprağın 2 cm derinliğine ekildi. 24 saatlik 35, 104 ve 129 nolu izolatların her birinden 4 ml steril LB Broth besiyerine %2 aşılama oranında inoküle edilerek 30 °C'ta 24 saat inkübe edildi. Ardından her tohumun üzerine, 10⁸ CFU/ mL yoğunluğundaki 24 saat birlikte inoküle edilen bakteri kültüründen 1 ml eklendi. Sapa kalkma dönemi öncesi de her bitki

köküne 1ml (10^8 CFU/ mL) dökülerek ve her bitkinin yaprağına yaklaşık 1ml spreyleme ile bakteri inokülasyonu tekrarlandı. Sapa kalkma döneminde %100 amonyum nitrat (NH_4NO_3) gübresi içeren deney gruplarına (B grubu ve D grubu saksılarına) 5,3'er g NH_4NO_3 ve %50 NH_4NO_3 gübresi içeren deney gruplarına (C grubu ve E grubu saksılarına) 2,65'er g NH_4NO_3 gübresi eklendi Kontrol grubu olarak sadece steril toprak içeren aşılammamış tohumlar kullanıldı. Çimlenmenin ardından saksı başına düşen bitki sayısı 5'e indirilmiştir.

Tablo 3.10: Saksı deneyi grupları ve ilave edilen gübre oranları.

Deney Grupları	DAP Oranı (%)	NH_4NO_3 Oranı (%)
A	-	-
B	100	100
C	100	50
D	50	100
E	50	50



Şekil 3.6: Saksı deney planı.

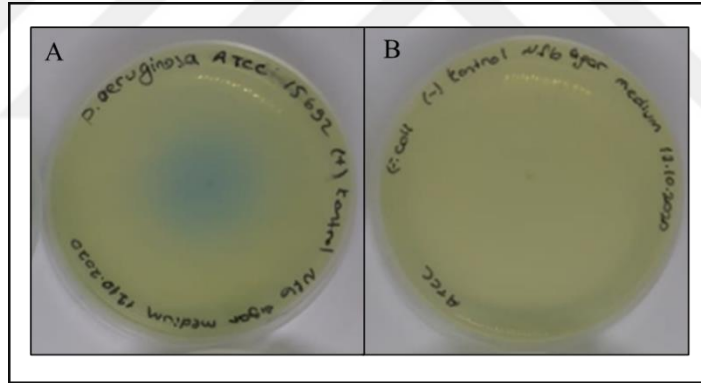
3.2.11. İstatiksel Analiz

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

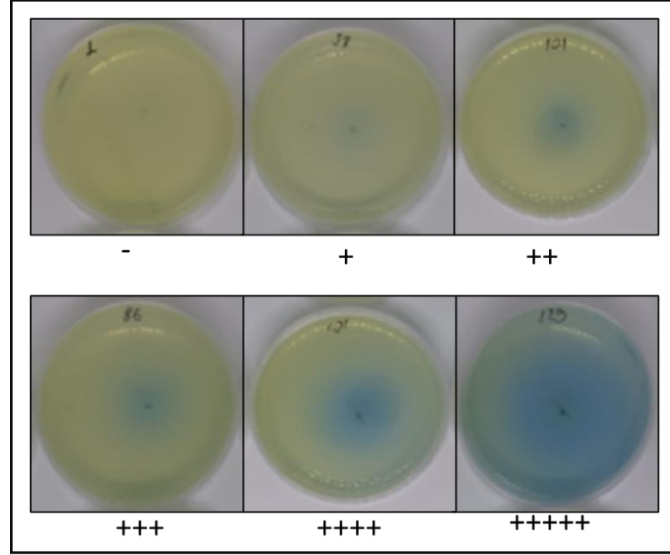
4. SONUÇLAR

4.1. *Pseudomonas* İzolatlarının Azot Fiksasyonu Yeteneklerinin Belirlenmesi

2018-A-105-A-04 no'lu GTÜ BAP projesi kapsamında izole edilmiş olan 134 izolat içerisinde 49 tanesinin azot fikse etme yeteneğine sahip olduğu görüldü. Şekil 4.1'de kontrol suşları olan *P.aeruginosa* (+Kontrol), *S.aureus* (-Kontrol) ve *E.coli* (-Kontrol)'ye petri fotoğrafları gösterildi. Şekil 4.2'de ise farklı izolatlara ait örnek Petri fotoğrafları gösterildi. Petrilerde mavi zon oluşumunun görülmesi azot fiksasyonu yeteneğine sahip olan izolatları göstermektedir. İzolatların oluşturduğu mavi zon çapı pozitif kontrol bakterisi *P.aeruginosa*'nın zon çapı +++ kabul edilerek izolatların azot fikse edebilme kabiliyeteleri “+, ++, +++, +++++, +++++” şeklinde derecelendirildi (Tablo 4.1).



Şekil 4.1: A) Pozitif (+) Kontrol *P.aeruginosa*; B) Negatif (-) Kontrol *E.coli*.



Şekil 4.2: İzolatların *Pseudomonas aeruginosa*'a görece azotu fikse edebilme seviyeleri için örnek izolat fotoğrafları.

Tablo 4.1 incelendiğinde kontrol bakterisine (++) görece yüksek seviyede azot fikse edebilen ve 4 artı ile derecelendirilen 120,131 ve 139 numaralı izolatla 5+ ile derecelendirilen 129 numaralı izolat öne çıkmıştır.

Tablo 4.1: *Pseudomonas* izolatlarının Azot fiksasyonu testi sonuçları. Kalın olarak işaretlenen izolatlar kontrole görece yüksek seviyede azot fikse ettiği gözlenen izolatlardır.

İzolat Numarası	N Fiksasyonu	İzolat Numarası	N fiksasyonu	İzolat Numarası	N Fiksasyonu	İzolat Numarası	N Fiksasyonu
*P.a(+K)	+++	33	-	67	-	101	++
*S.a (-K)	-	34	-	68	+	102	+
1	-	35	+	69	-	103	-
2	-	36	-	70	-	104	-
3	-	37	-	71	-	105	++
4	-	38	+	72	-	106	-
5	-	39	-	73	-	107	-
6	+	40	-	74	-	108	-
7	-	41	-	75	-	109	-
8	-	42	-	76	+	110	++
9	-	43	-	77	++	111	++
10	-	44	+	78	-	112	+

Tablo 4.1: Devam.

11	-	45	-	79	-	113	+++
12	-	46	-	80	+	114	-
13	-	47	-	81	-	115	+
14	-	48	+	82	-	116	+
15	-	49	-	83	+	117	-
16	-	50	-	84	++	118	+++
17	-	51	-	85	-	119	-
18	-	52	++	86	+++	120	++++
19	-	53	-	87	-	121	+
20	-	54	-	88	+++	122	+
21	+	55	-	89	-	123	+
22	-	56	-	90	+	124	+
23	-	57	-	91	-	125	+
24	-	58	-	92	+++	126	+++
25	-	59	-	93	-	127	+++
26	-	60	-	94	++	128	-
27	+	61	-	95	+	129	+++++
28	+	62	-	96	+	130	+
29	-	63	-	97	+	131	++++
30	-	64	-	98	-	132	+++
31	-	65	-	99	++	133	++
32	-	66	-	100	++	134	++++

*P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.a: *Staphylococcus aureus*

4.2. *Pseudomonas* İzolatlarının İndol-3 Asetik Asit Üretimi Yeteneklerinin Belirlenmesi

134 adet *Pseudomonas* izolatı IAA üretme yetenekleri bakımından incelendi. İzolatların ürettiği IAA miktarını hesaplamak için bir standart eğri hazırlanarak elde edilen formül kullanılarak izolatların ürettiği IAA miktarı $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı. Tablo 4.2 incelendiğinde pozitif kontrol *P.aeruginosa*'nın IAA üretim miktarı 3.27 $\mu\text{g/ml}$ karşın, 134 izolat içerisinde 34 tanesinin (tabloda koyu renk işaretli olanlar) pozitif kontrolden daha yüksek miktarda (3,29 ile 13,45 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen miktarlarda) IAA üretimi yaptığı belirlendi. Özellikle 3 no'lu izolat 9.90 $\mu\text{g/ml}$, 20 no'lu izolat 7.88 $\mu\text{g/ml}$ ve 35 no'lu izolat 13,45 $\mu\text{g/ml}$ ile diğer izolatlar arasından öne çıkmışlardır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: İzolatların IAA üretim miktarları.

İzolat numarası	IAA Üretimi (µg/ml)	İzolat numarası	IAA Üretimi (µg/ml)	İzolat numarası	IAA Üretimi (µg/ml)
P.a (+K)	3,28	45	4,71	90	0,24
1	5,51	46	-0,31	91	0,07
2	5,94	47	2,05	92	0,96
3	9,90	48	1,13	93	0,49
4	5,51	49	2,35	94	0,28
5	5,94	50	3,03	95	0,79
6	7,50	51	1,46	96	-0,27
7	-0,05	52	2,81	97	0,75
8	5,68	53	1,46	98	0,49
9	3,07	54	1,63	99	2,52
10	4,97	55	2,73	100	0,37
11	5,26	56	1,76	101	0,45
12	2,43	57	0,96	102	1,42
13	2,86	58	1,76	103	4,16
14	2,73	59	1,34	104	0,32
15	2,18	60	1,46	105	1,34
16	2,94	61	3,62	106	0,28
17	3,32	62	2,73	107	0,87
18	3,07	63	1,59	108	1,04
19	4,42	64	2,35	109	0,70
20	7,88	65	2,18	110	2,98
21	5,39	66	2,18	111	0,32
22	3,03	67	1,59	112	0,16
23	5,81	68	2,22	113	0,54
24	4,16	69	1,63	114	-0,31
25	2,90	70	1,72	115	1,51
26	4,54	71	2,94	116	0,41
27	5,56	72	4,04	117	3,03
28	3,24	73	2,05	118	3,74
29	2,22	74	1,76	119	-0,31
30	4,25	75	1,51	120	1,97
31	2,43	76	2,56	121	2,10
32	3,66	77	2,56	122	0,83
33	2,65	78	5,18	123	0,70
34	3,83	79	2,43	124	1,80
35	13,45	80	1,59	125	3,53
36	2,65	81	2,14	126	2,22
37	2,22	82	2,14	127	2,01
38	3,66	83	1,97	128	-0,31
39	4,59	84	1,21	129	0,75

Tablo 4.2: Devam.

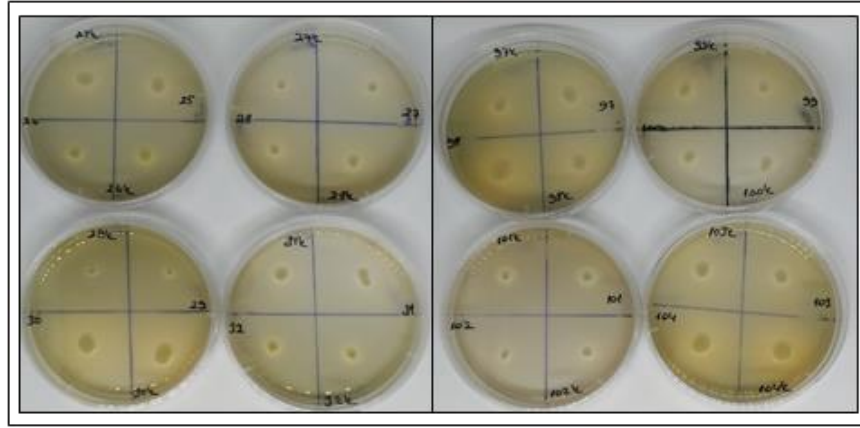
40	4,33	85	1,55	130	4,25
41	5,09	86	1,00	131	-0,10
42	1,13	87	2,05	132	1,30
43	3,07	88	1,25	133	1,13
44	4,84	89	1,55	134	1,46

*P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

4.3. *Pseudomonas* İzolatlarının Siderofor Üretimi Yeteneklerinin Belirlenmesi

Materyal metot bölümünde tarif edilen şekilde hazırlanan 134 izolatın 2 günlük inkübasyon süresinin ardından siderofor üretme yeteneği kontrol bakterisi *P.aeruginosa* (+ Kontrol) ile kıyaslandı. Besiyerinde oluşan renk değişiminin derecesine göre sonuçlar karşılaştırıldı. Pozitif kontrol bakterisi *P.aeruginosa* 'nın oluşturduğu renk değişimi boyutu “+++” olarak kabul edildi, kontrol bakterisinden daha büyük renk değişimi boyutuna sahip olan bakteriler “++++” olarak değerlendirildi. Tablo 4.3'te gösterilen sonuçlar incelendiğinde, 134 izolattan 123 tanesinin çeşitli seviyelerde siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edildi (Tablo 4.3). Bunların içinden ise 19, 30, 39, 40, 98, ve 104'ün en iyi seviyede siderofor ürettiği belirlenerek ++++ ile öne çıktığı görüldü.

Şekil 4.3: (+) Kontrol; *P.aeruginosa*, (-) Kontrol; *S.aureus*.



Şekil 4.4: Siderofor üretme yeteneğine sahip olan bazı izolat örnekleri.

Tablo 4.3: *Pseudomonas* izolatlarının siderofor üretimi testi sonuçları. Koyu renk olarak işaretlenenler Petri denemelerinde en yüksek seviyede siderofor ürettiği belirlenen izolatlardır.

İzolat Numarası	Siderofor Üretimi	İzolat Numarası	Siderofor Üretimi	İzolat Numarası	Siderofor Üretimi	İzolat Numarası	Siderofor Üretimi
P.a* (+K)	+++	33	+	67	-	101	+
S.a* (-K)	-	34	++	68	+	102	+
1	+	35	+++	69	+	103	+
2	++	36	+++	70	+	104	++++
3	+	37	+++	71	++	105	+++
4	+	38	+++	72	-	106	++
5	+	39	++++	73	+	107	++
6	+	40	++++	74	+	108	+
7	++	41	-	75	+	109	++
8	+	42	++	76	+	110	++
9	+++	43	+	77	+	111	-
10	+	44	++	78	+	112	+
11	++	45	++	79	++	113	-
12	++	46	+	80	+	114	+
13	+++	47	+++	81	+	115	-
14	+	48	++	82	++	116	+
15	++	49	+	83	++	117	-
16	+++	50	+	84	++	118	-
17	++	51	+	85	+++	119	+
18	+++	52	+	86	++	120	++
19	++++	53	+	87	-	121	+
20	+	54	+	88	+	122	++
21	++	55	+	89	++	123	+

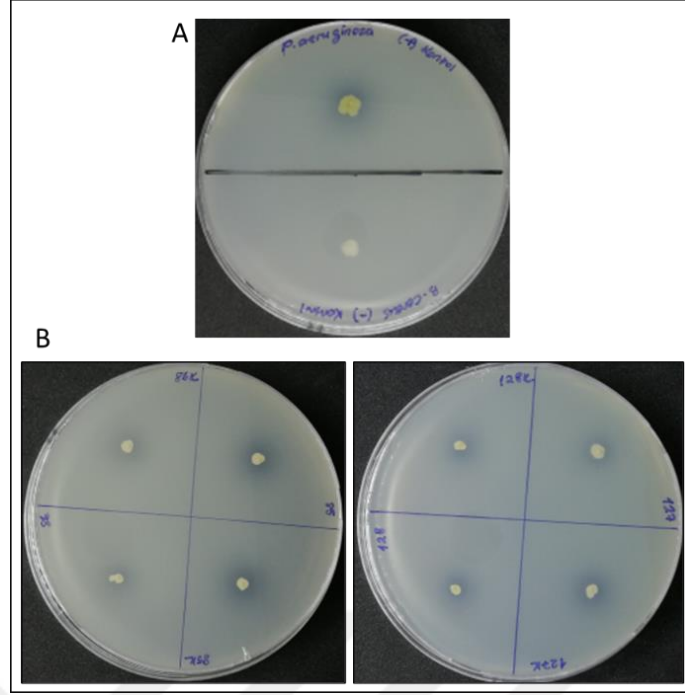
Tablo 4.3: Devam.

22	+	56	+	90	+++	124	++		
23	+	57	+	91	+	125	++		
24	+	58	+	92	++	126	++		
25	+	59	+	93	++	127	++		
26	+	60	+	94	+	128	+++		
27	+	61	+	95	+	129	++		
28	++	62	+	96	++	130	++		
29	-	63	+++	97	+	131	++		
30	++++	64	+	98	++++	132	++		
31	+	65	+	99	+	133	+		
32	+	66	+	100	-	134	+		

*P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.a: *Staphylococcus aureus*

4.4. Fosfat Çözünürlüğü Testi Sonuçları

Bu test ile toprakta bulunan inorganik fosfatı etkili bir şekilde parçalayarak, bitkilerin kullanabileceği forma dönüştüren *Pseudomonas sp.* izolatları belirlendi. Pozitif kontrol bakterisi *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu zon çapı belirlenerek (+++) diğer izolatların oluşturduğu zon çapları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre izolatların zon çapı “+, ++, +++” olacak şekilde değerlendirildi. Negatif kontrol bakterisi *B.cereus*'un inoküle edildiği Petride zon oluşumu gözlenmedi. (Şekil 4.5).134 izolata ait fosfat çözebilme sonuçları Tablo 4.4'te yer almaktadır. Tablo 4.4 incelendiğinde 66 no'lu izolat (kontrol ile aynı seviyede) hariç tüm izolatların fosfatlı bileşikleri çözebilme yönünden kontrole görece zayıf kaldığı ve ++ ile derecelendirildiği görülmektedir.



Şekil 4.5: A) (+) Kontrol; *P.aeruginosa* ve (-) Kontrol; *B.cereus* B) Bazı izolatlara ait Pikovskaya agar Petri sonuçları.

Tablo 4.4: *Pseudomonas* izolatlarının fosfat çözme testi sonuçları.

İzolat Numarası	Fosfat Çözme	İzolat Numarası	Fosfat Çözme	İzolat Numarası	Fosfat Çözme	İzolat Numarası	Fosfat Çözme
P.a* (+K)	+++	33	+	67	+++	101	+
E.c* (-K)	-	34	+	68	++	102	+
1	+	35	+	69	++	103	++
2	-	36	++	70	-	104	+
3	-	37	+	71	++	105	+
4	++	38	++	72	+	106	++
5	-	39	++	73	-	107	++
6	++	40	+	74	++	108	+
7	+	41	-	75	+	109	-
8	-	42	++	76	++	110	+
9	+	43	+	77	++	111	+
10	+	44	++	78	+	112	+
11	+	45	++	79	+	113	++
12	+	46	+	80	+	114	+
13	+	47	+	81	+	115	+
14	-	48	+	82	+	116	+

Tablo 4.4: Devamı.

15	+	49	+	83	+	117	+
16	+	50	+	84	+	118	+
17	+	51	+	85	+	119	+
18	+	52	+	86	+	120	+
19	++	53	+	87	++	121	+
20	+	54	++	88	+	122	+
21	++	55	++	89	+	123	-
22	-	56	++	90	++	124	+
23	-	57	+	91	+	125	+
24	+	58	+	92	+	126	+
25	+	59	+	93	++	127	+
26	-	60	++	94	+	128	+
27	+	61	-	95	++	129	+
28	++	62	++	96	++	130	+
29	-	63	++	97	+	131	+
30	++	64	+	98	++	132	+
31	+	65	-	99	+	133	+
32	-	66	+++	100	++	134	-

*P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ; *E.c: *Escherichia coli*

Bu aşamadan sonra 134 adet izolat azot fiksasyonu, IAA üretimi, siderofor üretimi ve fosfat çözme yeteneği açısından değerlendirilerek tüm özelliklerin yer aldığı 44 izolata ait bir özet tablo hazırlandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Seçilen 44 izolatın toplu test sonuçları.

İzolat Numarası	N Fiksasyonu	IAA Üretimi (µg/ml)	Siderofor Üretimi	Fosfat Çözebیلme
6	+	7,49789	+	++
9	-	3,06751	+++	+
13	-	2,85654	+++	+
21	+	5,38819	++	++
28	+	3,23629	++	++
30	-	4,24895	++++	++
35	+	13,4473	+++	+
36	-	2,64557	+++	++
37	-	2,22363	+++	+
38	+	3,65823	+++	++
39	-	4,5865	++++	++
40	-	4,33333	++++	+
44	+	4,83966	++	++

Tablo 4.5: Devam.

47	-	2,05485	+++	+
48	+	1,12658	++	+
63	-	1,59072	+++	++
66	-	2,18	+	+++
68	+	2,22363	+	++
76	+	2,56118	+	++
77	++	2,56118	+	++
83	+	1,97046	++	+
84	++	1,21097	++	+
86	+++	1	++	+
88	+++	1,25316	+	+
90	+	0,24051	+++	++
92	+++	0,95781	++	+
98	-	0,49367	++++	++
104	-	0,32489	++++	+
105	++	1,33755	+++	+
110	++	2,98312	++	+
113	+++	0,53586	-	++
120	++++	1,97046	++	+
122	+	0,83122	++	+
124	+	1,80169	++	+
125	+	3,53165	++	+
126	+++	2,22363	++	+
127	+++	2,01266	++	+
128	-	-0,308	+++	+
129	+++++	0,74684	++	+
130	+	4,24895	++	+
131	++++	-0,097	++	+
132	+++	1,29536	++	+
133	++	1,12658	+	+
134	++++	1,46414	+	-

4.5. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi

Daha önce yapılan azot fiksasyonu, İndol-3 Asetik Asit üretimi, siderofor üretimi ve fosfat çözünürlüğü testleri sonucunda en iyi değerlere sahip olan 44 adet izolat seçildi. Seçilen 44 adet izolat ile yapılan biyofilm testi sonuçları, Tablo 4.5’de gösterilmektedir. Kontrol bakterisi olarak yüksek düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinen *P.aeruginosa* (ATCC 15692) kullanıldı [Thi et al., 2020]. Kontrol bakterisinin biyofilm oluşturma OD₆₀₀’de absorbans değeri değeri 0,114 olarak belirlendi.

Tablo 4.6: Seçilen 44 adet izolat ile yapılan biyofilm testi sonuçları.

İzolat Numarası	Biyofilm Testi Sonuçları	İzolat Numarası	Biyofilm Testi Sonuçları
P.a (+K)	0,114	86	0,88867
6	2,492	88	2,26033
9	0,939	90	1,40933
13	-1,9577	92	2,272
21	-1,997	98	-0,2063
28	-0,6783	104	-0,286
30	-2,026	105	0,32733
35	0,78367	110	-0,1277
36	-2,0673	113	-0,0497
37	-2	120	0,23033
38	2,11667	122	0,25667
39	-0,0133	124	0,12933
40	-1,2417	125	0,338
44	3,5	126	0,18467
47	0,41667	127	0,206
48	1,31267	128	0,43767
63	-0,747	129	0,028
68	-0,1033	130	0,363

Tablo 4.6: Devam.

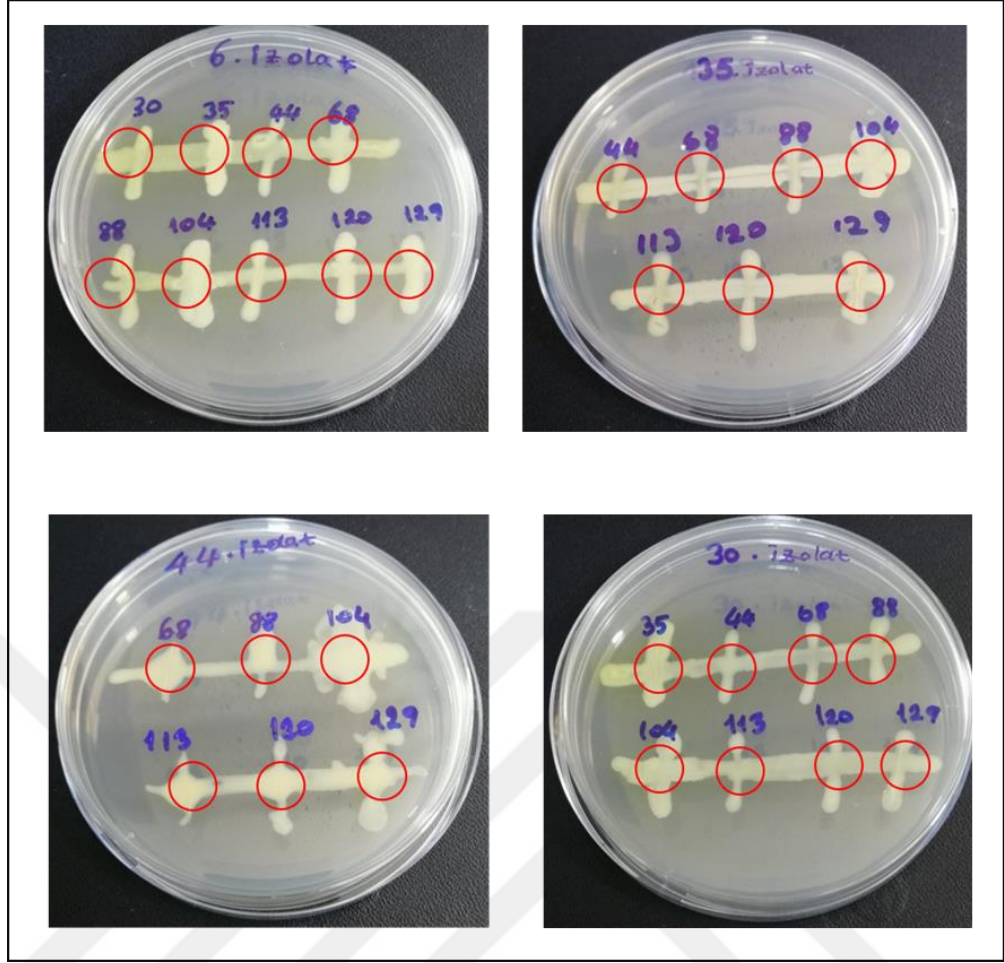
76	-1,2183	131	0,438
77	1,324	132	0,01967
83	0,62567	133	0,15167
84	-0,0993	134	0,78533

*P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

Bu test sonucunda 43 izolatın biyofilm sonuçları kontrol bakterisi *P.aeruginosa* (ATCC 15962)'ya görece kıyaslandı. Bu izolatlar içinde en iyi değerlere sahip izolatlar yapılan diğer 4 test sonuçları da göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda belirli özellikler açısından ön plana çıkan 10 adet izolat seçildi. Azot fiksasyonu yeteneği açısından diğer izolatlardan daha ön plana çıkan 120 ve 129 nolu izolatlar seçildi. IAA üretimi açısından daha ön plana çıkan 6 ve 35 nolu izolatlar seçildi. Siderofor üretimi yeteneği daha yüksek olan 30 ve 104 nolu izolatlar biyoformülasyon adayı olarak uygun olabilecek adaylar olarak değerlendirilerek seçildi. 68 ve 113 nolu izolatlar diğer izolatlara görece daha üstün fosfat çözebilme yeteneğine sahip olduğundan biyoformülasyon için uygun olabilecek adaylar olarak değerlendirildi ve seçildi. 44 ve 88 nolu izolatlar ise biyofilm oluşturma yeteneği açısından daha üstün yeteneğe sahip olması bakımından biyoformülasyon için uygun aday bakteri olabilecekleri değerlendirilerek seçildi.

4.6. Bakterilerin Üst Üste Çizilerek Birlikte Yaşayabilme Durumlarının Değerlendirilmesi

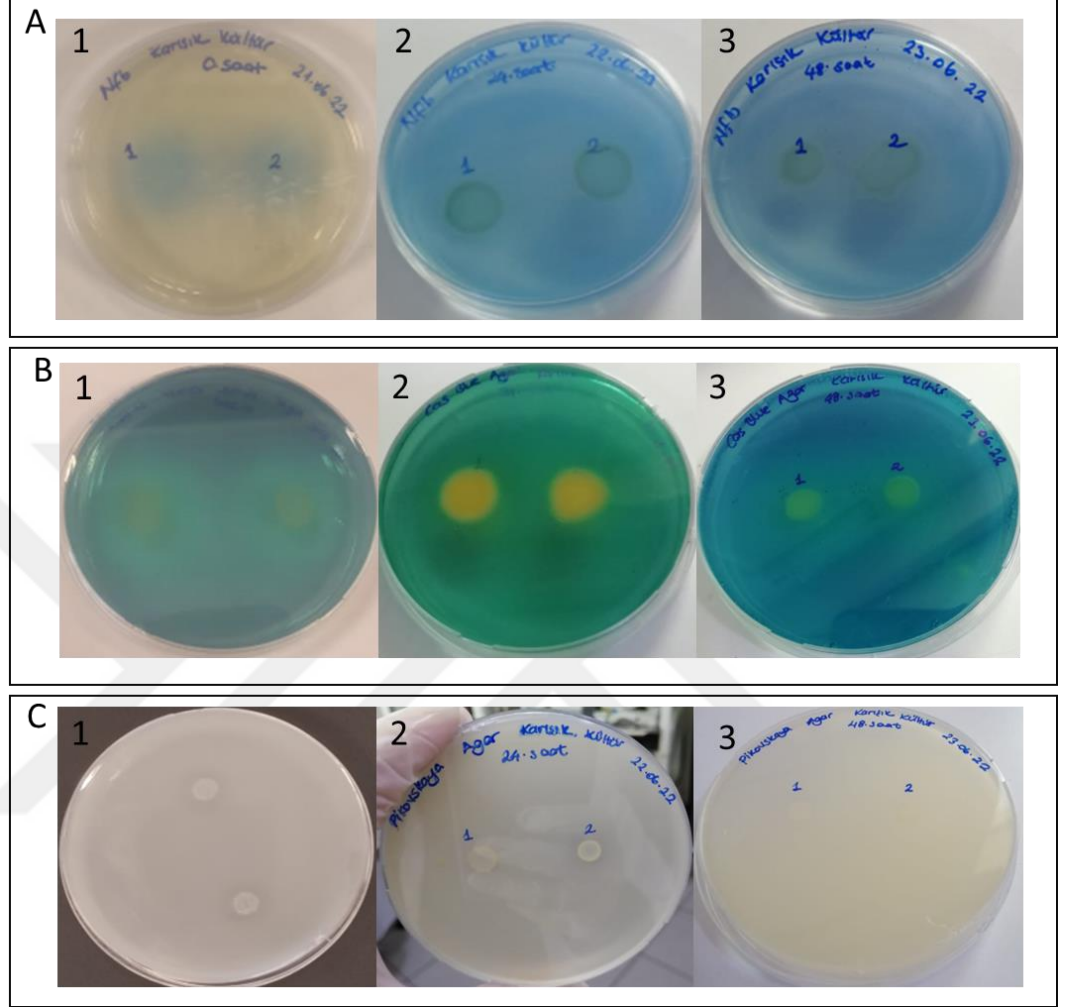
Bu yöntem ile seçilen 10 adet izolat (6, 30, 35, 44, 68, 88, 104, 113, 120 ve 129 nolu izolatlar) Nutrent Agar besiyerinde üst üste (Cross-Streak yöntemi) çizildi. Şekil 4.6'da kırmızı işaretli olarak gösterilen noktalarda bakterilerin birbirleri ile uyumlu yaşayıp yaşayamadıkları değerlendirildi. Bu test sonucunda üst üste çizilen bakterilerin kesişme noktalarında bakteri yoğunluğu artıyorsa bir arada uyumlu bir şekilde yaşayabildikleri sonucuna varıldı. Eğer bakterilerin kesişme noktasındaki bakteri yoğunluğunda düşüş varsa, bu bakterilerin bir arada yaşamak için çok uyumlu olmadıkları sonucuna varıldı.



Şekil 4.6: Cross-streak yöntemi ile izolatların üst üste çizilmesi sonucu oluşan petri görüntüleri.

Bu yöntem ile 35, 104 ve 129 numaralı izolatların diğer izolatlarla karşılaştırıldığında hem bir arada daha uyumlu şekilde yaşayabilecekleri gözlemlendi hem de siderofor, IAA ve Azotu fikse edebilme yetenekleri ile öne çıkan izolatlar olmaları sebebiyle iyi bir biyoformülasyon adayı oldukları belirlendi. Bu nedenle *Pseudomonas* izolatları ile oluşturulacak biyoformülasyon için kullanılacak bakterilere 35, 104 ve 129 numaralı *Pseudomonas* izolatları olarak karar verildi.

4.7. Biyoformülasyonun Bitki Büyümesini Teşvik Etme Özelliklerinin *in vitro* Değerlendirilmesi



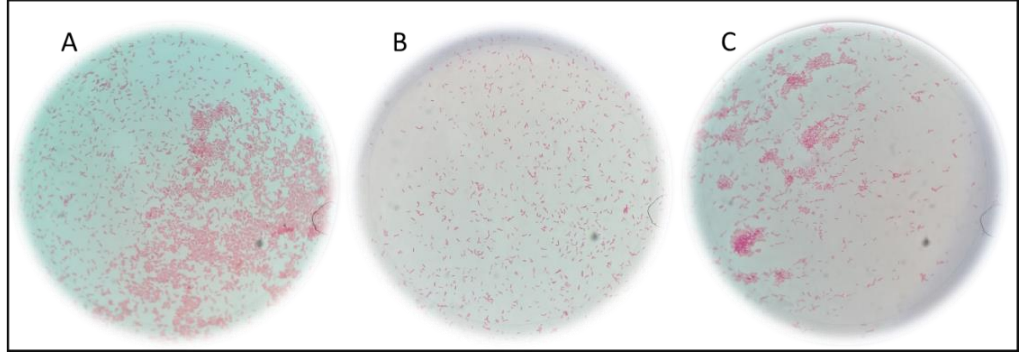
Şekil 4.7: Seçilen izolatların bitki büyümesini teşvik etme özelliklerinin *in vitro* değerlendirilmesi için hazırlanan petrilerin görüntüleri. A) A1:0. saat, A2: 24. Saat, A3: 48. Saatlerde elde edilen azot fiksasyonu testi sonuçları; B) B1:0. saat, B2: 24. Saat, B3: 48. Saatlerde elde edilen siderofor üretimi testi sonuçları; C) C1:0. saat, C2: 24. Saat, C3: 48. Saatlerde elde edilen fosfat çözebilme testi sonuçları.

Biyoformülasyon için aday olarak seçilen 3 izolatın bitki büyümesini teşvik etme özelliklerinin *in vitro* değerlendirilmesi için LB broth besi yerine ayrı ayrı hazırlanan taze kültürlerinden 0,5 McFarland ayarlandı. Bu 3 kültürden 5 ml LB broth içerisine 100'er µl eklenmesi ile karışık kültür hazırlandı. Kültür hazırlandıktan sonra 0, 24, 48. saatlerde karışık kültürden 20'şer µl alınarak NFb, Cas-Blue agar ve Pikovskaya besi yerine ekim yapıldı. Şekil 4.7'de gösterilen sonuçlara bakıldığında 0, 24 ve 48.saatlerde alınan azot fiksasyonu sonuçlarına bakıldığında; 3 izolat birlikte kültüre

edildiğinde azot fiksasyonu yeteneğinin izolatların ayrı ayrı azot fiksasyonu yeteneği ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek seviyeye çıktığı görülmektedir. Bakterilerin birlikte kültür edilmesinin azot fiksasyonu yeteneğini artırması bu bakteri birlikteliğinin saksı denemelerinde bitki büyümesini teşvik edebilecek ve bu durumu destekleyebilecek nitelikte olduğu görüldü. Siderofor üretimini belirlemek için kullanılan Cas-Blue agar petri sonuçlarına bakıldığında 0, 24 ve 48.saatlerde alınan siderofor üretimi sonuçlarına bakıldığında; 3 izolat birlikte kültüre edildiğinde siderofor üretim yeteneğinin yüksek olduğu görülmektedir. İzolatların ayrı ayrı siderofor üretimi testi ile karşılaştırıldığında 3 izolatın birlikte kültüre edilmesi sonucu üretilen siderofor miktarı daha yüksek görünmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında seçilen 3 izolatın saksı denemelerinde bitki ile bir araya getirildiğinde bitki büyümesini destekleyebilecek adaylar olarak seçilmesinin doğru olduğu kanıtlanmaktadır. Fosfat çözebilme yeteneklerini belirlemek için kullanılan Pikovskaya agar petri sonuçlarına bakıldığında 0, 24 ve 48.saatlerde alınan petri sonuçlarına bakıldığında; 3 izolat birlikte kültüre edildiğinde fosfat çözebilme yeteneğinin, izolatların ayrı ayrı fosfat çözebilme sonuçları ile karşılaştırıldığında 3 izolatın birlikte kültüre edilmesi sonucu fosfat çözme yeteneğinde belirgin fark görülmedi. Toplu olarak bu sonuçlara bakıldığında seçilen 3 izolatın saksı denemelerinde bitki ile bir araya getirildiğinde bitki büyümesini iyi seviyede destekleyebilecek adaylar olma özelliğine sahip olduğu görülmektedir.

4.8. *Pseudomonas* İzolatları İle Konsorsiyumun Hazırlanması

Cross-streak yöntem ile 35, 104 ve 129 numaralı izolatlar biyoförmülasyon için seçildi. 35 numaralı izolat iyi bir şekilde fosfat indirgeme özelliğine sahipken, 104 numaralı izolat hem yüksek seviyede IAA üretim yeteneğine sahip hem iyi şekilde siderofor üretim yeteneğine sahip hem de iyi bir biyofilm oluşturabilir. 129 numaralı izolat ise iyi şekilde N fiksasyonu yeteneğine sahip olması açısından biyoförmülasyon açısından aday bakteriler olarak belirlendi. Biyoförmülasyonu hazırlamadan önce bu 3 izolatın Gram boyaması yapılarak kültürlerin saf olduğu kanıtlandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: A) 35 numaralı izolatın B) 104 numaralı izolatın C) 129 numaralı izolatın Gram boyama görüntüleri.

4.9. Moleküler Biyolojik Yöntemler ile Tanımlama

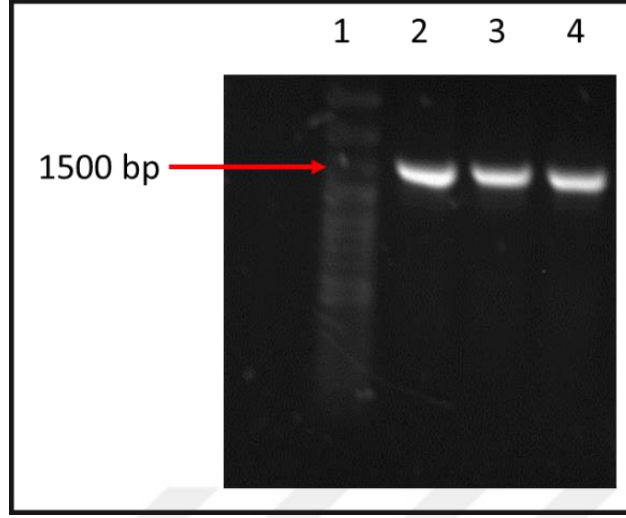
4.9.1. DNA Miktarının Belirlenmesi

Seçilen 35, 104 ve 129 numaralı izolattan izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonunu belirlemek için nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Nanodrop Lite Spectrophotometer/USA) kullanıldı. Cihaza önce blank olarak saf su koyulup okutuldu. Ardından 1'er µl DNA sensöre koyularak ölçüm yapıldı.

Tablo 4.7: Nanodrop ölçüm sonuçları.

İzolat Numarası	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	A260/280
35	84,1	1,81
104	81,7	1,80
129	106,1	1,78

4.9.2. PCR İle 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması ve Analizi



Şekil 4.9: 1) Marker; GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0314; 2) 35 numaralı izolat; 3) 104 numaralı izolat; 4) 129 numaralı izolata ait 16 S rDNA dizisi jel görüntüsü.

Seçilen izolatların tür tanımlaması için 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmıştır. PZR ürünleri 35, 104 ve 129 nolu izolatların PZR agaroz jel görüntüsü resimdeki gibi çıkmıştır. Her bir izolatın 1500 bp bantı çıkmıştır (Şekil 4.9).

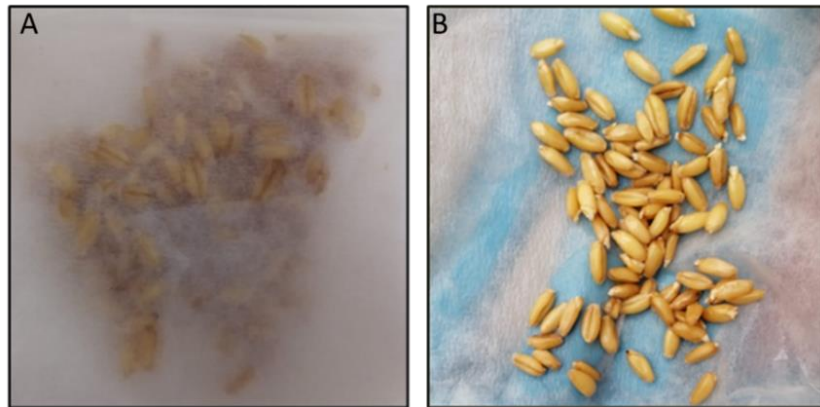
Üç izolatın çoğaltılan 16S rDNA bölgelerinin PZR ürünlerinin çift yönlü dizilemesi hizmet alımı yolu yaptırıldı. 35 ve 104 nolu izolatların çift yönlü dizileme sonuçları BioEdit programı kullanılarak birleştirildi ve elde edilen konsensüs diziler, NCBI’ya kayıt edilerek erişim numaraları talep edildi. 129 nolu izolatın dizileme sonucu ise Arıt, 2022 referans alınarak tabloya eklenmiştir [Arıt, 2022]. Dizileme sonuçlarına bakıldığında 35 nolu izolatın % 99,38 oranında *Pseudomonas putida*’ya ve %99,29 oranında *Pseudomonas hunanensis*’e benzediği belirlendi. 104 nolu izolatın % 99,92 oranında *Pseudomonas putida*’ya ve % 99,92 oranında *Pseudomonas protegens*’e benzediği belirlendi. 129 nolu izolatın ise % 99,42 oranında *Pseudomonas reidholzensis*’e ve %99,28 oranında *Pseudomonas putida*’ya benzediği belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: İzolatların NCBI veri tabanındaki erişim numaraları ve benzetildikleri *Pseudomonas* türlerine benzerlik oranları.

İzolat Numarası	Erişim Numarası	Benzerlik Yüzdesi	Benzetilen Mikroorganizma
35	NCBI erişim numaraları için başvuru yapılmıştır.	%99,38 %99,29	<i>P.putida</i> <i>P.hunanensis</i>
104	NCBI erişim numaraları için başvuru yapılmıştır.	%99,92 %99,92	<i>P.putida</i> <i>P.protegens</i>
129	MZ976852	%99,42 % 99,28	<i>P.reidholzensis</i> <i>P. putida</i>

4.10. *Pseudomonas* İzolatları ile Hazırlanan Biyoformülasyonun Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi Sonuçları

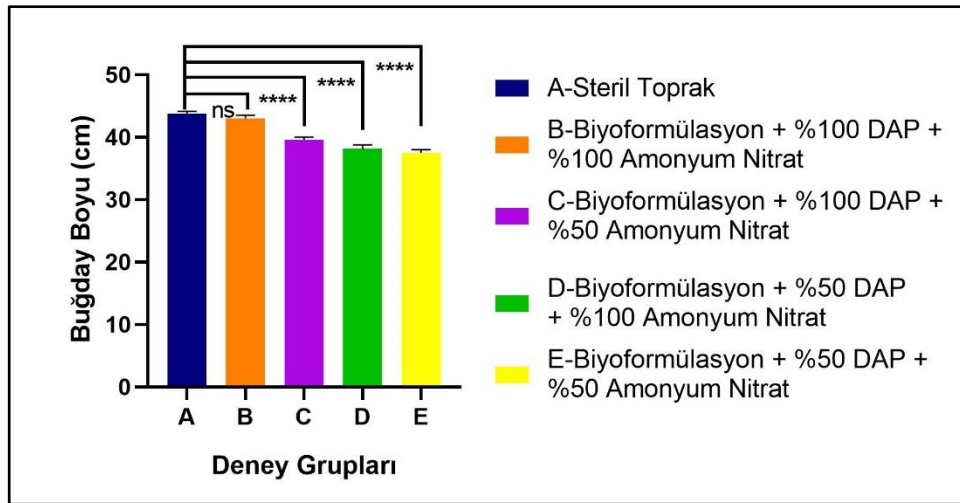
Buğday tohumlarına saksıya ekmeden önce uygulanan ön işlem olan vernalizasyon (Çiçeklenmeyi teşvik etmek veya tohum üretimini arttırmak için tohumların düşük sıcaklıklara maruz bırakılması işlemi) sırasında buğday tohumlarının Şekil 4.10'da gösterildiği şekilde çimlenmeye başladığı görüldü.



Şekil 4.10: A) Nemli kağıtlar arasında bekletilen vernalizasyon işlemi uygulanmış tohumlar B) Tohum vernalizasyonu sırasında çimlenen tohumların görseli.

Buğday tohumları vernalize olduktan sonra 5 grup 5 tekrarlı olmak üzere 25 saksıya ekilerek sonuçlar takip edildi. Buğday bitkileri düzenli olarak takip edilerek 21. haftada buğday bitkisinin boyları (Şekil 4.11), gövde kalınlıkları (Şekil 4.12), kardeş sayıları (Şekil 4.13) ve sarı yaprak sayıları (Şekil 4.14) belirlenerek ölçümleri alındı ve SPSS programı kullanılarak LSD testi ile analiz edildi.

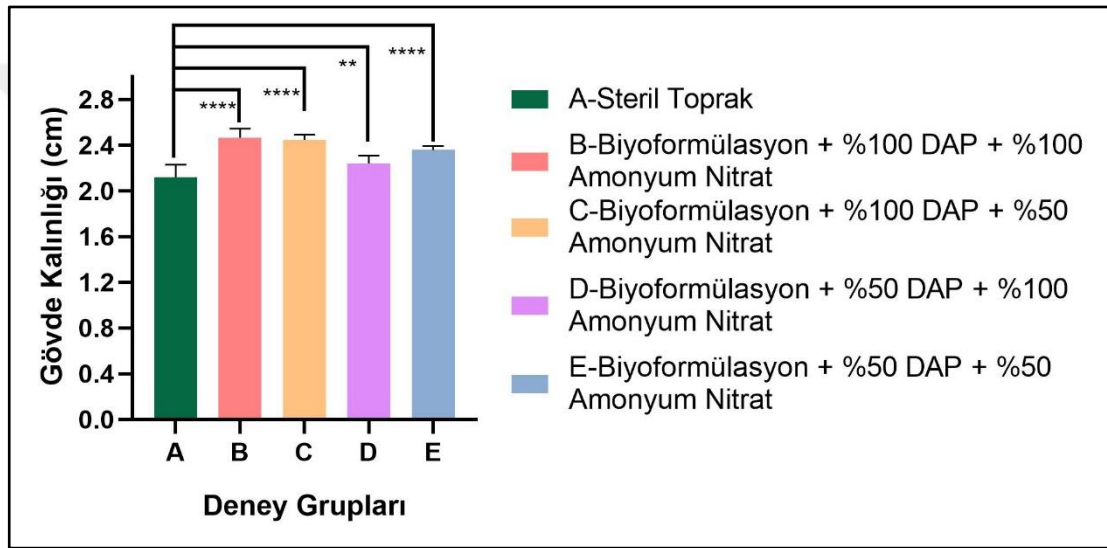
Buğday boyu sonuçlarının analizi için biyogübre formülasyonunun uygulandığı, %100 DAP ve %100 Amonyum Nitrat gübresi içeren B grubu, %100 DAP ve %50 Amonyum Nitrat gübresi içeren C grubu, %50 DAP ve %100 Amonyum Nitrat gübresi içeren D grubu ve %50 DAP ve %50 Amonyum Nitrat gübresi içeren E grubu bitkileri sadece steril toprak içeren A (negatif kontrol) grubu ile kıyaslanmıştır. Analiz sonuçlarına göre kontrol grubu olan A grubu ile B grubu arasında buğday boylarında 21. hafta sonuçlarına göre istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı (ns: not significant) görüldü. A grubu ile C grubu buğday boylarının karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,001$) belirlenmiş ve “****” olarak belirtilmiştir. Benzer şekilde A grubu ile D grubu ve A grubu ile E grubu arasında da buğday boylarının karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,001$) belirlenmiş ve “****” olarak belirtilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Buğdayların 21. haftadaki bitki boyu karşılaştırmaları.

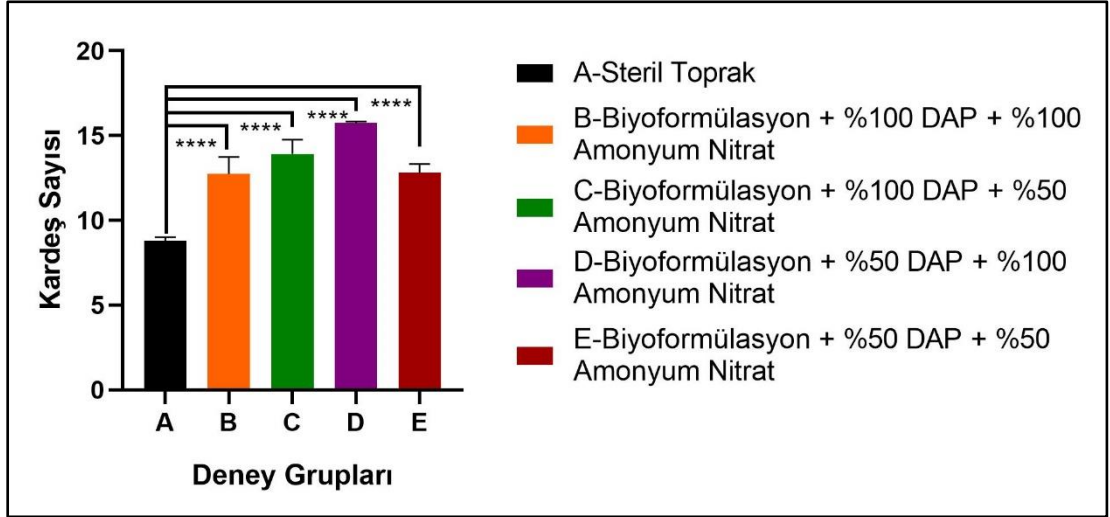
Buğday bitkilerinin gövde kalınlıkları belirlenmiş ve SPSS programı kullanılarak LSD testi ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubu olarak sadece steril toprak içeren buğday bitkileri ile B grubu (biyoförmülasyon + %100 DAP + %100 Amonyum Nitrat) kıyaslandığı zaman anlamlı bir fark olduğu

($p<0,001$) belirlenmiş ve “*****” olarak belirtilmiştir. Kontrol A grubu ile C grubu (biyoformülasyon + %100 DAP ve %50 Amonyum Nitrat) karşılaştırıldığında kontrol grubuna görece istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,001$) belirlenmiş ve “*****” olarak belirtilmiştir. A grubu ile D grubu (biyoformülasyon + %50 DAP ve %100 Amonyum Nitrat) kıyaslandığında ise kontrol grubuna görece istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0.03$) belirlenmiş ve “***” olarak belirtilmiştir. Kontrol A grubu ve E grubu (biyoformülasyon + %50 DAP ve %50 Amonyum Nitrat) karşılaştırıldığında ise istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,001$) belirlenmiş ve “*****” olarak belirtilmiştir (Şekil 4.12).



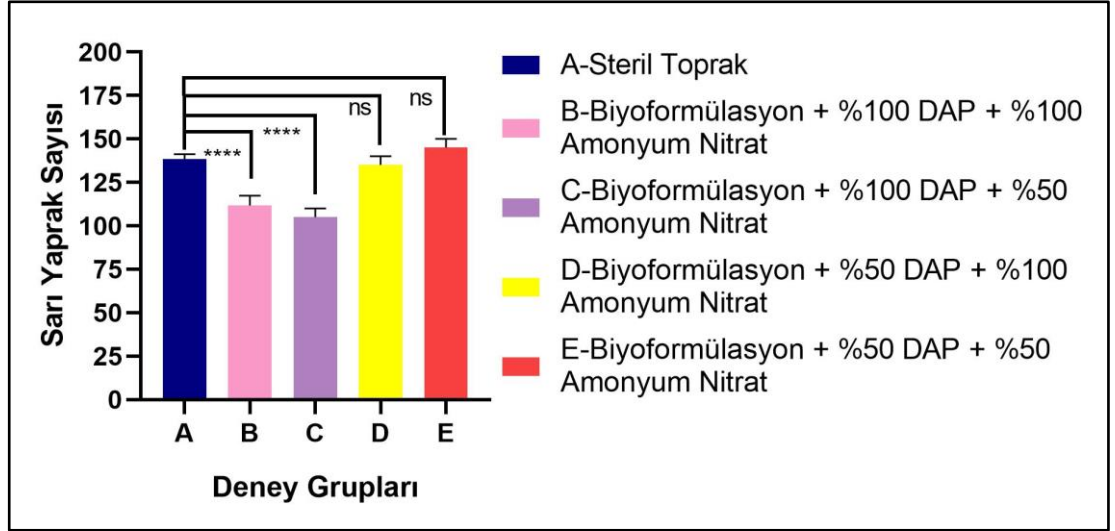
Şekil 4.12: Buğdayların 21. haftadaki gövde kalınlığı karşılaştırmaları.

Buğday bitkilerinin kardeş sayılarının analiz sonuçlarına bakıldığında, kontrol grubu olarak sadece steril toprak içeren buğday bitkileri ile diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında [B grubu (biyoformülasyon + %100 DAP + %100 Amonyum Nitrat, C grubu (biyoformülasyon + %100 DAP ve %50 Amonyum Nitrat), D grubu (biyoformülasyon + %50 DAP ve %100 Amonyum Nitrat), ve E grubu (biyoformülasyon + %50 DAP ve %50 Amonyum Nitrat)] kontrole görece istatistiki olarak anlamlı fark olduğu ($p<0,001$) belirlenmiş ve tüm grupların A grubu ile istatistiki farkı “*****” olarak belirtilmiştir (Şekil 4.13).



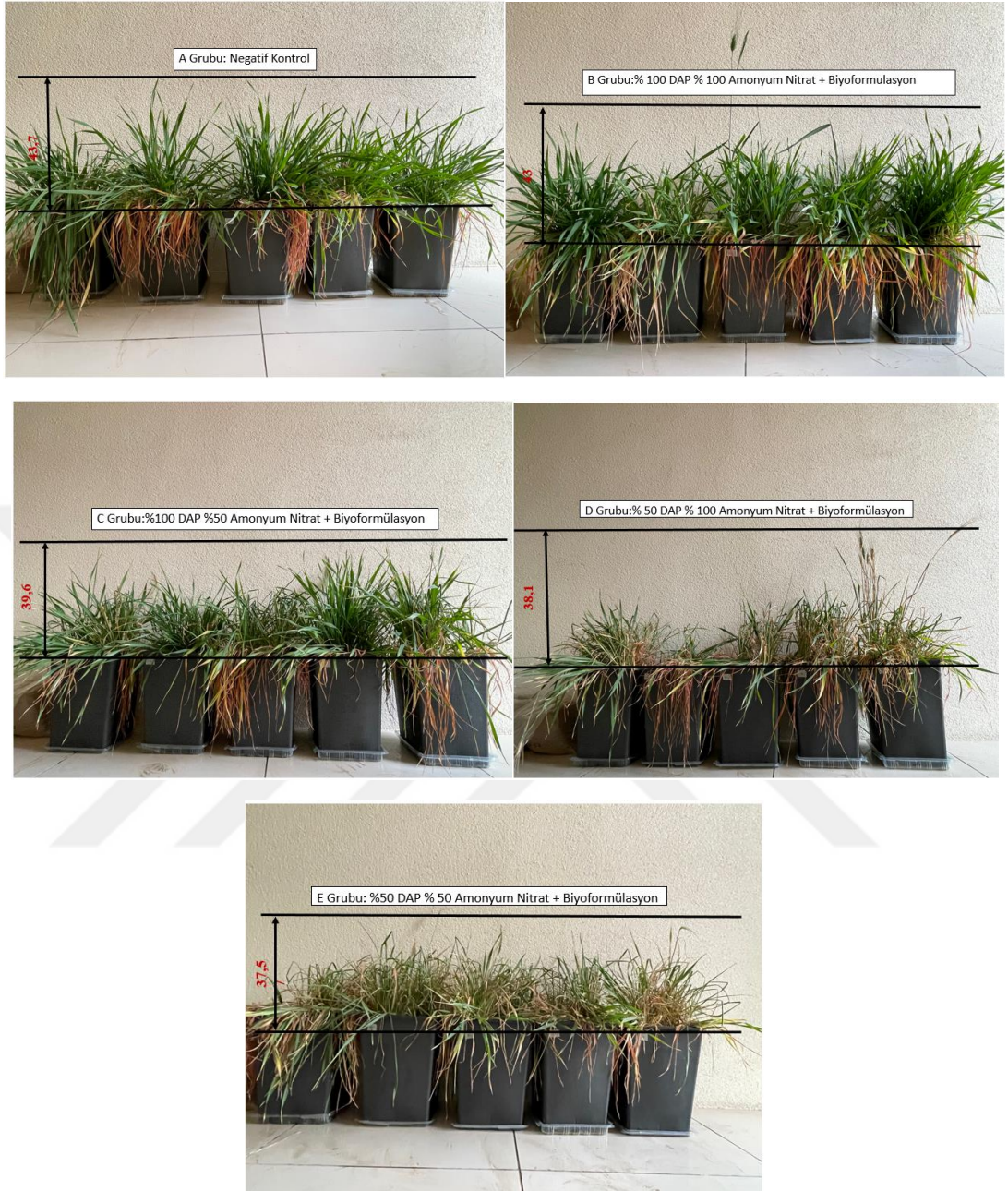
Şekil 4.13: Buğdayların 21. haftadaki kardeş sayıları karşılaştırmaları.

21 hafta sonunda bitkilerin yapraklarında sararmalar gözlemlenmiştir. Bu sararmalar bitkilerde azot eksikliği olduğunu göstermektedir. Deney gruplarının sarı yaprak sayılarına bakıldığında en fazla sarı yaprak ortalama 145 adet ile E grubunda gözlenmiştir. En az sarı yaprak ise ortalama 105 adet ile C grubunda gözlenmiştir. Aynı zamanda sarı yaprak sayılarının analiz sonuçlarına göre kontrol olan A grubunun hem B grubu [B grubu (biyoförmülasyon + %100 DAP + %100 Amonyum Nitrat)], hem de C grubu [C grubu (biyoförmülasyon + %100 DAP ve %50 Amonyum Nitrat)] ile kıyaslandığında ($p < 0.001$) istatistiki olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu olan A grubu ile D [D grubu (biyoförmülasyon + %50 DAP ve %100 Amonyum Nitrat)] ve E gruplarının [(biyoförmülasyon + %50 DAP ve %50 Amonyum Nitrat)] karşılaştırılarak analiz edilmesi sonucu bu iki grupta kontrol grubuna görece istatistiki olarak ($p > 0.05$) anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Buğdayların 21. haftadaki sarı yaprak sayısı karşılaştırmaları.

10.haftadan itibaren bitkilerin steril toprağa ekilen tohumlar haricinde sapa kalkma evresine girmeye başladığı fark edildi. Bu aşamaya kadar olan süreçte B, C, D ve E gruplarına eşit miktarda biyoformülasyon uygulandı fakat kimyasal gübre olarak sadece DAP gübresi uygulandı. Çünkü Amonyum Nitrat gübresi bitkilerin sapa kalkma dönemlerinde verilmektedir. Bu nedenle bitkilerin sapa kalkmaya başladığı 10. hafta itibari ile B, C, D ve E deney gruplarına Amonyum nitrat gübresi verildi ve bitkilerin büyüme durumları düzenli olarak takip edildi. Bitkilerin 21.haftadaki saksı görüntüleri Şekil 4.15'te gösterildi.



Şekil 4.15: 21 haftalık buğday bitkileri.

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında kullanılan 134 izolatın daha önceden yapılan seçici besiyeriyle izolasyon süreçlerini takiben Cetremide agarda büyüebildiği ve cetremide dirençli olduğu belirlenmiştir. Hücre morfolojisi bakımından izolatlar Gram negatif basil formundurlar. Genus seviyesinde ön tanımlama testleri bakımından kontrol bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* ile karşılaştırıldığında izolatların tamamı *Pseudomonas sp.* olarak değerlendirilmiştir [Gül Şeker, 2021; Palleroni,2015]. İlgili izolatlar, PGPR özelliklerine dayalı test sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, 49 izolatın azot fiksasyonu yeteneğine sahip olduğu, 34 izolatın pozitif kontrole görece daha yüksek miktarda IAA üretim yeteneğine sahip olduğu, 123 izolatın siderofor üretim yeteneğine sahip olduğu, 116 izolatın fosfat indirgeme yeteneğine zayıf derecede de olsa sahip olduğu bu tez çalışması ile belirlenmiştir.

Azot (N), hem bitkilerin hem de hayvanların büyüme ve gelişmesi için gereken makro besin elementlerinden biridir. Bitkilerin topraktan azot alımı düştüğü zaman übitki veriminde bir düşüş görülebilir [Atar, 2017]. Bu nedenle bitkilerin topraktan alabileceği azotu fikse edebilme yönünden izolatlar değerlendirildiğinde N içermeyen Nitrogen-free (NFb) besi yerinde, 134 izolatın NFb besiyerinde 49 tanesinden pozitif sonuç alınmıştır. NFb besiyeri brom timol mavisi içermektedir. Azot fiksasyonunun gerçekleştiği durumda besi yerinin pH'ı bazikleşir. Bu duruma bağlı olarak besiyerinin rengi maviye döner. Azot fiksasyonu testi sonuçlarına bakıldığında 134 izolattan kontrol bakterisi *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692)'ya görece en iyi azot fiksasyonu yeteneğine sahip olan izolatın 129 numaralı izolat (+++++) olduğu görülmüştür. *Pseudomonas spp.* genel olarak havadaki serbest azotu fikse etme yeteneğine sahiptir [Palleroni, 2015]. Yapılan test sonucunda 134 izolattan 49'unun azot fikse etme yeteneğine sahip olması *Pseudomonas* Genusunun her üyesinin bu özelliğe yüksek derecelerde sahip olamayacağını ya da N fiksasyon sürecinin karmaşık aşamalarında gerekli koşulların söz konusu izolatlar için gerçekleşmediğini de düşündürmektedir [Li et al., 2017]. Yapılan bir çalışmada bazı *Pseudomonas* türlerinin biyolojik nitrojen fiksasyonu yeteneğine sahip olduğu için toprak patojenlerinin biyolojik kontrolü sayesinde mısır bitkisine yönelik PGPB olarak tanımlandığı bildirilmiştir [Kuan et al., 2016]. Bunlara ek olarak, protein oranı, genetik özellikle belirlenmekle birlikte, azotlu gübre uygulamalarıyla arttırılabilen bir özelliktir [Atar,

2017]. Bu nedenlerden dolayı bitki gelişiminde azotun yeterli ve gerektiği zamanlarda alımı bitki verimini etkileyen önemli parametrelerdendir.

Tez çalışması kapsamında IAA üretim yeteneği Triptofan içeren Luria Bertani (LB) besi yerinde inkübe edilen izolatların Salkowski ayırıcı varlığında spektrometrik ölçüm alınması yöntemiyle incelendi. 134 izolat ile yapılan IAA üretimi testi sonucunda 134 izolattan 34 tanesinin pozitif kontrolden daha yüksek miktarda IAA üretim yeteneğine sahip olduğu sonucu belirlendi. Yapılan örnek bir çalışmada *Pseudomonas sp.* NEEL19'un ürettiği IAA sayesinde çay bitkisinin büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir [Neelakandan, 2021]. Farklı bir çalışmada ise nohut bitkisinin (*Cicer arietinum* L.) rizosferinden izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının önemli oranda IAA üretimi yaptığı ve bir nohut çeşidi olan C235'e aşılandığında, aşılammış bitkilere oranla aşılammış bitkilerin kuru ağırlığını artırdığı belirlenmiştir [Malik and Sindhu, 2011].

Bu tez çalışmasında siderofor üretimi testi Schwyn and Neiland (1987)'in önerdiği şekilde Cas-Blue Agar besi yerinde zon oluşumunun taranması yöntemiyle incelendi. 134 izolata Cas-Blue agar besiyerinde yapılan siderofor üretimi testi sonucunda Tablo 4.3'te gösterilen 134 izolattan 123 tanesinden pozitif sonuç alındı. Gram negatif bakterilerin çoğu siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu için bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* izolatlarının çoğunun siderofor üretme yeteneğine sahip olması beklenen bir sonuçtur [Faraldo-Gómez and Sansom, 2003]. PGPB tarafından üretilen sideroforların bitki büyümesi üzerindeki faydalı etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, bazı çalışmalarda, Maş fasulyesi bitkileri, siderofor üreten *Pseudomonas* suşu GRP3 ile aşılandığında ve demir eksikliği olan topraklarda büyütüldüğünde, kontrol bitkilerine görece klorofil seviyesi arttığı belirlenmiştir. Farklı bir çalışmada, bitkilerin ağır metal kirliliği gibi stres koşullarında demir alımının çok önemli olduğu bildirilmiştir. Bu durumda sideroforların, ağır metallerin bitkiler üzerindeki zararlı etkilerini hafiflettiği belirlenmiştir [Saeed et al., 2021; Sharma et al., 2003]. Bir diğer çalışmada ise mısır bitkisinde *Cephalosporium maydis*'in neden olduğu geç solgunluk hastalığı ile mücadele için *B.subtilis* ve *P.koreensis* suşlarının, *Cephalosporium maydis*'e karşı antagonistik aktivite sergileyen siderofor üretimi sayesinde mısır bitkisi ile birlikte aşılmasının bu hastalığın inhibe edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca mısırın *B.subtilis* ve *P.koreensis* suşları ile birlikte aşılmasının bitkide toplam klorofil ve karotenoidlerde artış olduğu bildirilmiştir [Ghazy and El-Nahrawy, 2021] .

Diğer bir PGPB özelliği olarak araştırılan inorganik fosfat çözebilme yeteneği Ca_3PO_4 içeren Pikovskaya besi yerinde zon oluşumunun taranması yöntemiyle incelendi. 134 izolata Pikovskaya besiyerinde yapılan inorganik fosfat çözebilme testi sonucunda 134 izolattan 116 tanesinden kontrole görece zayıf da olsa pozitif sonuç alındı (Tablo 4.4). Toprakta çözünmüş formda bulunan fosfat konsantrasyonun çok düşük (1 ppm veya daha az) olması nedeniyle bitkiler tarafından alımı çok düşük seviyededir. Bu nedenle tarımda fosfatlı gübreler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasal gübrelerin uygulamadan kısa bir süre sonra toprak moleküllerine bağlanarak veya çökerek bitkiler için elverişsiz hale gelmesi ve çevre için zararlı etkilerinin olması nedeniyle günümüzde bu alanda PGPB'lerin kullanımı yaygınlaşma eğilimindedir. Yapılan bir çalışmada *Allium cepa* L. çimlenmesi ve büyümesi için biyo-gübre olarak *Pseudomonas* sp. ve *Serratia* sp. kullanılmıştır. Tohum çimlenmesi sırasında tohumlar yüksek oranda fosfata ihtiyaç duyduğu için bu çalışmada inorganik fosfat kaynağı olarak *Pseudomonas* sp. ve *Serratia* sp. kullanılmıştır. Bu çalışma ile *Pseudomonas* sp. ve *Serratia* sp. ile aşılanan tohumlarda çimlenme oranının aşılama yapılmayan tohumlar ile karşılaştırıldığında %90 oranında arttığı bildirilmiştir [Blanco-Vargas et al., 2020].

Bu aşamadan itibaren bir sonraki deney olan biyofilm testinden önce Tablo 4.5'te gösterilen 134 izolatın azot fiksasyonu, IAA üretimi, siderofor üretimi ve fosfat indirgeme test sonuçları karşılaştırdı. Bu 4 test referans alınarak en iyi PGPB özelliği sonuçlarına sahip olan 44 adet izolat seçildi ve testlere bu izolatlar ile devam edildi.

Biyofilm çevrede sık rastlanabilen bir mikrobiyal yaşam ve yerleşim alanıdır. Çeşitli mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve yaşamsal faaliyetleri bakımından elverişli bir ortam için oluşturdukları bir mikro-ekosistemdir [Temel ve Eraç, 2018]. Bitki rizosferinde bulunan bakteriler, tek bir bakteri türü ile veya birden fazla bakteri türü ile bir araya gelerek rizosferde biyofilm oluşturabilirler. Bu bakteriler, biyofilm oluşturma yetenekleri sayesinde bitkiler için yararlı olan bakterileri bitki rizosferinde belirli güçlü sinyaller aracılığı ile bir araya toplayabilmektedir. Bu şekilde bitki rizosferinde oluşturulan biyofilm yapısı, bitkiler için faydalı özelliğe sahip olacak ve onların büyüme gelişmelerini destekleyebilecek bir mikrobiyal topluluk ile bir arada yaşayabilecektir. Bu nedenle yapılan biyofilm testi sonuçlarına göre diğer izolatlara ve kontrole görece kıyaslanarak daha iyi değere sahip olan izolatlar belirlenmiştir. Biyofilm testi sonuçları da değerlendirilerek 44 adet

izolat arasından 6, 30, 35, 44, 68, 88, 104, 113, 120 ve 129 numaralı 10 izolat seçildi ve diğer testlere bu 10 izolat ile devam edildi.

Çalışmanın bu aşamasında bakterileri üst üste çizme yöntemi (Cross-streak) kullanılarak birlikte yaşayabilme durumları değerlendirildi. Bu yöntem sonucunda 35, 104 ve 129 numaralı izolatların diğer izolatlarla kıyaslandığı zaman daha uyumlu şekilde birlikte yaşayabilecekleri belirlendi. 35 numaralı izolat hem çok iyi derecede IAA üretimi yapabildiği için hem de iyi seviyede biyofilm oluşturma yeteneği açısından çok iyi değerlere sahip olduğu için seçildi. 104 numaralı izolat iyi derecede siderofor üretimi yeteneğine sahip olması açısından biyoförmülasyon için aday olarak seçildi. 129 numaralı izolat çok iyi azot fiksasyonu yeteneğine sahip olduğu için biyoförmülasyon adayı olarak seçildi. Ayrıca bu 3 izolat da fosfat çözebilmeye yeteneği açısından birbirine benzer yeteneğe sahip olduğundan güçlü biyoförmülasyon adayı olarak seçildi.

Seçilen 3 izolatın da 16S rDNA dizilerinin NCBI verileri ile karşılaştırılması sonucu, 35 nolu izolatın % 99,38 oranında *Pseudomonas putida*'ya, 104 nolu izolatın % 99,92 oranında *Pseudomonas putida*'ya ve 129 nolu izolatın ise % 99,42 oranında *Pseudomonas reidholzensis*'e benzediği belirlendi. Dizileme sonuçları değerlendirildiğinde 3 izolatın da ortak olarak %99,28 ve daha yüksek oranda *P.putida*'ya benzemesi bu izolatların birbirlerine yakın alanlardan izole edildiği için benzer özelliklere sahip olabileceği kanısını destekler niteliktedir.

Yukarıda seçilme gerekçeleri detaylı olarak ifade edilen 35, 104 ve 129 numaralı izolatlar ile birlikte hazırlanan biyoförmülasyon saksı denemelerinde buğday bitkisi ile bir araya getirildi, Bu amaçla kullanılan deneme toprağının analiz sonuçlarına (Tablo 4.8) göre deneme toprağı; nötr, ülkemiz için belirlenen EC sınır aralık değerleri ile uyumlu, tuzsuz, tınlı, iyi seviyede organik madde içeriğine sahip, fazla kireçli, çok yüksek fosfor 58 içeriğine sahip, toplam azot oranı bakımından azotça fakir bir toprak olduğu tespit edildi. Azot fiksasyonu, IAA üretimi, siderofor üretimi ve fosfat indirgeme ve biyofilm oluşturma yeteneği için seçilmiş izolatların deneme bitkisi olan makarnalık buğday *Triticum aestivum* L. Emin Bey çeşidinin gelişimine etkileri tespit edildi. Tasarlanan saksı denemelerinin kurgusu ve özellikle organik maddece zengin olan deney toprağının steril edilerek mikroorganizmalardan arındırılmış olması 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 (%50

ve %100)] bitki için uygun hale getirerek bitki gelişimine katkısının takibi için bir başlangıç noktası olmuştur. Kullanılan deney toprağındaki organik ve inorganik madde içeriğı her zaman bitkinin kullanabileceğı forma uygun olmayabilir. Bu aşamada toprağın kimyasal potansiyelini hareketlendiren mikroorganizmaların katkısı yadsınamaz. Kullanılan deney toprağı aynı zamanda CaCO_3 açısından zengin yani kireçli bir topraktır. Ayrıca toprağın pH'sının nötr (6,9) değerlerde olması mikroorganizma denemeleri için toprağın pH'sinin uygun olduğunu göstermektedir.

Tüm bunlar dikkate alındığında ekimden sonra 21. haftada yapılan verim analizlerinden biri olan buğday bitkilerinin boy uzunluğu bitkilerin tüm gövdeleri toprak üstünden yaprak ucuna kadar ölçülerek bitki boyu belirlendi. Analizler, SPSS programı programı kullanılarak One way ANOVA seçilerek LSD testi ile gerçekleştirildi. Yapılan istatistiki buğday bitkilerinin boy uzunlukları arasında kontrol grubuna görece anlamlı farklar olduğu belirlendi. A (Kontrol) grubu bitkilerinin boy uzunluğu ortalaması 43.7 cm iken B grubundaki bitkilerin ortalama boy uzunluğu 43 cm, C grubundaki bitkilerin ortalama boy uzunluğu 39.6 cm, D grubundaki bitkilerin ortalama boy uzunluğu 38.1 cm, E grubundaki bitkilerin ortalama boy uzunluğu 37.5 cm olarak belirlenmiştir. Bu durumda en yüksek bitki boyu ortalamasına sahip olan grup kontrol olan A grubu bitkileridir. 10.haftada yapılan buğday bitkisinin boy ölçümüne göre kontrol grubundaki bitkilerin boy uzunluğu ortalaması diğer deney gruplarındaki bitkilerin boy ortalamasından daha düşük iken 21.haftada kontrol grubu bitkilerinin diğer deney gruplarından daha yüksek boy uzunluğu ortalamasına sahip olduğu belirlenmiştir. B, C, D ve E grubundaki bütün buğday bitkilerine eşit oranda biyoformülasyon eklenmiştir ve belirli oranlarda DAP ve Amonyum nitrat gübreleri uygulanmıştır. Literatürde, uzun boylu buğday çeşitlerinde asimilatlar sap uzaması için tüketildiğı, kısa boylu buğday çeşitlerinde bu asimilatların fazla fertil kardeş için kullanıldığı bilgisi yer almaktadır. Bu nedenle kısa boylu buğday çeşitlerinde dane verimi yüksek olduğu, kısa boylu buğday çeşitlerinin uzun boylu çeşitlere göre daha sağlam saplara ve daha yüksek hasat indeksine sahip olduğu belirtilmektedir. Orta boylu buğday çeşitlerinde uzun boylu buğday çeşitlerinden daha fazla fertil kardeş ve başakta daha fazla dane üretebilmektedir [Soylu ve Sade, 2003]. Bu bilgiler ışığında, kontrol A grubu bitkilerinde boy uzunluğunun diğer deney gruplarından daha fazla olmasına rağmen bu grupta hiç başak olmaması, buna karşın B grubu bitkilerinde 3, C grubu bitkilerinde 2, D grubu bitkilerinde 8 ve E grubu bitkilerinde 2 tane başak olması buğday boy uzunluğu ile buğday verimi arasındaki ters orantıyı destekler niteliktedir.

B grubu bitkilerinin A kontrol grubuna kıyasla boy uzunluğu yakın olmakla birlikte bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. C grubu bitkilerinin A kontrol grubuna görece boy uzunluğunun daha kısa olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. En düşük buğday boy uzunluğuna sahip olan 2 grup D ve E grupları iken en yüksek başak sayısı yine D grubunda gözlenmiştir. Böylelikle bu grupların kontrol grubu ile istatistiksel olarak farklı olduğu ve daha fazla verime sahip olduğu belirlenmiştir.

Buğday bitkilerinin gövde kalınlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. 21. haftada bitkilerin gövde kalınlıklarına bakıldığında A grubunun en az gövde kalınlığı gösterdiği görülmüş ve kontrol grubuna kıyasla B grubu (biyoformülasyon + %100 DAP + %100 Amonyum nitrat), C grubu (biyoformülasyon + %100 DAP + %500 Amonyum nitrat), D grubu (biyoformülasyon + %50 DAP + %100 Amonyum nitrat) ve E grubu (biyoformülasyon + %50 DAP + %50 Amonyum nitrat) arasında istatistiksel olarak fark olduğu belirlenmiştir. 10.haftada alınan ölçümlerde sapa kalkma evresine kadar geçen süreçte tüm gruplar arasında önemli bir fark görülmezken, 10. haftada gübre uygulamasının gövde kalınlığında fark oluşturmaya başladığı belirlenmiştir. Bu durum, kimyasal gübrelere ek olarak *Pseudomonas sp.* izolatları ile hazırlanan biyoformülasyonun da gövde kalınlığında artışı desteklediğini göstermektedir.

Kardeş sayısı buğday tohumunun çeşidine ve çevre şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Tohumun genetik kökenine göre bazı çeşitler diğerlerinden daha fazla kardeşlenme potansiyeline sahiptir. Kışlık ve yazlık çeşitler karşılaştırıldığında genellikle kışlık ve kısa boylu olan çeşitler daha fazla kardeşlenme potansiyeli taşırlar. Aynı zamanda buğday çeşidinin dışında buğday bitkisi; verimli topraklarda ve seyrek ekildiğinde sıcaklık, nem ve ışık uygun olduğunda daha fazla kardeş oluşturur. Yüksek sıcaklık, kuraklık, sık ekim, hastalık gibi stres koşullarında buğday tohumlarının kardeş sayısı düşük olabilir veya hiç kardeşlenmez [Mızrak, 2018]. Bu tez çalışması kapsamında buğday bitkileri, bitki büyümesi için elverişli sıcaklık ve nem koşullarına sahip serada yetiştirilmiştir. Her bir tohumdan çıkan kardeş sayıları karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Çünkü 10.haftaya kadar buğday bitkilerinin sapa kalkma dönemi gerçekleşmedi. Buğday bitkilerinin sapa kalkma evresi Zadoks skalası referans alındığında tohumların ekildiği günden itibaren 80.günden itibaren gerçekleşebilmektedir. Bu aşamada sapa kalkma evresiyle birlikte bitkilere Amonyum Nitrat gübrelere B ve D deney gruplarına %100, C ve E deney gruplarına %50 oranda uygulandıktan sonra kardeşlenme sayılarında önemli artışlar

olduğu belirlenmiştir. En fazla kardeşlenme sayısına sahip olan grup D grubu buğday bitkileri olmakla beraber tüm deney grupları A (kontrol) grubu bitkilerinden daha yüksek kardeşlenme oranına sahiptir. Kardeşlenme sayısının yüksek olması, elde edilecek başak sayısının daha fazla olması ile doğru orantılı olduğu için buğday bitkisinin önemli verim parametrelerinden biridir. Kimyasal gübrelerin %50 oranında azaltılarak uygulandığı E grubu bitkilerinin kardeşlenme durumuna baktığımızda, kimyasal gübrelerin en yüksek oranda uygulandığı B grubu (%100 DAP ve %100 Amonyum nitrat) ile aynı sayıda kardeş sayısına sahip olduğu görülmektedir. Bu durumda, kimyasal gübrelerin azaltılmasına rağmen E grubu bitkilerinde kardeşlenme sayısının iyi olması *Pseudomonas sp.* bakterileri ile oluşturulan biyoformülasyonun buğday bitkilerinin kimyasal gübreden bağımsız olarak kardeşlenme sayılarının artmasına etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

21. haftada görülen sarı yapraklar en fazla A (steril toprak) ve E (biyoformülasyon + %50 DAP + %50 amonyum nitrat) gruplarında görülmekle birlikte en az B (biyoformülasyon + %100 DAP + %100 amonyum nitrat) ve C (biyoformülasyon + %100 DAP+%50 amonyum nitrat) gruplarında görülmüştür. Sarı yapraklar bitkilerde azot eksikliği olduğunun işaretidir. Bitkilerde B ve C gruplarında kontrol grubuna kıyasla sarı yaprak sayısındaki azalma, biyoformülasyon ile birlikte kimyasal gübrenin etkisinin bitkide daha az sarı yaprak oluşumuna destek verdiğini düşündürmektedir. Ayrıca amonyum nitrat oranının yarı yarı azaltılmasına karşın C grubu bitkilerinde B grubu ile karşılaştırıldığında daha az sarı yaprak olması ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olması biyoformülasyonun azot eksikliğini giderilmesini desteklediğini göstermektedir.

- Gelecek Öngörüler ve Sonuçların Değerlendirilmesi:

PGPB özellikleri açısından taranan 3 adet izolat 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanarak 35 no'lu izolat %99,38 oranında *P. putida* 'ya, 104 no'lu izolat %99.92 oranında *P. putida* 'ya ve aynı oranda *P. protegens* 'e benzetilmiştir. *P. protegens* bakterisinin literatürde bitki koruyucu genlere sahip olduğu belirtilmiştir [Andreolli et al., 2019]. 104 no'lu izolat PGPB özellikleri açısından taranarak bu özelliklere sahip olduğu belirlenen bir izolatır. Bu yönden *P. protegens* bakterisi de olabileceği öngörülmektedir (Bkz EkA). Aynı zamanda *P. protegens* 'in genomunun sekanslandığı ve yakın tarihte *P. fluorescens* 'ten ayrıldığı bildirilmiştir. Arıt' ın (2022) Yüksek Lisans tezinde ise 129 no'lu izolatın %99,42 oranında *P. reidholzensis* 'e benzediği

belirtilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla seçilen bu 3 izolatın hangi bakteriye daha yakın olduğu belirlenerek literatüre kazandırılması mümkündür. Tüm bunlara ek olarak, tez çalışması kapsamında Petri ve spektroskopik yöntemler ile belirlenen PGPR aktivite (IAA ve azot üretimi) sonuçlarının HPLC ve GC gibi ileri analitik yöntemler ile fosfat indirgeme yeteneğinin de GCD geninin varlığına ve var ise ekspresyon seviyesine moleküler teknikler ile (sırasıyla PZR ve gerçek zamanlı PZR) doğrulanması önem arz etmektedir.



KAYNAKÇA

Ahemad M., Kibret M., (2014), “Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective”, Journal of King Saud University - Science, 26(1), 1–20.

Ali S. Z., Sandhya V., Rao L. V., (2014), “Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp.”, Annals of Microbiology, 64(2), 493–502.

Andreolli M., Zapparoli G., Angelini E., Lucchetta G., Lampis S., Vallini, G., (2019), “*Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens”, Microbiological research, 219, 123-131.

Anonim, (2007), “Tarım/Bitkisel Üretim İstatistikleri”, Türkiye İstatistik Kurumu, www.tuik.gov.tr (Erişim Tarihi: 20.06.2019).

Arıt T., (2022), “Azotu fikse edebilen yerel *pseudomonas* sp. türlerinin araştırılması ve buğday bitkisi üzerinde morfolojik ve fizyolojik etkilerinin gösterilmesi”, Yüksek Lisans tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Atar B., (2017), “Buğdayda Verim Esaslı Azotlu Gübreleme”, Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21(4), 524-536.

Atar B., (2017), “Gıdamız buğdayın, geçmişten geleceğe yolculuğu”, Yalvaç Akademi Dergisi, 2(1), 1-12.

Avan M., Kotan R., (2021), “Fungusların Mikrobiyal Gübre veya Biyopestisit Olarak Tarımda Kullanılması”, Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi, 3(1), 167–191.

Aydoğan M. N., Algur Ö. M., Özdemir M., (2013), “Isolation and characterisation of some bacteria and microfungus solving tricalcium phosphate”, Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 1, 11-20.

Aydoğan S., Akçacık A. G., Şahin M., Önmez H., Demir B., Yakışır E., (2013), “Ekmeklik buğday çeşitlerinde fizikokimyasal ve reolojik özelliklerin belirlenmesi”, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 22(2), 74-85.

Bektaş İ., (2021), “Toprakta Bazı Bakterilerin Fosfat Çözünürlüğü ile Organik Asit Üretimi Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi”, Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 8(1), 66-76.

Blanco-Vargas A., Rodríguez-Gacha L. M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho L. D., Poutou-Piñales R. A., Pedroza-Rodríguez A. M., (2020),

“Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion”, *Heliyon*, 6(10), e05218.

Chauhan A., Guleria S., Balgir P. P., Walia A., Mahajan, R., Mehta P., Shirkot C. K., (2017), “Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 294.

Chojnacka K., Moustakas K., Witek-Krowiak A., (2020), “Bio-based fertilizers: A practical approach towards circular economy”, *Bioresource Technology*, 295, 122223.

Çelik Y., Yarşı G., (2020), “Yararlı bakteri uygulamalarının bitkisel verim ve dayanıklılık mekanizmalarına etkileri”, *Dünya Sağlık ve Tabiat Bilimleri Dergisi*, 3(1).

Çakmakçı R., (2005),” Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(1), 97-107.

Da Silva M. L. P., Moen F. S., Liles, M. R., Feng Y., Sanz-Saez A., (2022), “The Response to Inoculation with PGPR Plus Orange Peel Amendment on Soybean Is Cultivar and Environment Dependent”, *Plants*, 11(9).

Ellermann M., Arthur J. C. (2017), “Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions”, *Free Radical Biology and Medicine*, 105, 68.

Faraldo-Gómez J. D., Sansom M. S., (2003), “Acquisition Of Siderophores In Gram Negative Bacteria”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2), 105

Gautam K., Sirohi C., Singh N. R., Thakur Y., Jatav S. S., Rana K., Chitara M., Meena R. P., Singh A. K., Parihar M. (2021), “Microbial biofertilizer: Types, applications, and current challenges for sustainable agricultural production”, *Biofertilizers: Volume 1: Advances in Bio-Inoculants*, 3–19.

Ghazy N., El-Nahrawy S., (2021), “Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant”, *Archives of microbiology*, 203(3), 1195-1209.

Gordon S. A., Weber R. P., (1951), “Colorimetric Estimation Of Indoleacetic Acid”, *Plant Physiology*, 26(1), 192.

Ghosh S. K., Bera T., Chakrabarty A. M., (2020), “Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences”, *Biological Control*, 144, 104214.

Gouda S., Kerry R. G., Das G., Paramithiotis S., Shin H. S., Patra J. K., (2018), “Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture”, *Microbiological research*, 206, 131-140.

Grady E. N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z. C., (2016), “Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review”, *Microbial Cell Factories*, 15(1), 203.

Guo Z., Wan S., Hua K., Yin Y., Chu H., Wang D., Guo, X., (2020), “Fertilization regime has a greater effect on soil microbial community structure than crop rotation and growth stage in an agroecosystem”, *Applied Soil Ecology*, 149, 103510.

Guo Y., Wang J., (2021), “Spatiotemporal Changes of Chemical Fertilizer Application and Its Environmental Risks in China from 2000 to 2019”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(22).

Gül E. N., Altuntaş E., Kırmık G., (2021), “Yerel bazı makarnalık buğday (*Triticum durum* L.) çeşitlerine ait tohumların fiziksel özellikleri ile renk karakteristiklerinin belirlenmesi”, *Uluslararası Biyosistem Mühendisliği Dergisi*, 2(2), 131-142.

Han Z., Liu Y., Deng X., Liu D., Liu Y., Hu Y., Yan, Y., (2019), “Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *BMC Genomics*, 20(1).

Hashem A., Tabassum B., Fathi AbdAllah E., (2019), “*Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291.

Hassen A. I., Bopape F. L., Sanger L. K., (2016), “Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants”. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives*, 23–36.

Islam F., Yasmeen T., Ali Q., Ali S., Arif M. S., Hussain S., Rizvi H., (2014), “Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 285-293.

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.

Karaşahin M., (2014), “Bitkisel üretimde azot alım etkinliği ve reaktif azotun çevre üzerine olumsuz etkileri”, *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 2(3), 15-21.

Kars N., Ekberli İ., (2019), “Çarşamba ovasının buğday bitkisi altındaki topraklarının bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelenmesi”, *Toprak Su Dergisi*, 8(1), 18-28.

Ke J., Wang B., Yoshikuni Y., (2021), “Microbiome Engineering: Synthetic Biology of Plant-Associated Microbiomes in Sustainable Agriculture”, *Trends in Biotechnology*, 39(3), 244–261.

Khatoon Z., Huang S., Rafique M., Fakhar A., Kamran M. A., Santoyo G., (2020), “Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems”, *Journal of Environmental Management*, 273, 111118.

Kumar M., Prakash Giri V., Pandey S., Gupta A., Patel M. K., Bajpai A. B., Jenkins S., Siddique K. H. M., Maeda A., Caligo M. A., (2021), "Molecular Sciences Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Emerging as an Effective Bioinoculant to Improve the Growth, Production, and Stress Tolerance of Vegetable Crops", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12245.

Kumar M., Singh Tomar, R., Lade H., Paul D., (2016), "Methylotrophic bacteria in sustainable agriculture", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 1-9.

Kumlay A. M., Eryiğit T., (2011), "Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları", *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(2), 47-56.

Küçük Ç., Almaca A., (2020), "Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler tarafından üretilen metabolitler ve bitki gelişimine etkileri", *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(1), 81-94.

Ladha J. K., de Bruijn F. J., Malik K. A., (1997), "Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice - a frontier Project", *Plant and Soil* 1997 194:1, 194(1), 1–10.

Lane D. J., (1991), "16s/23s Rrna Sequencing", *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115-175.

Li H. B., Singh R. K., Singh P., Song Q. Q., Xing Y. X., Yang L. T., Li Y. R., (2017), "Genetic Diversity Of Nitrogen-Fixing And Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated From Sugarcane Rhizosphere", *Frontiers In Microbiology*, 8, 1268.

Lin W., Lin M., Zhou H., Wu H., Li Z., Lin W., (2019), "The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards", *PLoS ONE*, 14(5).

Lindström K., Mousavi S. A., (2020), "Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia", *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314.

López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E., (2007), "Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*", *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20 (2), 207-217.

Louden B. C., Haarmann D., Lynne A. M., (2011), "Use Of Blue Agar Cas Assay For Siderophore Detection", *Journal Of Microbiology and Biology Education*, 12(1), 51-53.

Malik D. K., Sindhu S. S., (2011), "Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*)", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(1), 25-32.

Mehta P., Walia A., Kakkar N., Shirkot, C. K., (2014), "Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities", *Acta physiologiae plantarum*, 36(8), 2033-2045.

Meraklı N., Memon, A., (2020), "Role of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) in Plant Growth and Development: Soil-Plant Relationship", *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(12), 2590-2602.

Mızrak G., (2018), "Topraktan Sofraya Buğday", *Gürbüz Mızrak*

Miransari M., (2011), "Soil microbes and plant fertilization", *Applied microbiology and biotechnology*, 92(5), 875-885.

Neelakandan P., Young C. C., Hameed A., Wang Y. N., Chen K. N., Shen F. T., (2021), "Volatile 1-octanol of tea (*Camellia sinensis* L.) fuels cell division and indole-3-acetic acid production in phylloplane isolate *Pseudomonas* sp. NEEL19", *Scientific reports*, 11(1), 1-12.

Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Shinwari Z. K., Khan A. L., Ahmed A. H., (2018), "Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: a review", *Microbiological research*, 209, 21-32.

Olanrewaju O. S., Glick B. R., Olubukola Babalola O., (2017), "Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 197.

Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio L., (2008), "Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling", *Plant Signal. Behav.*, 263-265.

Özberk İ., Zencirci N., Özkan H., Özberk F., Eser V., (2010), "Dünden Bugüne Makarnalık Buğday Islahı ve Geleceğe Bakış", *Makarnalık Buğday ve Mamulleri Konferansı*, 17-18 Mayıs 2010, 43-66.

Palleroni N. J., (2015), "Pseudomonas. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria", John Wiley & Sons, Inc, 10, 9781118960608.

Raio A., Puopolo G., (2021), "Pseudomonas chlororaphis metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), 99.

Raymond J., Siefert J. L., Staples C. R., Blankenship R. E., (2004), "The Natural History of Nitrogen Fixation", *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541-554.

Saeed Q., Xiukang W., Haider F. U., Kučerik J., Mumtaz M. Z., Holatko J., Naseem M., Kintl A., Ejaz M., Naveed M., Brtnicky M., Mustafa A., (2021), "Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated

Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19).

Sajeed Ali S., Vidhale N., (2013), “Review Article Bacterial Siderophore and their Application: A review”, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(12), 303–312.

Santoyo G., Urtis-Flores C. A., Loeza-Lara P. D., Orozco-Mosqueda M. D. C., Glick B. R., (2021), “Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)”, *Biology*, 10(6).

Savcı S., (2012). “An agricultural pollutant: chemical fertilizer”, *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73.

Schwyn B., Neillands J. B., (1987), “Universal Chemical Assay For The Detection And Determination Of Siderophores”, *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.

Sharma R., Shrivastava V. L., Sharma, S., (2021), “Effect of substitution of chemical fertilizer by bioinoculants on plant performance and rhizospheric bacterial community: case study with *Cajanus cajan*”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(1), 373.

Shelar A., Singh A. V., Maharjan R. S., Laux P., Luch A., Gemmati D., Patil R., (2021), “Sustainable agriculture through multidisciplinary seed nanoprimer: Prospects of opportunities and challenges”, *Cells*, 10(9), 2428.

Singana H., Paola Moreno S., Hussain Dar M., (2006), “Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review”, *Related papers Bacterial Biofertilizers for sustainable crop production: A review Dataset*, February 2013.

Soylu S., Sade B., (2016), “Makarnalık Buğdaylarda (*Triticum Durum* L.) Bitki Boyu, Hasat İndeksi Ve Bunlara Etkili Faktörlerin kombinasyon Yeteneği Ve Kalıtımı”, *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 13(1).

Stamenković S., Beškoski V., Karabegović I., Lazić M., Nikolić N., (2018), “Funding: Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia”, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), 2171–2922.

Suleman M., Yasmin S., Rasul M., Yahya M., Atta B. M., Mirza M. S., (2018), “Phosphate Solubilizing Bacteria With Glucose Dehydrogenase Gene For Phosphorus Uptake And Beneficial Effects On Wheat”, *PloS one*, 13(9), e0204408.

Tarımorman, (2021), Eminbey, Tarım ve Orman Bakanlığı

Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A., (2020), “*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25.

Thudi M., Palakurthi R., Schnable J. C., Chitikineni A., Dreisigacker S., Mace E., Srivastava R. K., Satyavathi C. T., Odeny D., Tiwari V. K., Lam H. M., Hong Y. bin, Singh V. K., Li G., Xu Y., Chen X., Kaila S., Nguyen H., Sivasankar S., Varshney R. K., (2021), “Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture”, *Journal of Plant Physiology*, 257.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M. L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C., (2013), “Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning”, *Frontiers in Plant Science*, 4(SEP).

Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq Boyce A., (2016), “Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review”, *Molecules*, 21(5), 573.

Vurukonda S. S. K. P., Giovanardi D., Stefani, E., (2018), “Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4).

Yang Z. J., Wu X. H., Huang L. M., Xie W. W., Chen Y., El-Kassaby Y. A., Feng J. L., (2021), “Soil Bacteria to Regulate *Phoebe bournei* Seedling Growth and Sustainable Soil Utilization under NPK Fertilization”, *Plants*, 10(9).

Yayla Ş. R., Şenol N., (2020), “Tarımda Kullanılan Bazı Mikrobiyal Gübrelerin *Eisenia Foetida* Deri Dokusu Üzerinde Etkisinin Morfolojik Açıdan Değerlendirilmesi”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 15(2), 213-223.

Yunus K., Polat, N., (2021), “Bitki İndeksleri Kullanarak Buğday Bitkisinin Rekolte Tahmini” *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi*, 12(1), 99-110.

Yüzbaşıoğlu R., (2020), “Üreticilerin Kimyasal Gübre Kullanım Bilinç Düzeylerinin İncelenmesi: Tokat Merkez İlçe Örneği”, *Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Turkish Journal of Agricultural Engineering Research*, 1(2): 452-465.

Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F., (1974), “A Decimal Code For The Growth Stages Of Cereals”, *Weed Research*, 14(6), 415-42

Web1, (2019), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-1.Tahmini-2019-30678>, (Erişim Tarihi: 28/05/2020).

ÖZGEÇMİŞ

Mihriban AYDOĞAN GEMİCİ 2014 yılında Pendik Fatih Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2019 yılında, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2021 Şubat ayından itibaren Kazlıçeşme Ar-Ge Merkezinde Ar-Ge Proje Mühendisi olarak çalışmaya devam etmektedir.



EKLER

Ek A: NCBI Veri Tabanındaki Analiz Sonuçları

RTD: CYBYIUHE013 Job Title: Consensus isolate 35 Program: BLASTN Query: Consensus isolate35 ID: lcl Query_8477(dna) Length: 1124 Database: nt Nucleotide collection (nt)									
Sequences producing significant alignments:									
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Query Score	E Value	Per. Ident	Len	Accession
Pseudomonas sp. strain SeaQual_P_B639 16S ribosomal RNA gene,...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2050	2050	0.0	99.38	1399	MT626781.1
Pseudomonas sp. strain B12 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2050	2050	0.0	99.38	1392	MT576575.1
Pseudomonas sp. strain RH2 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2050	2050	0.0	99.38	1403	MM049727.1
Pseudomonas putida JCM 13061 gene for 16S rRNA, partial sequence	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1459	LC507958.1
Pseudomonas putida strain V-5 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1440	MM314837.1
Pseudomonas putida strain LX1 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1397	MM760920.1
Pseudomonas sp. strain OUCHDZ-5204 16S ribosomal RNA gene,...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2050	2050	0.0	99.38	1416	MM583956.1
Pseudomonas putida strain BOE100 16S ribosomal RNA gene, parti...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1390	MM580208.1
Pseudomonas putida strain BOE2 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1407	MM553084.1
Pseudomonas putida strain CT3 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1443	KX989433.1
Pseudomonas putida strain KST167 16S ribosomal RNA gene,...	Pseudomonas ... NA	NA	53249	2050	2050	0.0	99.38	1442	MF383477.1
Pseudomonas sp. strain isolate 3 16S ribosomal RNA gene, parti...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2050	2050	0.0	99.38	1431	KX186966.1
Pseudomonas putida culture DSM:291 16S ribosomal RNA gene,...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1501	LT595800.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone clone AF-35493	uncultured b... NA	NA	77133	2050	2050	0.0	99.38	1501	LT595740.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone clone AF-35168	uncultured b... NA	NA	77133	2050	2050	0.0	99.38	1423	KT325856.1
Pseudomonas sp. TGPMP13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas ... NA	NA	1720609	2050	2050	0.0	99.38	1388	KT767949.1
Pseudomonas putida strain J22 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1408	KT767778.1
Pseudomonas putida strain H10 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	1384061	2050	14323	0.0	99.38	6621848	CP010979.1
Pseudomonas putida S13.1.2, complete genome	Pseudomonas ... NA	NA	77133	2050	2050	0.0	99.38	1500	KF712804.1
Uncultured bacterium clone H256 16S ribosomal RNA gene, parti...	uncultured b... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1382	ON705768.1
Pseudomonas putida strain SD-1 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1415	CP096581.1
Pseudomonas putida strain G7 chromosome, complete genome	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1415	ON203962.1
Pseudomonas putida strain CH2 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1400	ON538424.1
Pseudomonas putida strain YT18 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1410	ON538423.1
Pseudomonas putida strain YT16 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1382	OL757773.1
Pseudomonas putida strain LG-71 16S ribosomal RNA gene, parti...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1451	MM085026.1
Pseudomonas putida strain LI 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1431	KF896122.1
Pseudomonas sp. SR11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas ... NA	NA	1461072	2050	2050	0.0	99.38	1472	MM094380.1
Pseudomonas putida strain ZH9 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ... NA	NA	303	2050	2050	0.0	99.38	1472	MM094380.1

Şekil A1.1: 35 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.

104
No'lu
İzolat

RID: CYDTV0HM013 Job Title:Consensus isolate 104 Program: BLASTN Query: Consensus isolate 104 ID: lcl Query_28875(dna) Length: 1296 Database: nt Nucleotide collection (nt)									
Sequences producing significant alignments:									
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Query Score cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pseudomonas putida strain NV5709 chromosome, complete genome	Pseudomonas ...	NA	303	2388	16688	100% 0.0	99.92	6165619	CP045551.1
Pseudomonas sp. strain KFMK 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1342	MT397006.1
Pseudomonas plecoglossicida strain QC59 16S ribosomal RNA gen...	Pseudomonas ...	NA	70775	2388	2388	100% 0.0	99.92	1400	MT153203.1
Pseudomonas sp. strain IAP-CY 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1403	MT084588.1
Pseudomonas hunanensis strain P11 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	1247546	2388	2388	100% 0.0	99.92	1433	MN946623.1
Pseudomonas plecoglossicida strain R2M7 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	70775	2388	2388	100% 0.0	99.92	1383	MK294251.1
Pseudomonas plecoglossicida strain R2M5 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	70775	2388	2388	100% 0.0	99.92	1391	MK294249.1
Pseudomonas sp. strain DMU3 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1397	MN747135.1
Pseudomonas sp. strain DOP-1a 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1436	MK789753.1
Pseudomonas sp. strain 9APTE 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1401	MN651327.1
Pseudomonas sp. strain 36DCP 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1488	MK072948.1
Pseudomonas fluorescens strain psf14 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	294	2388	2388	100% 0.0	99.92	1433	MN256400.1
Pseudomonas sp. strain 382-a White 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1437	MN208086.1
Pseudomonas sp. strain H2-6 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1413	MN197811.1
Pseudomonas sp. strain H2-3 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1378	MN197809.1
Pseudomonas sp. strain H2-1 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1397	MN197807.1
Pseudomonas sp. strain HI-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1394	MN197798.1
Uncultured bacterium clone 206042 16S ribosomal RNA gene...	Uncultured b...	NA	77133	2388	2388	100% 0.0	99.92	1446	MK949123.1
Bacterium strain BS1308 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1398	MK824496.1
Bacterium strain BS0823 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1414	MK824011.1
Bacterium strain BS0699 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1441	MK823887.1
Bacterium strain BS0693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1447	MK823881.1
Bacterium strain BS0678 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1441	MK823866.1
Bacterium strain BS0575 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	bacterium	NA	1869227	2388	2388	100% 0.0	99.92	1340	MK823763.1
Pseudomonas hunanensis strain IAE207 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	1247546	2388	2388	100% 0.0	99.92	1403	MK414909.1
Pseudomonas plecoglossicida strain B1 16S ribosomal RNA gene...	Pseudomonas ...	NA	70775	2388	2388	100% 0.0	99.92	1385	MK282212.1
Pseudomonas putida strain YN9 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2388	2388	100% 0.0	99.92	1412	MK346990.1
Pseudomonas sp. strain PR12 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1366	MH883954.1
Pseudomonas sp. strain DFA3 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1381	MK120449.1
Pseudomonas sp. strain DFA2 16S ribosomal RNA gene, partial...	Pseudomonas sp. NA	NA	306	2388	2388	100% 0.0	99.92	1401	MK120448.1

Şekil A1.2: 104 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.