

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PSEUDOMONAS PUTIDA’NIN ARABIDOPSIS THALIANA VE
NICOTIANA TABACUM BİTKİLERİ İLE IN VITRO
BİYOTİZASYONU VE 2,4-DİNİTROTOLUEN’İN
BİYOTRANSFORMASYONU

EBRU ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PSEUDOMONAS PUTIDA'NIN
ARABIDOPSIS THALIANA VE NICOTIANA
TABACUM BİTKİLERİ İLE IN VITRO
BİYOTİZASYONU VE
2,4-DİNİTROTOLUEN'İN
BİYOTRANSFORMASYONU

Ebru ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ
II. DANIŞMANI
DR. ÖZLEM AKKAYA

GEBZE

2019

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

IN VITRO BIOTIZATION OF
PSEUDOMONAS PUTIDA WITH
ARABIDOPSIS THALIANA AND
NICOTIANA TABACUM AND
BIOTRANSFORMATION OF
2,4-DINITROTOLUENE

EBRU ARSLAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ
II. THESIS SUPERVISOR
DR. ÖZLEM AKKAYA

GEBZE

2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/06/2019 tarih ve 2019/27sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/06/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ebru ARSLAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Yelda Özden Çiftçi

ÜYE

: Dr. Öğrt. Üyesi Mine GÜL-ŞEKER

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Bahar Süpütmez
Özdemir

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Bu çalışmada patlayıcı sanayinde ve poliüretan köpük yapımında kullanılan ksenobiyotik bir bileşik olan 2,4-dinitrotoluen'in (2,4-DNT) in vitro koşullarda biyotransformasyonu incelenmiştir. *Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*), genomuna *Burkholderia cepacia* R34 bakterisine ait dnt degradasyonunun sorumlu genler aktarılmış *Pseudomonas putida* (*P. putida*) KT.DNT bakterisi ile inoküle edilmiştir. Bitki köklerinde kolonize olan bakteri aracılığı ile 2,4-DNT'nin in vitro biyodegradasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bitki-bakteri etkileşimi çalışmaları yapılarak, *P. putida*'nın *A. thaliana* ve *N. tabacum* tohum çimlenmesi, bitki gelişimi ve büyümesine etkileri; farklı inokülasyon yöntemleri ve *P. putida*'nın farklı konsantrasyonları denenerek incelenmiştir. Böylece *P. putida* ile inokülasyon için bitkilerin optimum fizyolojik evresi belirlenmiştir. Bitki-bakteri birlikteliği sonrasında, bitki köklerine tutunan ve 2,4-DNT'yi degrade edebilen bakteriler tarafından 2,4-DNT'nin degradasyonu değerlendirilmiştir. 2,4-DNT'nin degradasyonu sonucunda, ortamdaki 2,4-DNT miktarındaki azalma ve oluşan degradasyon ürünleri spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle analiz edildi. Elde edilen veriler bitki köklerine tutunan KT.DNT bakterisinin 2,4-DNT biyotransformasyonunu etkin bir şekilde yapabildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 2,4-DNT, *Arabidopsis thaliana*, biyodegradasyon, *Nicotiana tabacum*, PGPR, *Pseudomonas putida*, biyotizasyon.

SUMMARY

In this study, biotransformation of 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), a xenobiotic compound used in explosive industry and polyurethane foam production, was investigated. *Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*) inoculated with *Pseudomonas putida* (P. putida) KT.DNT carrying the genes necessary for 2,4-DNT degradation from *Burkholderia* sp. R34. In vitro biodegradation of 2,4-DNT was carried out by bacteria colonizing plant roots. First of all, the effects of *P. putida* on *A. thaliana* and *N. tabacum* seed germination, plant growth and development were investigated by using different inoculation methods and different concentrations of *P. putida*. Thus, the optimal physiological stage of the plants was determined for inoculation with *P. putida*. Afterwards, the 2,4-DNT degradation activity of the bacteria attached to the roots of the plant and capable of degrading DNT was evaluated. As a result of degradation of 2,4-DNT, the decrease in the amount of 2,4-DNT and the resulting degradation products were analyzed by spectrophotometric and chromatographic methods. The obtained data showed that DNT-degrading bacteria, which attach to plant roots, can efficiently perform 2,4-DNT biotransformation.

Key Words: 2,4-DNT, *Arabidopsis thaliana*, biodegradation, *Nicotiana tabacum*, PGPR, *Pseudomonas putida*, biotization

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, motivasyonu ile beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye,

Bütün tez çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez konumun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde büyük yardımları olan ikinci danışmanım sayın Dr. Özlem AKKAYA'ya,

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, deneyimlerini paylaşarak yol gösteren hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER'e,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, motivasyonu ile beni destekleyen, tezimin kontrolü ve yazımı aşamasında yardım ve katkılarını benden esirgemeyen, bana olan inancı ve güvenini her daim hissettiğim çok değerli Hamit EKİNCİ'ye,

Konfokal mikroskop görüntülemeindeki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Metin ÇETİN'e,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteklerini her an hissettiğim, dostlukları ile her zaman yanımda bulunan ve sevgiyle beni saran çok kıymetli arkadaşlarım Burcu UZAN EKEN, İrem BAKŞAN, Merve ALBAYRAK, Nil TÜRKÖLMEZ ve Selin ÜNSAL'a,

Birlikte çalışmaya başladığımız ilk günden beri yardım ve destekleri ile yanımda olan Maria BATOOL ve Serap SAKARYA'ya

Yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili laboratuvar arkadaşlarım Nida ARSLAN, Melike TEPE, Nicat CEBRAİLOĞLU, Burak AKGÜL, Ömer İLTAŞ, İlkay ÜNAL, Gül Çiçek KILIÇ, Kevser ÖZKURT, Buse Nur URAL ve Rıfat ÜNGÖR'e,

Ve son olarak varlığını her zaman hissetmeye devam edeceğim canım babam Vahit YIKILMAZ'a, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ve sonsuz sevgileriyle yanımda olan canım annem Nurcan YIKILMAZ ve sevgili kardeşim Murat YIKILMAZ'a,

Bana olan sonsuz desteği ve güveni ile her zaman yanımda olan, sevgisi ile kendimi özel hissettiğim eşim Güven ARSLAN'a ve biricik kızım Elif ARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	4
2.3. <i>Pseudomonas putida</i>	4
2.4. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteri (PGPR)	5
2.5. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Pseudomonas (PGPP)	7
2.6. Biyotizasyon	9
2.7. IAA (İNDOL ASETİK ASİT)	10
2.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Enzimatik Antioksidanlar	11
2.9. 2,4-Dinitrotoluen (2,4-DNT)	14
2.10. 2,4-Dinitrotoluen'in Biyodegradasyonu	15
2.11. Fitoremediasyon	17
2.12. 2,4-DNT'nin Bitki-Bakteri Etkileşimi Kullanılarak Biyodegradasyonu	19
2.13. Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı	23
3.1.2. Bakteri Soyu ve Bakteri Kültür Ortamı	23
3.1.3. Kimyasallar	23
3.1.4. Cihazlar	25

3.2. Yöntem	25
3.2.1. Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisinin Belirlenmesi	25
3.2.1.1. Bakteri Büyüme Koşulları	25
3.2.1.2. <i>P. putida</i> 'nın Koloni Sayısının Belirlenmesi	26
3.2.1.3. <i>A. thaliana</i> ve <i>N. tabacum</i> Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi	26
3.2.1.4. Bitkilerin <i>P. putida</i> KT2440 Bakterisi ile İnokülasyonu	27
3.2.1.4.1. <i>A. thaliana</i> 'nın <i>P. putida</i> KT2440 ile İnokülasyonu	27
3.2.1.4.1.1. Pipetleme Yöntemi	28
3.2.1.4.1.2. Daldırma Yöntemi	28
3.2.1.4.1.3. Yayma Yöntemi	28
3.2.1.4.2. <i>N. tabacum</i> 'un <i>P. putida</i> KT2440 ile İnokülasyonu	29
3.2.1.4.2.1. Yayma Yöntemi	29
3.2.1.4.2.2. Daldırma Yöntemi	30
3.2.1.4.3. Ölçüm ve Analizler	30
3.2.1.5. <i>P. putida</i> KT2440 bakterisinin <i>A. thaliana</i> ve <i>N. tabacum</i> Köklerindeki Lokalizasyonu	32
3.2.1.6. İndol Asetik Asit (IAA) Tayini	32
3.2.1.7. <i>A. thaliana</i> Bitkisinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	33
3.2.1.7.1. Yapraklardaki Protein Miktarının Belirlenmesi	33
3.2.1.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.2.1.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
3.2.1.7.4. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
3.2.1.7.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi	35
3.2.1.8. 2,4-Dinitrotoluen'in <i>in vitro</i> <i>A. thaliana</i> Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin KT.DNT Varlığında Değerlendirilmesi	36
3.2.1.9. 2,4-Dinitrotoluen'in Biyotransformasyonunun Analitik Yöntemlerle Analizi	37
3.2.1.10. İstatistiksel Analizler	38

4. SONUÇLAR	39
4.1. <i>A. thaliana</i> Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisinin Değerlendirilmesi	39
4.1.1. <i>P. putida</i> KT2440'ın <i>A. thaliana</i> Tohum Çimlenmesine Etkisi	39
4.1.2. <i>A. thaliana</i> Bitki Büyümesi Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisi	40
4.1.2.1. Pipetleme Yöntemi	40
4.1.2.2. Daldırma Yöntemi	44
4.1.2.3. Yayma Yöntemi	48
4.1.3. <i>A. thaliana</i> Bitkisinin Fotosentetik Pigmentleri Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisi	54
4.2. <i>N. tabacum</i> Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisinin Değerlendirilmesi	57
4.2.1. Daldırma Yöntemi ile İnoküle Edilen <i>P. putida</i> KT2440'ın <i>N. tabacum</i> Tohum Çimlenmesi ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi	57
4.2.2. Yayma Yöntemi ile İnoküle Edilen <i>P. putida</i> KT2440'ın <i>N. tabacum</i> Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi	63
4.2.3. <i>N. tabacum</i> Bitkisinin Fotosentetik Pigmentleri Üzerine <i>P. putida</i> KT2440'ın Etkisi	70
4.3. <i>P. putida</i> KT2440 bakterisinin <i>A. thaliana</i> ve <i>N. tabacum</i> Köklerindeki Lokalizasyonu	73
4.4. Indol Asetik Asit (IAA) Tayini	73
4.5. <i>A. thaliana</i> Bitkisinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	74
4.6. 2,4-Dinitrotoluen'in <i>A. thaliana</i> Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin KT.DNT Varlığında Değerlendirilmesi	75
4.7. 2,4-Dinitrotoluen'in KT.DNT Varlığında <i>A. thaliana</i> ile <i>in vitro</i> Biyodegradasyonu	77
4.7.1. 2,4-DNT Biyodegradasyonunun Analitik Yöntemler Kullanılarak Gösterilmesi	78
5. TARTIŞMA	80
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	96

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
Λ	: Lamda
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
2,4-DNT	: 2,4-Dinitrotoluen
2,4,5-THT	: 2,4,5-Trihidroksitoluen
4M5NC	: 4-metil-5-nitrokatekol
DMOHA	: 2,4-dihidroksi-5-metil-6-okso-2,4-hekzadienoik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
BSA	: Bovin Serum Albumin
GPX	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
G	: Gram
CAT	: Katalaz
CFU	: Koloni oluşturan birim
<i>Chl</i>	: Klorofil
Cm	: Santimetre
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dH ₂ O	: Distile su
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EtOH	: Etil alkol
Fe-SOD	: Demir SOD
FeCl ₃	: Demir III Klorür
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit

HClO ₄	: Hidrojen perklorat
IAA	: İndol-3-asetik asit
Mn-SOD	: Manganez SOD
M	: Molar
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MPYE	: Mineral-pepton-maya ekstraktı
MS	: Murashige ve Skoog
nm	: Nanometre
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBT	: Nitro blue tetrazolium
Nm	: Nanometre
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
PGPR	: Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler
POX	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpolipirrolidon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Rounds per minute
SOD	: Süperoksit dismutaz
UV	: Ultraviyole
US-EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevresel Koruma Ajansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Arabidopsis thaliana</i> .	3
2.2: <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	5
2.3: ROS oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları.	13
2.4: <i>Burkholderia</i> sp. R34'e ait 2,4-DNT degradasyon yolağı ve 2,4-DNT degradasyonunu sağlayan <i>dnt</i> genlerinin şematik organizasyonu.	17
3.1: 5 günlük <i>A. thaliana</i> fideliklerinin yayma yöntemi kullanılarak <i>P. putida</i> ile inoküle edilmiş ½ MS besi ortamı içeren Petrilere yerleştirilmesi.	29
3.2: <i>A. thaliana</i> fideliklerinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarının analizi.	31
4.1: <i>A. thaliana</i> bitkisinde tohum çimlenme yüzdesi.	39
4.2: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> kök ve gövde boyuna etkileri.	40
4.3: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığına etkileri.	41
4.4: Pipetleme yöntemi kullanılarak bakteriyle 0. gününde inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	42
4.5: Pipetleme yöntemi ile 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin 14. günündeki morfolojik görünüşleri.	42
4.6: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığına etkileri.	43
4.7: Pipetleme yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen <i>A. thaliana</i> bitkiciklerine ait yaş ve kuru kök ağırlığı.	44
4.8: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> kök ve gövde boyuna etkileri.	45
4.9: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> yaş gövde ve yaş bitki ağırlığına etkileri.	46
4.10: Daldırma yöntemi ile 0. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	47

4.11: Daldırma yöntemi ile 5. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	47
4.12: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığına etkileri.	48
4.13: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin gövde ve kök boyu gelişimine etkisi.	49
4.14: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığına etkileri.	50
4.15: Yayma yöntemi ile 0. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	51
4.16: Yayma yöntemi kullanılarak 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	51
4.17: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığına etkileri.	52
4.18: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin yaş kök ağırlığına etkileri.	53
4.19: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin kuru kök ağırlığına etkileri.	53
4.20: Yayma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkiciklerinin kristal viyole ile boyama sonrası kök fotoğrafları.	53
4.21: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.	54
4.22: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.	55
4.23: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>A. thaliana</i> bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.	56
4.24: <i>N. tabacum</i> çimlenme yüzdesi.	57
4.25: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin yaprak sayısına etkisi.	58
4.26: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin gövde boyu gelişimine etkisi.	58

4.27:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin kök boyu gelişimine etkisi.	59
4.28:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> yaş gövde ağırlığına etkisi.	59
4.29:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> yaş bitki ağırlığına etkisi.	60
4.30:	Daldırma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen <i>N. tabacum</i> tohumlarının 21 gün sonundaki morfolojik görünüşleri.	60
4.31:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> kuru gövde ve kuru bitki ağırlığına etkisi.	61
4.32:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> yaş kök ağırlığı ve kuru kök ağırlığına etkileri.	62
4.33:	Daldırma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen <i>N. tabacum</i> tohumlarının 21 günlük kök tüyü fotoğrafları.	63
4.34:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin yaprak sayısına etkisi.	64
4.35:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin gövde boyu ve kök boyu gelişimine etkisi.	65
3.36:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığına etkisi.	66
4.37:	Yayma yöntemi ile 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen <i>N. tabacum</i> bitkiciklerinin 21. günündeki morfolojik görünüşleri.	67
4.38:	Yayma yöntemi ile 14 günlük iken bakteriyle inoküle edilen <i>N. tabacum</i> bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri.	67
4.39:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığına etkisi.	68
4.40:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin yaş kök ve kuru kök ağırlığına etkisi.	69
4.41:	Yayma yöntemi kullanılarak 5. gün bakteriyle inoküle edilen <i>N. tabacum</i> bitkiciklerinin 21 günlük kök tüyü fotoğrafları.	70
4.42:	Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.	71

4.43:	Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun <i>N. tabacum</i> bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.	72
4.44:	GFP ile işaretlenmiş <i>P. putida</i> KT2440'ın <i>N. tabacum</i> (a) <i>A. thaliana</i> (b) köklerindeki lokalizasyonu.	73
4.45:	IAA üretiminin kalitatif analizi.	74
4.46:	<i>P. putida</i> KT2440 izolatlarının IAA üretimi.	74
4.47:	<i>P. putida</i> KT2440'ın <i>A. thaliana</i> antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri.	75
4.48:	2,4-DNT'nin <i>A. thaliana</i> gövde boyuna etkisi.	76
4.49:	2,4-DNT'nin <i>A. thaliana</i> bitki gelişimi üzerine etkisi.	76
4.50:	KT.DNT bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonu ile inoküle edilen 14 günlük <i>A. thaliana</i> bitkilerinin ½ MS besi ortamı içeren erlenlere aktarılması.	77
4.51:	2,4-Dinitrotoluen'in KT.DNT varlığında <i>A. thaliana</i> ile <i>in vitro</i> biyodegradasyonu.	77
4.52:	2,4-DNT'in degradasyonunun 120. dakikasına ait HPLC kromatogramı.	79

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: 2,4-Dinitrotoluen'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.	14
3.1: Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar.	23
3.2: Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.	25
3.3: SOD Ölçüm Tamponunun Hazırlanması.	34
3.4: Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Standartlarının Hazırlanması.	36
3.5: Kullanılan HPLC Metodu.	37
4.1: Erlenlerden Toplanan Örneklerin 420 nm'deki Absorbansları.	78
4.2: 2,4-DNT ve 4M5NC'e Ait HPLC Analiz Sonuçları.	79

1. GİRİŞ

Dünyamız insan faaliyetlerinin bir sonucu olarak, inorganik ve organik kirleticilerle giderek daha fazla kirlenmektedir. Organik kirleticiler çoğunlukla insan yapımı ve ksenobiyotiktir. Çevrede bulunan organik kirleticiler, kazara salınan maddeler (yakıtlar, çözücüler), endüstriyel faaliyetler, tarım ve askeri faaliyetler (patlayıcılar, kimyasal silahlar) olarak sayılabilir [Pilon-Smits ve Freeman, 2006]. Askeri faaliyetlerde kullanılan patlayıcıların nitroaromatik bileşikler, nitraminler ve nitrat esterlerini içeren üç ana sınıfı bulunmaktadır. Nitroaromatik bileşiklerin özellikle nitrotoluenlerin, mühimmat, boya, poliüretan köpük, böcek ilacı gibi ürünlerin imalatında yaygın olarak kullanılması çevreyi kirletmektedir [Xu ve Jing, 2012]. Tarihsel olarak, trinitrotoluen (TNT) en yaygın olarak kullanılan askeri patlayıcıdır ve TNT ile kontamine olmuş geniş arazilerde bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da, II. Dünya Savaşı'nda kullanılan mühimmat üretim, yükleme ve depolama tesisleri ağır olarak kirleticilerin bulunduğu yerlerdir [Spain, 1995].

Dinitrotoluen (DNT) altı izomerli bir nitroaromatik patlayıcı olup, 2,4-DNT ve 2,6-DNT iki ana formudur. 2,4-DNT, çevrede doğal olarak bulunmamaktadır. Genellikle toluenin nitrik asit ve sülfirik asitlerle karıştırılmasıyla üretilir ve TNT imalatında bir ara maddedir. 2,4-DNT'nin yaygın olarak kullanımı, toprak ve yer altı suyu kirlenmesine neden olmuştur. Sudaki düşük çözünürlüğü ve nispeten düşük uçuculuğu nedeniyle ışık, oksijen ve biota ile parçalanmadığı sürece yüzey ve yer altı sularında taşınabilmektedir. DNT'nin suya salınması, insan maruziyetinin ve çevresel kirlenmenin önemli bir kaynağıdır. 2005 yılında 2,4-DNT ve 2,6-DNT içme suyu kirletici adaylar listesine eklenmiştir [EPA 2008].

2,4-DNT toksiktir ve B2 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. 2,4-DNT'ye potansiyel maruz kalma yolları genellikle soluma, kazara yutma ve deri teması ile olmaktadır. Çalışmalar 2,4-DNT ve 2,6-DNT'nin ağız veya soluma yoluyla kolayca emildiğini, ciltte toksik miktarda absorbe edilebileceğini göstermiştir. DNT fabrika işçileri, mühimmat işçileri ve madencilik işlerinde, DNT'nin insan üzerindeki toksisitesi değerlendirilmiş ve kronik maruziyetin merkezi sinir sistemi, kalp ve dolaşım sisteminde olumsuz etkileri tanımlanmıştır [EPA, 2014].

Patlayıcı ile kontamine olmuş toprak ve yer altı suları için uygun maliyetli ve etkili *in situ* remediasyon yöntemlerinin araştırılması ile biyoremediasyon ve

fitoremediasyon teknolojileri önem kazanmıştır. Bitkiler tarafından topraktaki kirleticilerin degradasyonu, stabilizasyonu veya topraktan uzaklaştırılmasını içeren fitoremediasyon yöntemleri kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Orta derece çözünürlüğünün bir sonucu olarak, 2,4-DNT topraktan kökler aracılığıyla bitkilere aktarılabilir ve bitki dokularında birikebilir. Bitki türleri için 2,4-DNT toksisitesi toprağın özelliklerine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir [EPA, 2017]. Farklı bitki türleri ile 2,4-DNT'nin biyodegradasyon çalışmaları mevcuttur [Podlipna ve ark., 2014]. Bitkilerin yüksek fitotoksisiteyi ve organik kirliliği azaltmak için sınırlı katabolik aktiviteye sahip olmaları fitoremediasyonda sınırlayıcı faktörlerdir.

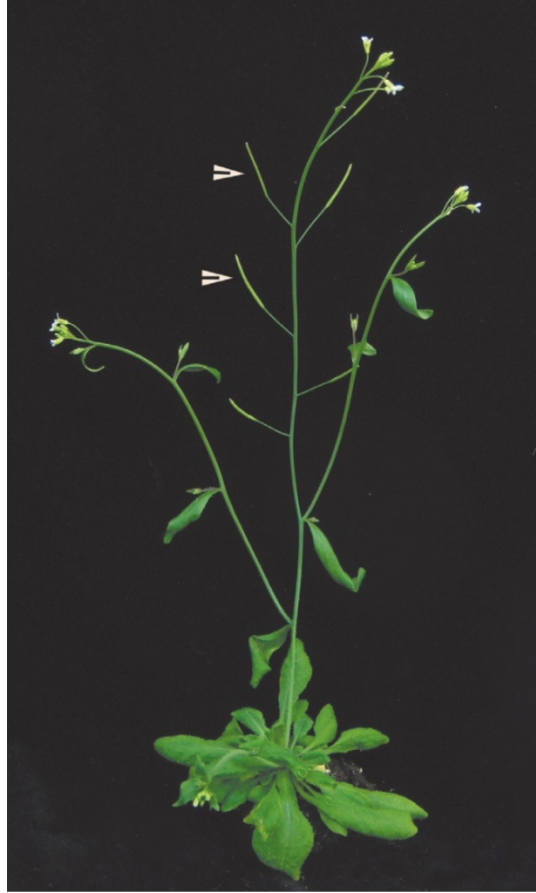
2,4-DNT'yi dönüştürebilen veya biyolojik olarak parçalayablen mikrobiyal sistemler de bulunmaktadır. Aerobik bakteriler 2,4-DNT'yi degrade edebilir, azot ve karbon kaynağı olarak kullanabilirler [Spain, 1995]. Patlayıcılar ile kirlenmiş topraklardan, 2,4-DNT'yi degrade etme yeteneğine sahip toprak bakterileri izole edilmiştir. Mikrobiyal suşların degradasyon çalışmalarında kullanılması, degradasyon yollarının araştırılması ve sentetik biyoloji kullanılarak oluşturulan heterolog metabolik yollar 2,4-DNT'nin biyoremediasyonunda oldukça önemlidir.

Bitki ve bitki kökleri ile ilişkili bakteriler kirleticilerin temizlenmesi ve çevresel kirliliğin önlenmesinde kullanılabilir. PGPR suşlarının degradasyon çalışmalarında kullanımı fitoremediasyonun etkinliğini arttırmaktadır. Bu çalışmada öncelikle biyoremediasyon öncesi bitki-bakteri etkileşimleri analiz edilmiştir. *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine bir toprak bakterisi olan *P. putida*'nın etkisi araştırılmıştır. Bu rizobakteri-bitki arasındaki etkileşimin bitkinin değişik fizyolojik evrelerinde yarattığı etki değerlendirilerek; biyoremediasyonda kullanılacak optimum koşullar belirlenmiştir ve bitki-bakteri etkileşimi yoluyla 2,4-DNT'nin degradasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Arabidopsis thaliana

Bilinen tüm çiçekli bitki türleri arasında en kapsamlı olarak çalışılan *A. thaliana* Brassicaceae familyasına ait dikotiledon türüdür. Küçük bir bitki olan *A. thaliana* çimlenmenin ardından kısa sap üzerinde bir dizi yaprak üreterek toprağa yakın bir rozet oluşturur. Çiçeklenme ile gövde uzar ve her biri bir tohum kapsülü üretecek bir dizi çiçek üretir. Rozet çapı 4-6 cm, boyu 30-40 cm'dir (Şekil 2.1) [Haughn ve Kunst, 2010]. *A. thaliana* tarımsal açıdan önemli değildir, fakat genetik ve moleküler biyoloji alanındaki temel araştırmalar için örnek bir bitki olarak seçilmiştir [Haughn ve Kunst, 2010].



Şekil 2.1: *Arabidopsis thaliana*.

A. thaliana'ya duyulan ilgi 1970'lerin sonunda moleküler genetik araştırmaları için uygun bir bitki modeli arayışı ile başlamıştır. Bu süreçte kısa yaşam döngüsü

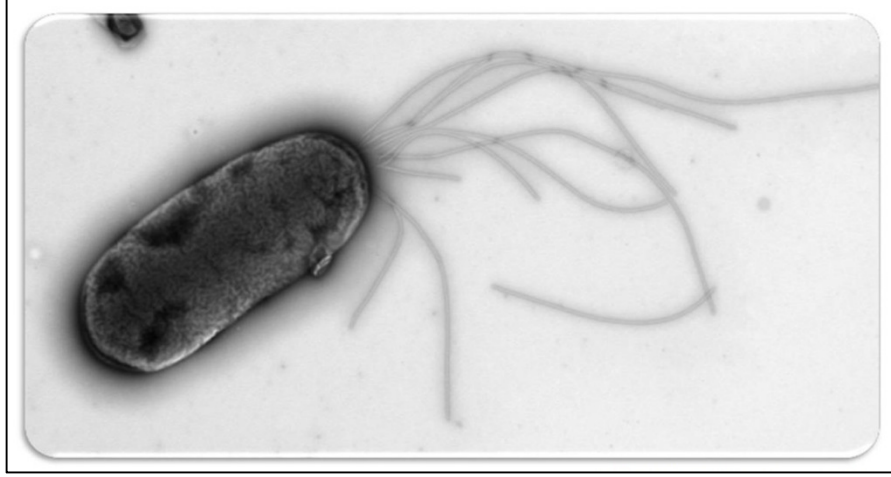
(çimlenmeden tohuma yaklaşık 6 hafta), küçük bitki büyüklüğü ve kendi kendine tozlaşma yoluyla verimli üreme, *A. thaliana*'yı favori bitki haline getirmiştir [Koornneef ve Meinke, 2010]. 2000 yılında dizilenen genomu ve haritalanan 5 kromozomu ile *A. thaliana* bitki biyolojisi alanındaki en popüler model organizmalardan biri haline gelmiştir. Bilimsel makalelere ek olarak Arabidopsis Information Resource (TAIR) [Web 1, 2017] ve Arabidopsis Book [Web 2, 2018] gibi birçok çevrimiçi kaynak bulunmaktadır.

2.2. *Nicotiana tabacum*

Tütün (*N. tabacum*) Solanaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Güney Amerika kökenli olup 1-2 metre yüksekliğe kadar büyüeyebilen tütün, dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen gıda dışı ürünlerden biridir [Moon ve ark., 2009]. Bu bitki türlerini Amerika'dan Avrupa'ya ithal eden ilk kişi olan Jean Nicot de Villemain'in adını alan Nicotiana cinsine aittir. Bir tür olarak *N. tabacum*, yaklaşık 200.000 yıl önce *Nicotiana sylvestris* ve *Nicotiana tomentosiformis* atalarının spesifik hibridizasyonu yoluyla gelişmiştir. Tütün, temel biyolojik süreçleri incelemek için başka bir bitkidir. Ayrıca en kapsamlı çalışılan çiçekli bitki türlerinden biridir [Sierro ve ark., 2014].

2.3. *Pseudomonas putida*

P. putida Gram negatif, aerobik, polar kamçılı çubuk formunda bakteri olup, 0.5-1.0 × 1.5-5.0 µm boyutlarındadır (Şekil 2.2; Fotoğraf: Esteban Martinez Garcia, CNB/CSIC, İspanya). Su, toprak ve özellikle bitki rizosferinde bulunurlar. Optimum sıcaklık, 25-30 °C'dir [Brenner ve ark., 2005]. İlk olarak 19. yüzyılın sonunda Migula tarafından tanımlanan *Pseudomonas* türleri, karbon ve enerji kaynağı olarak geniş bir organik bileşik kullanabilme yeteneğine sahip olduğundan dolayı besinlerin sınırlı olduğu habitatlarda dahi kolonize olabilmektedir. *P. putida* KT2440 genomu dizilenmiş genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) bir organizmadır [Kahlon, 2016].



Şekil 2.2: *Pseudomonas putida* KT2440.

Doğal mikrobiyal toplulukların önemli üyelerinden olan Pseudomonasların genel olarak bitki rizosferinde çoğaldıkları ve bitki büyümesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip oldukları bilinmektedir.

Basit büyüme koşulları ve minimal besin gereksinimleri, çeşitli bileşikler üretme ve degrade etme kapasiteleri nedeniyle, Pseudomonas türleri, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır [Delfan ve ark., 2012]. Pseudomonas cinsinin üyeleri, çeşitli hidrokarbonların, aromatik bileşiklerin ve bunların türevlerinin aerobik bozunma kapasiteleri ile ünlüdür. Bu bileşiklerin önemli bir kısmı toksiktir ve çevresel kirletici maddeler olarak bulunur. Bunların çoğu, Pseudomonas türleri tarafından büyüme için kullanılabilir.

2.4. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteri (PGPR)

“Rizosfer” terimi ilk kez Hiltner (1904) tarafından bitki köklerinin etkisi altındaki toprak bölgesini tanımlamak için kullanılmıştır. Rizosfer, bitki kökleri tarafından doğrudan, kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak etkilenen, bitki kökleri tarafından çevrelenen ve mikroorganizmalar için uygun bir yaşam alanına yol açan bitki köklerinin hacmidir [Sorenson J. ve ark., 2001]. Rizosfer, kök büyümesi, eksudat üretimi ve mikrobiyal topluluk gelişimi açısından önemlidir. Kökler tarafından çeşitli organik bileşiklerin salınması nedeniyle kök etrafındaki mikrobiyal çoğalmanın uyarılması, rizosferik etki olarak bilinmektedir [Ahmad ve ark., 2011, Akkaya ve Şeker, 2019].

Rizosferde bitkinin çevresindeki toprağa oranla daha fazla bakteri bulunmaktadır [Hartmann ve ark., 2008]. Kloepper ve Schroth (1981), bu faydalı rizobakterileri bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak adlandırmıştır. Genel olarak, bu bakteriler bitki büyümesini üç farklı yoldan teşvik eder: bitkiler için büyüme teşvik edici hormonların sentezlenmesi, topraktan besin alımını kolaylaştırmak ve bitki hastalıklarının azaltılması veya önlenmesi [Hayat ve ark., 2012].

Bitki kökünü kolonize eden toprak bakterilerinin bitki büyümesini destekleyici mekanizmaları, i) azot fiksasyonu; ii) mineral fosfatların çözünmesi ve diğer besin maddelerinin mineralleşmesi; iii) indol asetik asit (IAA), absisik asit (ABA), giberellik asit ve sitokinler gibi hormonları üretme kabiliyeti; (iv) köklerde etilen seviyesinin düşürmek için ACC-deaminaz üretimi; v) patojenlere karşı antagonistik siderofor üretimi; vi) suda çözünür vitaminler, riboflavin, biotin üreterek kuraklık ve oksidatif strese yüksek direnç olarak bilinmektedir [Hayat ve ark., 2012], [Lambrecht ve ark., 2000]. PGPR, bitki büyümesini arttırmak için bu mekanizmalardan birden fazlasını kullanabilir, çünkü deneysel kanıtlar bitki büyüme uyarılmasının aynı anda aktif olabilen birden fazla mekanizmanın net sonucu olduğunu göstermektedir.

Doğal olarak, PGPR suşlarının etkili olması için en önemli özelliklerden biri, çevreye salındıktan sonra rizosferde kolonileşme ve hayatta kalma kapasiteleridir [Pizarro-Tobias ve ark., 2015]. Kök eksudatları, amino asitleri, organik asitleri, şekerleri, vitaminleri, yağ asitlerini ve steroller, nükleotidleri, proteinleri ve karbon dioksit ve moleküler oksijen gibi uçucu bileşikler içerir [Ahmad ve ark., 2011]. Bunlar rizosferdeki bakteriler için zengin bir enerji ve besin kaynağı sağlayarak kök bakterilerinin rizosferde kolonileşmesine ve rizosferin daha fazla mikrobiyal topluluk içermesine neden olur.

PGPR'lerin çoğu, patates, domates, mısır, buğday vb. tarımsal ürünlerde bitki boyunu, kök uzunluğunu ve kuru ağırlığını önemli ölçüde arttırmaktadır. PGPR ile inokülasyonun, yaprak alanı, klorofil içeriği ve sonuç olarak bitki toplam biyokütlesinde artışa neden olabileceği bilinmektedir. Ayrıca tohumların veya bitkinin *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* vb. gibi bakterilerde inokülasyonu kök oluşumuna neden olmaktadır. Bu PGPR'lerin oksin üretimi, etilen sentezinin inhibisyonu veya besin maddelerinin mineralizasyonu ile ilişkilendirilebilir [Bhattacharyya ve Jha, 2012]. Domates ve biberin kök mimarisinin

PGPR ile artırılması, büyüme teşvikinin açıklanmasına yardımcı olmaktadır [Kloepper ve ark., 2007].

Kök tüyleri, besin ve su alımına yardımcı olmak ve bitkinin toprağa demirlenmesi için kök yüzeyinden çıkıntı yapar. PGPR uygulaması sonrası kök tüylerindeki artış kök ile temas halinde olan, dolayısı ile kökün faydalanabileceği toprağın hacmini artırır [Gilroy ve Jones, 2000]. Kök tüyleri ve yan köklerin oluşumundaki artış ile genişleyen kök yüzey alanı, kök sisteminin etkileşimde bulunduğu alanı arttırabilir. Bitkinin etkileşime girdiği toprak alanını arttırmak mikrobiyal kök etkileşimleri için önemlidir [Kloepper ve ark., 2007].

PGPR suşlarının fitoremediasyon uygulamalarında kullanılması, bitki büyümesinde ve kontamine olmuş toprakta bitki gelişimine yardımcı olabileceğinden, etkin olarak kabul edilmektedir [Bhattacharyya ve Jha, 2012]. Toprak kirleticilerinin bakteriler tarafından parçalanmasında kullanılan rizoremediasyon yönteminde, bakteri kök eksudatını etkili bir şekilde kullanarak, kök etrafındaki kirleticiyi degrade etmekte ve bitkinin normal şekilde büyümesini sağlamaktadır.

2.5. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Pseudomonas (PGPP)

Bitki ile ilişkili Pseudomonas, bitki yüzeylerinde ve bitki dokularının içinde saprofit ve parazit olarak yaşar. Birçok bitki ile ilişkili Pseudomonas, patojenik mikroorganizmaları baskılayarak, büyümeyi teşvik eden bitki hormonlarını sentezleyerek ve bitki hastalıklarının direncini arttırarak bitki büyümesini destekler. Bitkilerin yapraklarında ve köklerinde kolonize olurlar ve bitki savunma yanıtlarını tolere ederek, manipule ederek veya bunlardan kaçınarak ev sahibi ortam ile uyum içinde yaşarlar.

Pseudomonas-bitki etkileşimleri genel olarak dört temas bölgesinde gerçekleştirilmektedir [Preston, 2004]:

- Epifitik Pseudomonas tarafından kolonize edilen yaprak yüzeyleri
- Rizosferik Pseudomonas tarafından kolonize edilen kök yüzeyleri
- Endofitik Pseudomonas tarafından kolonize edilen yapraklardaki hücreler arası boşluklar
- Endofitik Pseudomonas tarafından kolonize edilen köklerdeki hücreler arası boşluklar

Epidermal kök hücreleri arasındaki bağlantılar, epidermal yüzeyin girintili kısımları veya yan kök görünümüne sahip bölgeler *Pseudomonas*'ın bitki köklerinde yoğun olarak bulunduğu alanlardır. Kök kolonizasyonu çalışmalarında, ot, buğday gibi monokotillerin kök uçlarının, patates, domates, turp gibi dikotil bitkilerden on kat daha fazla *Pseudomonas* bakterisi ile kolonize olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca konfokal lazer mikroskobu kullanılarak, domates kök üzerindeki *Pseudomonas* hücrelerinin, kök tüylerinde, epidermal hücreler arası bağlantılarda ve kök yüzeyindeki epidermisin daha derin yüzeylerinde olduğu doğrulanmıştır [Lugtenberg ve ark., 2001].

Hareketlilik *Pseudomonas*'ların biyotik ve abiyotik yüzeylere bağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Kamçının kök kolonizasyonundaki rolünün rastgele hareketliliğe değil, kemotaksise dayalı olduğu bilinmektedir. *P. putida*, kök eksudatlarına karşı kemotaktik tepki göstererek kök yüzeylerinde biyofilmler oluşturmaktadır [Lugtenberg ve ark., 2001], [Pizarro-Tobias ve ark., 2015].

Rizosfer bakterilerin kök besinlerinden gelişmesini sağlar. Buna karşılık, *P. putida* besinlerin çözünmesi, demirin şelatlanması yoluyla bitki büyümesini indükler. Bu karşılıklı ilişki her iki ortağa da yarar sağlamaktadır. *P. putida* bitki rizosferinde kalabilirken, bitki patojenlerden korunmakta ve bakterilerden hayati besinleri elde edebilmektedir [Haffaressas ve ark., 2018]. *P. putida* KT2440 bakterisinin *A. thaliana* bitkisini fitopatojen *P. syringa*epv. *tomato* DC300 enfeksiyonuna karşı koruduğu bilinmekte ve bu bitki ile bakterinin pozitif birliğine işaret etmektedir [Matilla ve ark., 2010].

P. putida, karmaşık metabolizması ve zararlı organik çözücülerini toksik olmayan bileşiklere dönüştürerek kirliliği kontrol etme kabiliyeti nedeniyle çevre için de oldukça önemlidir. Hidrokarbonları degrade edebilir, bu yüzden biyoremediasyonda en önemli bakterilerden biridir [Haffaressas ve ark., 2018]. *Pseudomonas*'ın bu çok yönlü ve fizyolojik olarak sağlam yapısı endüstrideki, tarımdaki ve çevredeki önemli sorunlara biyolojik çözümler sağlama potansiyeline sahip oldukları anlamına gelmektedir [Preston, 2004].

Bitki-*Pseudomonas* etkileşimi çalışmaları, *Pseudomonas*'ın bitkiler üzerindeki etkilerini açıklamaya yardımcı olmakta, *P. putida*'nın bitki gelişimini desteklemeye yardımcı etkisi araştırmacılar tarafından biyopestisit üretmek, biyodegradasyon çalışmaları ve bitki sağlığını geliştirmek için biyomühendislik araştırmalarında kullanılmaktadır.

2.6. Biyotizasyon

Faydalı mikroorganizmalarla bitkilerin *in vitro* kültürü, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere toleranslarını arttıran gelişimsel ve metabolik değişiklikleri tetikler. İnokülantlar aracılığıyla indüklenen direnç “biyotizasyon” olarak adlandırılır.

Doğada, bitki organlarının iç ve dış kısımlarında mikroorganizmalar bulunur. Bitki açısından faydalı bakteriler gibi bu mikroorganizmaların bazıları, özellikle stres ortamlarında bitki performansını ve sonuç olarak verimini arttırabilir. Biyotizasyon, *in vitro* yetiştirilen bitki materyalinin mikrobiyal inokülanta metabolik bir tepkisi olup, bu tepki bitkinin biyotik ve abiyotik stres direncini arttıran gelişimsel ve fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır [Nowak, 1998a].

Kültür ortamından tarlaya aktarılan patates bitkileri ile yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* bakterisi ile inoküle edilmiş bitkiler, kontrol bitkilerinden daha fazla hayatta kalma süresine sahipti [Nowak ve ark., 1998b]. Bu bakteri ile inoküle edilmiş patates bitkisi tarlaya dikildikten sonra daha yüksek canlılığa sahip olduğu, daha fazla yumru sayısı ve verim artışı gözlemlendi. Yine Lifshitz ve ark., (2010), *P. putida* ile inoküle edilmiş *Brassica campestris* fide köklerinin uzadığını bildirmiştir [Nowak, 1998a].

In vitro doku kültürü birçok bitki türü için başarıyla gerçekleştirilmektedir. Ancak, yöntemin tüm avantajlarına rağmen, toprağa aktarım sonrası büyük bir canlılık kaybı gözlemlendiğinden, *in vitro* doku kültüründen gelen bitkilerin steril olmayan koşullara aktarılması problemi vardır. Stoma aktivitelerinin bozulması, yaprakların ince bir kutikular tabakaya sahip olması, bitki kök sisteminin su ve mineralleri emme kabiliyetini sürdürememesi ve aşırı su kaybı bu problemin nedenleridir. Doğal büyüme koşullarında mevcut simbiyotik mikroorganizmaların kullanılması mineral alımını iyileştirebilir ve bitkinin su stresine karşı direncini arttırabilir. Nowak ve ark., (1998b), yararlı toprak mikroorganizmalarının varlığında *in vitro* olarak, bitkilerin gelişmesinde ve metabolizmasında bazı değişikliklerin meydana geldiğini ve bunun da strese neden olan biyotik ve abiyotik faktörlere karşı artan bir dirençle sonuçlandığını tespit ettiler.

Biyotizasyon adı verilen bu yöntemde bakteriler bitki varlığında besiyerinde gelişir ve tekrarlanan aşılama gerektirmez. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter* cinsi üyeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *Pseudomonas*lar, *in vitro* bitki büyümesini uyarır, su metabolizmasını, mineral beslenmesini iyileştirir ve aynı

zamanda transplantasyon sırasında patojen organizmalara direncini arttırır [Yablonskaya ve ark., 2016].

Bitki-bakteri etkileşimlerini tam potansiyellerini kullanmamızı engelleyen sınırlamalardan biri, çeşitli çevresel koşullar altında bitki rizosferinde ve filosferindeki mikrobiyal etkileşimlerin dinamikleri hakkında bilgi sahibi olmamaktır. *In vitro* çalışmalar, bu mikrobiyal etkileşimlerin anlaşılması için basit model sistemlerin oluşturulmasına izin verir [Nowak, 1998a].

In vitro biyotizasyon, *in vivo* koşullara geçiş öncesinde bakterinin bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine etkisini belirlemede önemlidir. *In vitro* bitki- bakteri etkileşimleri kullanarak, uygun inokülasyon yöntemi ve inokülasyon konsantrasyonunun belirlenmesi gibi farklı parametrelerin etkisi değerlendirilmektedir [Yablonskaya ve ark., 2016].

2.7. IAA (İNDOL ASETİK ASİT)

Bir fitohormon olan oksin, bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyen temel bir bileşiktir. En önemli doğal oksin bakteri, bitki ve mantarlar tarafından üretilen indol-3-asetik asittir. Bitkilerde, bu fitohormon hücre bölünmesi, uzama, meyve gelişimi ve yaşlanmada önemli rol oynar. IAA, kök, yaprak ve çiçek gelişimini başlatır [Patten ve Glick, 1996].

IAA'nın bitki dokuları içerisindeki endojen üretimi dışında, rizosferde yaşayan birçok bitki ilişkili bakterinin de IAA sentezlediği bilinmektedir. IAA, bitki-bakteri arasındaki simbiyotik ilişkiyi sürdüren karşılıklı bir sinyalleşme molekülü olarak görev görmektedir. IAA üreten bakteri, tohum çimlenmesini uyarmakta, kök oluşumunu, bitki büyümesini ve gelişimini arttırmaktadır. Ayrıca bakteriyel IAA, bitki büyümesini uyararak, rizosferde bakterilerin büyümeleri için kullanabilecekleri bitki metabolitlerinin üretimini de arttırmaktadır [Duca ve ark., 2014]. Bu nedenlerden dolayı bitki IAA içeriğini geliştiren mikrobiyal suşlar PGPR etkisinin seçiminde temel bir kriter olarak kullanılabilir [Ali ve ark., 2009].

Bakteriyel IAA, endojen bitki IAA'ı ile birlikte bitki büyümesine ve gelişmesine etki etmektedir. Bu etki üretilen IAA miktarına ve bitki dokusunun IAA konsantrasyonundaki değişikliklere olan duyarlılığına bağlıdır [Vega-Celedón ve ark., 2016].

Bitki büyümesini destekleyici rizobakteriler tarafından üretilen düşük IAA miktarı kök büyümesini, kök tüylerinin oluşumunu, primer ve yan köklerin sayısını ve uzunluğunu artırırken, bazı bakteri suşları tarafından yüksek konsantrasyonda IAA üretimi kök büyümesini inhibe etmektedir [Patten ve Glick, 1996], [Duca ve ark., 2014].

IAA'nın rizobakteriler tarafından salgılanması, rizosferdeki hormon bitki hücrelerine ulaşmadan degrade olabileceği için bitkiyi düşük IAA konsantrasyonlarına maruz bırakabilmektedir [Patten ve Glick, 2002]. Bitki hücreleri, bakteriler tarafından salgılanan IAA'nın bir kısmını almakta ve endojen bitki IAA ile birlikte bitki büyümesini uyarmaktadır. *Bacillus*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* suşları kullanılarak yapılan bakteriyel aşılamalarda buğday bitkisinde kök uzunluğunda azalma, yan kök sayısında artış görülmüştür [Ali ve ark., 2009]. IAA, dikotlarda lateral kök oluşumunu indüklerken, monokotlarda adventif kök oluşumunu indüklemektedir. *A. thaliana*'da IAA, kök uzunluğunu inhibe etmekte ve lateral kök oluşumunu geliştirmektedir [McSteen, 2010].

2.8. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Enzimatik Antioksidanlar

Birçok bitki gelişme ve üreme için tam genetik potansiyellerinin ifade etmelerini engelleyen düşük çevresel şartlarda yetismekte ve biyolojik strese maruz kalmaktadır. Bu stresler biyotik ve abiyotik olabilir. Biyotik stresler, patojenleri (virüsler, bakteriler ve mantarlar), böcekleri, herbivorları ve kemiricileri içermektedir. Abiyotik stresler soğuk, sıcak, tuzluluk, kuraklık, su, radyasyon, kimyasallar ve kirleticiler, rüzgâr ve besin yoksunluğunu içermektedir [Cazervan ve ark., 2016].

Bitkiler doğada karşılaştıkları bu biyotik ve abiyotik streslere karşı kendi spesifik veya ortak tepkilerini geliştirmişlerdir. Bu tepkilerin araştırılması saha koşullarında zordur. Ancak, bitki doku kültürü ile bitkilerin çevresel streslere karşı benzersiz ve karmaşık tepkileri aseptik ve kontrollü koşullar altında incelenebilmektedir. *In vitro* olarak kontrol edilen stres ile bitkide oluşan oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemleri araştırılabilmektedir [Şen, 2012].

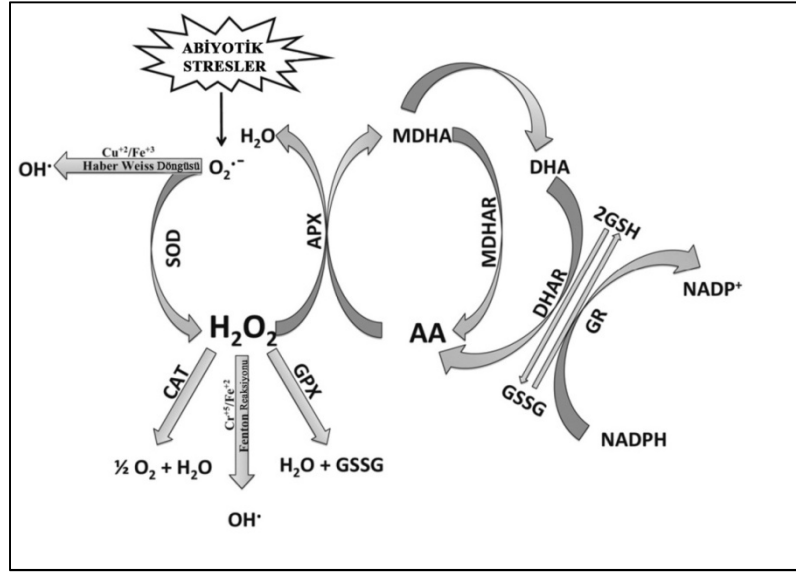
Bu biyolojik stres bitki hücrelerinde ROS birikmesine neden olur. ROS, serbest radikaller, reaktif moleküller ve oksijenden türetilen iyonlardır. ROS, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi serbest radikalleri ve hidrojen peroksit

(H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂) ve benzeri radikal olmayan molekülleri içerir. ROS kloroplast, mitokondri, plazma membranları, peroksizomlar, apoplast, endoplazmik retikulum ve hücre duvarında çeşitli yerlerde üretilir [Sharma ve ark., 2012], [Apel ve Hirt, 2004].

Süperoksit radikali moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşmaktadır. H₂O₂ bitkilerde normal aerobik metabolizma tarafından üretilen ROS türüdür. Düşük konsantrasyonlarda, H₂O₂ fotosentetik reaksiyonlar, hücre döngüsü, büyüme ve gelişme, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki tepkileri gibi belirli biyolojik ve fizyolojik işlemlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır [Sofa ve ark., 2015]. Bitki hücrelerinde H₂O₂ fazlalığı oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır. •OH bilinen en yüksek reaktif ROS'lardan birdir. Özellikle demir (Fe) gibi uygun metal varlığında, O₂ ve H₂O₂'den üretilir. •OH, DNA, proteinler, lipidler gibi biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilir. Yüksek derecede reaktif olan bu ROS'un ortadan kaldırılması için herhangi bir enzimatik mekanizmanın bulunmamasından dolayı, •OH'nin aşırı üretimi hücre ölümüne yol açmaktadır [Gill ve Tuteja, 2010].

Tüm ROS'lar yüksek konsantrasyonlarda organizmalar için son derece zararlıdır. ROS seviyesi savunma mekanizmalarını aştığı zaman, bir hücrenin "oksidatif stres" durumunda olduğu söylenmektedir. Çevresel stresler sırasında artan ROS üretimi, lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asitlerde hasara, enzim inhibisyonuna, programlanmış hücre ölümü yolunun aktivasyonuna ve nihayetinde hücrelerin ölümüne yol açan bir tehdit oluşturabilir [Sharma ve ark., 2012].

Bitkiler, ROS'u temizlemek için antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bitki hücrelerinde, kloroplastlar, mitokondri ve peroksizomlar gibi farklı organellerde spesifik ROS üreten ve gideren sistemler bulunmaktadır. Fazla ROS'un temizlenmesi veya detoksifikasyonu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), guakol peroksidaz (GPX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler bulunur [Sharma ve ark., 2012].



Şekil 2.3: ROS oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları.

SOD, tüm aerobik organizmalarda oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rol oynar. SOD enzimi metaloenzimler grubuna aittir. $O_2^{\bullet-}$ 'nin O_2 ve H_2O_2 'e ayrışmasını katalize eder (Şekil 2.3) [Gill ve Tuteja, 2010]. ROS'a karşı ilk savunma hattı olarak işlev görmektedir. Bitkilerde bakır/çinko SOD (Cu/Zn-SOD), mangan SOD (Mn-SOD) ve demir SOD (Fe-SOD) olmak üzere 3 türü bulunmaktadır [Ahmad ve ark., 2010].

Kuraklık ve metal toksisitesi dâhil olmak üzere çeşitli streslere maruz kalan bitkilerde SOD aktivitesinin arttığı bildirilmektedir. SOD'un artan aktivitesi genellikle bitkinin çevresel strese karşı toleransının artması ile ilişkilendirilmektedir [Sharma ve ark., 2012]. SOD'ların aşırı ekspresyonu, oksidatif stresin olumsuz etkileriyle mücadele eder ve bitkilerin toleransında ve hayatta kalmasında önemli bir rolü vardır [Ahmad ve ark., 2010].

Antioksidan enzimler arasında CAT ilk keşfedilen ve karakterize edilen enzimdir. İki H_2O_2 molekülünün su ve oksijene ayrışmasını katalize eden bir enzimdir. Katalaz aktivitesinin artmasının bitkinin zor koşullara adapte olmasına yardımcı olduğu ve H_2O_2 'nin toksik seviyesini en aza indirerek metabolik süreçleri koruduğu bilinmektedir [Ahmad ve ark., 2010].

Peroksidazlar patojenlere ve yaralanmaya karşı savunma, lignin ve etilen biyosentezi, stres yanıtına katılan glikoproteinlerdir. Hücreleri H_2O_2 ve türetilmiş oksijen türlerinin yıkıcı etkisinden koruyan antioksidan enzimler olarak kabul edilmektedir [Radić ve ark., 2006].

Bitkiler, stres altında antioksidan savunma mekanizmalarını aktive eder, bu da hücre bileşenlerinin yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur ve oksidatif hasarı hafifletir [Cazervan ve ark., 2016]. Genel olarak, toleranslı türler, stres koşullarında antioksidan enzim aktivitesinde bir artış sağlayarak kendilerini oksidatif stresten koruma konusunda iyi bir kapasiteye sahiptirler [Hediye Sekmen ve ark., 2007].

2.9. 2,4-Dinitrotoluen (2,4-DNT)

DNT, altı izomer olarak bulunan nitroaromatik bir patlayıcı olup, 2,4-DNT (Şekil 4.) ve 2,6-DNT iki ana formu, 2,3-DNT, 2,5-DNT, 3,4- DNT ve 3,5 DNT ise küçük izomerlerdir. Çevrede doğal olarak bulunmaz. Genellikle toluenin nitrik ve sülfirik asitle karıştırılmasıyla üretilir ve 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), poliüretan polimerler, boyalar, plastikleştiriciler ve otomobil hava yastıklarının üretiminde ara madde olarak kullanılmaktadır [Atsdr, 2016].

2,4-DNT suda çözünür, yanıcı nitroaromatik bileşiklerdir. Saf hale, hafif bir kokuya sahip soluk sarı katı maddelerdir. Tablo 2.1’de 2,4-DNT’nin fiziksel ve kimyasal özellikleri listelenmiştir [Epa, 2008]. DNT, yüzey sularında, yer altı sularında, toprağa gömülü mühimmat içeren tehlikeli atık sahalarında, DNT üreten veya işleyen tesislerden çıkan atıklarda bulunur [Salice ve ark., 2011].

Tablo 2.1: 2,4-Dinitrotoluen’in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.

2,4-DNT’nin Özellikleri	
CAS Numarası	121-14-2
Kimyasal Formülü	$C_7H_6N_2O_4$
Fiziksel Özellikleri	Sarı Katı
Moleküler Ağırlığı (g/mol)	182.14
Suda Çözünürlüğü (mg/L)	22 °C’de 300
Diğer Çözücüler	Aseton, alkol, benzen, etanol, dietil eter
Erime Noktası (°C)	71
Kaynama Noktası (°C)	300

I. ve II. Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında TNT üretimi ile ilgili imha uygulamaları, ABD ve dünyadaki mühimmat üretimi ve taşıma tesislerinde büyük bir kirlenme sorununa neden olmuştur. Mühimmat üretiminin yanı sıra poliüretan köpükler ve diğer kimyasal ürünler üretiminde DNT'nin yaygın kullanımı sonucu geniş çaplı toprak ve yer altı suyu kirlilikleri oluşmaktadır. Hem 2,4-DNT hem de 2,6-DNT US-EPA (Amerika Birleşik Devletleri Çevresel Koruma Ajansı) listesinde öncelikli kirletici maddelerdir [Atsdr, 2016], [Nishino ve ark., 1999].

DNT, ışık, oksijen ve biyota ile bozunmadığı sürece, orta derecede suda çözünürlüğü ve düşük uçuculuğu nedeniyle yüzey ve yer altı suları tarafından taşınabilmektedir. DNT'nin suya salınımı insan temasının önemli bir kaynağıdır. DNT'nin insanlar ve hayvanlarda toksik olduğu belgelenmiştir. Hayvanlarda maruziyetten sonra kan, sinir sistemi, karaciğer ve böbrekte olumsuz etkiler tespit edilmiş ve B2 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır [Atsdr, 2016], [Epa, 2008].

Ksenobiyotik bileşik olan 2,4-DNT'nin toksik, kanserojenik ve yaygın bir çevresel kirletici olması nedeni ile çeşitli biyoremediasyon teknikleri kullanılarak uzaklaştırılması, kirlenmiş alanların ve suların iyileştirilmesi amaçlanmaktadır.

2.10. 2,4-Dinitrotoluen'in Biyodegradasyonu

Nitroaromatik patlayıcıların kontaminasyonu, toprağın yenilenme kapasitesini etkileyen besin eksikliği, kuraklık, sıcaklık, soğukluk gibi abiyotik stres faktörleri ile birlikte askeri bölgelerde ve genellikle mühimmat üretim tesislerinde bulunur. Biyolojik degradasyonda oldukça inatçı olan nitroaromatikler çevrede uzun süre kalmakta; su, toprak ve toprak altının ana kirleticileri olmaktadır [Thijs ve ark., 2014]. Topraktaki patlayıcıların iyileştirilmesi için en kolay yol toprağı yakmaktır ancak bu yöntem hem oldukça maliyetli hem de sıkı kontroller gerektiren bir uygulamadır.

Biyoremediasyon tehlikeli, zehirli maddeleri zararsız ya da daha az zararlı maddelere parçalamak için mikroorganizmaların kullanıldığı bir biyoarıtım sürecidir. Ekonomik ve güvenilir bir yöntemdir [Kim ve ark., 2012].

Kirlenmiş mühimmat üretim tesislerinde 2,4-DNT'yi degrade edebilen bakteri kaynakları bulunmaktadır. Radford Ordusu Mühimmat Tesisi'nden toplanan toprak ve yüzey sularından izole edilen, 2,4-DNT'yi degrade edebilen yaklaşık 30 bakteri suşundan ikisi 2,4-DNT'de hızla büyüeyebilen Burkholderia türüne aittir [Nishino ve Paoli, 2000], [Suen ve Spain, 1993]. Ayrıca 2,4-DNT'yi degrade edebilen diğer bakteri

suşlarının, 2,4-DNT'yi degrade eden *Burkholderia* suşları ile aynı degradasyon yolağını kullandığı bilinmektedir [Nishino ve ark., 1999].

2,4-DNT'nin aerobik bozunması için bakteriyel yolak başlangıçta *Burkholderia sp.* DNT ve *Burkholderia cepacia* R34 suşları için tanımlanmıştır (Şekil 2.4) [Johnson ve ark., 2002]. 2,4-DNT'nin bakteriyel degradasyonu, 2,4-DNT'nin dioksijenasyonu ile başlar ve nitritin salınması ile 4-metil-5-nitrokatekol (4M5NC) oluşur [Johnson ve ark., 2002], [Suen ve ark., 1996]. Daha sonra 4M5NC'nin monooksijenasyonu ile 2-hidroksi-5-metilkinon (2H5MQ) oluşur. 2H5MQ, spesifik olmayan bir redüktaz ile 2,4,5-trihidroksitoluen (2,4,5-THT)'e dönüştürülür. Başka bir dioksijenaz 2,4,5-THT'nin meta bölünmesini katalize eder ve 2,4-dihidroksi-5-metil-6-okso-2,4-hekzadienoik asit (DMOHA) oluşur. Degradasyon yolağı sırasıyla metilmalonik asit semialdehit, piruvat ve propiyonil-CoA oluşumu ile devam eder ve bu bileşikler hücrenin merkezi metabolik yollarına girerler [de las Heras ve ark., 2011], [Aburto-Medina ve ark., 2017].

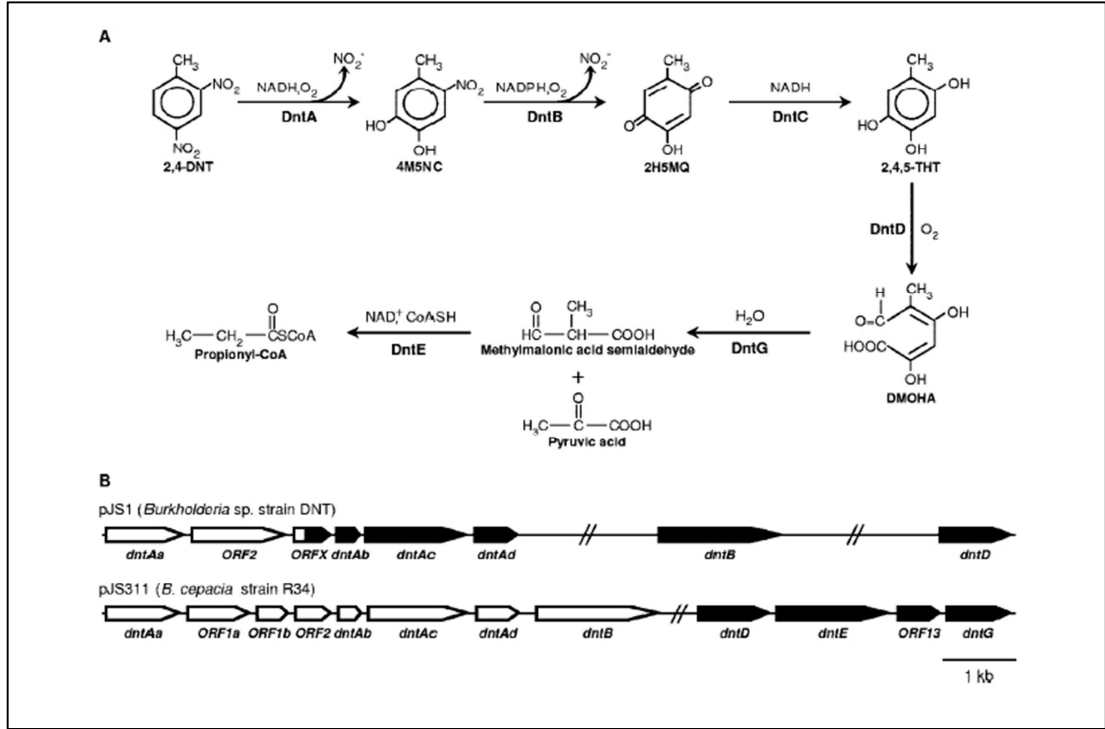
Snellinx ve ark., (2003), Kim ve ark., (2012) ve Kundu ve ark., (2015), tarafından yapılan çalışmalarda, kontamine olmuş topraklardan izole edilen bakteri suşları ile 2,4-DNT'nin biyodegradasyonu incelenmiştir.

Hudcova ve ark., (2011), 2,4-DNT ile kontamine olmuş topraktan izole edilen *P. putida* NDT1, *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) NDT2, *Achromobacter sp.* NTD3 ve *Bacillus cereus* NTD4 suşları ile yaptıkları çalışmada *P. putida* NDT1 ve 4 bakteri kültürü ile oluşturulan mikrobiyal konsorsiyumlarda 2,4-DNT'nin biyodegradasyonu incelenmiştir.

Küce ve ark., (2015), ham petrol ile kontamine olmuş topraktan izole ettikleri *Arthrobacter chlorophenolicus* ile yaptıkları çalışmada 2,4-DNT'nin degradasyonunu incelemişlerdir.

Fedeson ve ark., (2018), 2,4-DNT'yi degrade edebilen *P. putida* bakterisi ile yaptıkları çalışmada 2,4-DNT'nin biyotransformasyonunu incelemişlerdir. 250 µM 2,4-DNT içeren sıvı kültürde 2,4-DNT miktarındaki azalma ve degradasyon ürünleri analiz edilmiştir.

Akkaya ve ark., (2018), *Burkholderia cepacia* R34 bakterisine ait *dnt* genleri genomuna aktarılmış *P. putida* ile yaptıkları çalışmada 2,4-DNT'nin metabolizasyonunu incelemişlerdir.



Şekil 2.4: *Burkholderia sp.* R34'e ait 2,4-DNT degradasyon yolağı ve 2,4-DNT degradasyonunu sağlayan *dnt* genlerinin şematik organizasyonu gösterilmektedir. *dntR* düzenleyici gendir. *dntR*'ın yanında yer alan *dntA* (a / orf2 / orfX / b / c / d) kümesi çok bileşenli DNT dioksijenazı kodlar. *dntB* geni 4M5NC monooksijenazı kodlar. Son olarak *dntD*, *dntG* ve *dntE* sırasıyla 2,4,5-THT oksijenaz, DMOH izomeraz/4-hidroksi-2-keto-5-metil-6-okso-3-heksanoathidrolaz ve metilmalonat semialdehit dehidrogenazı kodlar.

Burkholderia türü bakteriler çevre ve konakçı hücrelerde hayatta kalma ve uyum sağlama yeteneğine sahiptirler. Organik bileşiklerin degradasyonunda kullanılan bu mikroorganizmalar toprakta yaşarken genellikle zararsız olmalarına rağmen, bitkilerin ve immün sistemi baskılanmış hastaların fırsatçı patojenleridir ve bazen sağlıklı bireyleri enfekte ederler [Valvano ve ark., 2005]. Ayrıca 2,4-DNT yokluğunda *Burkholderia sp.* DNT ve *Burkholderia cepacia* R34 kararsızdır. Bu istenmeyen durumlar göz önüne alınarak bu çalışmada *Burkholderia cepacia* R34 bakterisine ait DNT degradasyonundan sorumlu genleri genomunda taşıyan KT.DNT bakterisi kullanılmıştır.

2.11. Fitoremediasyon

Fitoremediasyon, çevresel kirleticilerin kaldırılması ve zararsız hale getirilmesi için yeşil bitkilerin kullanılması olarak tanımlanmaktadır [Cunningham ve Berti,

1993]. Fitoremediasyonun klasik remediasyon yöntemlerine kıyasla temel avantajları kısaca:

- i) Çevreye daha az zararlı ve tarımda kullanılan ekipman ve malzemelerden yararlanıldığından oldukça ekonomik olması
- ii) Özel imha alanlarına gereksinim duyulmaması
- iii) Toplumsal kabulünün ve desteklenme olasılığının yüksek olması
- iv) Derinlere kazmayı önleyerek çeşitli tehlikeli maddelerin remediasyonunda etkin olması

şeklinde özetlenebilir.

Bu avantajlar ve düşük maliyet göz önüne alındığında, diğer yöntemlere görece çok daha büyük ölçekli alanların temizleme çalışmalarında kullanılabilir [Macek, 2000].

Bitkiler organik kirleticileri üç mekanizma yoluyla iyileştirir: (i) Doğrudan kirletici maddelerin alımı ve ardından fitotoksik olmayan metabolitlerin bitki dokularında birikimi; (ii) mikrobiyal aktiviteyi ve biyokimyasal dönüşümleri uyaran eksudat ve enzimlerin salınımı; (iii) mikorizal mantarlar ve mikrobiyal topluluklar ile rizosferde mineralleşmenin artırılması. Bir organik kimyasal alındıktan sonra, bitki lignifikasyon yolu ile kimyasal ve parçalarını bitki yapılarında depolayabilir, karbondioksit ve suya kadar metabolize edebilir, mineralleştirebilir ya da uçucu hale getirebilir. Bir kimyasalın köklerden doğrudan alınması, bitkinin alım verimliliğine, terleme hızına ve aynı zamanda toprak suyundaki kimyasalın konsantrasyonuna bağlıdır [Schnoor ve ark., 1995].

Fitoremediasyonda bir başka yaklaşım ise mikrobiyal aerobik bozunma yollarını kodlayan genlerin transgenik bitkilere aktarılmasıdır [French ve ark., 2001]. Bu tür transgenik bitkiler fitoremediasyonda degradasyonu arttırmak, toksik bileşenlerin alımını arttırmak ve bitki toleransını arttırmak için kullanılmaktadır [Eapen ve ark., 2007], [Doty, 2008].

Tognetti ve ark., (2007), transgenik tütün ile yaptıkları çalışmada, hidroponik sistemde 2,4-DNT'nin detoksifikasyonunu incelemişlerdir. Kayıhan ve ark., (2015), nitroreduktaz enzimi kodlayan gen aktarılmış transgenik tütün bitkisi ile 2,4-DNT'nin fitodetoksifikasyon denemelerini yapmışlardır. Bitkilerde organik kirleticilerin alımı ve metabolizması iyi çalışılsa da, transgenik bitkilerin fitoremediasyondaki saha

performansları, potansiyel riskleri ve yararları hakkında çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir [Cherian ve Oliveira, 2005].

Diğer çevresel remediasyon yöntemleri gibi fitoremediasyonun da dezavantajları vardır. Fitoremediasyon uygulanacak olan alanın iklimsel ve jeolojik koşulları, sıcaklık, yükseklik, toprak tipi ve tarım ekipmanlarına erişilebilirliği gibi sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Çevresel toksisite ile bitki örtüsü oluşumu sınırlanabilir. Yapraklarda toplanan kontaminantlar, yaprak dökümü sırasında yeniden çevreye salınabilir ya da kontaminatlar yakacak odunlarda birikebilir. Diğer teknolojilere göre daha uzun sürebilir. Tüm bu dezavantajlar yöntemin kullanılacağı uygulamaya ve kirletici tipine göre değişmektedir [Macek, 2000].

Yoon ve ark., (2006), tarafından *A. thaliana* bitkisi ile yapılan çalışmada, 2,4-DNT'nin fitotoksitesisi, bitkideki transformasyon yolları ve transformasyon sonrası oluşan metabolitler incelenmiştir.

Doherty ve ark., (2019), tarafından yapılan çalışmada, 6 farklı 2,4-DNT konsantrasyonu ve iki farklı sıcaklıkta kullanılarak dört farklı Alaska bitki türü üzerinde 2,4-DNT'nin fitotoksitesisi belirlenmiştir.

Podlipná ve ark., (2015), kenevir, hardal, keten, ayçiçeği bitkilerinin 2,4-DNT ile kontamine topraklarda çimlenme ve büyüme oranlarını karşılaştırmıştır. Ayrıca 2,4-DNT'nin biyodegradasyonu sonucu oluşan 2-aminonitrotoluen ve 4-aminonitrotoluen bitki dokularında belirlenmiştir.

Rocheleau ve ark., (2010), 2,4-DNT'nin yonca, ahır otu ve İngiliz çimi üzerindeki toksitesisini araştırmıştır. 2,4-DNT miktarındaki azalma ve toprakta 2-aminonitrotoluen ve 4-aminonitrotoluen tespiti ile 2,4-DNT'nin transformasyonunu belirlemişlerdir.

2.12. 2,4-DNT'nin Bitki-Bakteri Etkileşimi Kullanılarak Biyodegradasyonu

Bitki kökü ile yakından ilişkili rizosfer, çevresindeki toprağa kıyasla çok daha fazla mikroorganizma sayısına sahiptir [Macek, 2000]. Bitkiler besin maddelerinin salınımı ve oksijenin köklere taşınması yoluyla toprak mikroorganizmalarının metabolizmasını ve büyümesini uyararak yüzey topraklarında biyoremediasyonu hızlandırabilmektedirler. Bitki ve rizosferdeki mikroorganizmalar arasındaki bu mutualist ilişki toprak kontaminantlarının daha hızlı degradasyonundan sorumludur.

Rizosferin degradasyonun gerçekleşebileceği aktif bir bölge olarak keşfedilmesi ile birlikte, bitki köklerini bakterinin degradasyon kapasitesi ile birleştirmek fitoremediasyon çalışmalarında oldukça dikkat çekmektedir [Cunningham ve Berti, 1993]. Mikrobiyal topluluklar kullanılarak yapılan biyoremediasyon teknolojilerinde karşılaşılan zorluk, mikrobiyal büyümedeki sınırlayıcı faktörleri (oksijen, besin maddeleri) kirleticilerin bulunduğu yere iletmektir. Bitkiler ise kökleri ile tüm kirlenmiş alana nüfuz ederek, mikrobiyal büyümeyi teşvik eden oksijen ve ek substratların rizosferde dağılmasını sağlayarak uygun bir yüzey altı ortamı sağlamaktadırlar. Kök sisteminin doğrusal boyutu ve yüzey alanı, özellikle kök uçlarının ve ilişkili mikroorganizmaların hacimsel dağılımı kirletici maddelerin degradasyonunda önemli bir etkidir [Shimp ve ark., 1993].

Patlayıcılar toksiktir, bozunmaya karşı dirençlidir, geniş toprak alanlarını ve yer altı suyunu kirletir. 2,4-DNT gibi nitroaromatik patlayıcılar fitotoksiktir ve degradasyon oranları bakteriyel kültürlerle kıyasla bitkilerde düşüktür. Bitki-bakteri etkileşimlerine bağlı yüksek degradasyon oranları ile bu kısıtlılık giderilebilir.

Rizosfer topluluklarının patlayıcıların degradasyonu için kullanılması aktif bir araştırma alanıdır. Bitkiler hem organik hem de inorganik kirleticileri topraklardan emer. Bu kirleticilerin bitkiler tarafından alımı, bölmelendirilmesi ve metabolik dönüşümleri kirlenmiş toprağı temizlemek için mümkündür ve potansiyel olarak kullanılabilir [Cunningham ve Berti, 1993]. Ancak bazı bitkilerin belirli ksenobiyotikleri metabolize etme kapasitelerine rağmen, bitkiler genellikle yıkıcı değil yapıcı organizmalardır. Daha zor bozunma adımlarını gerçekleştirirler ve genellikle ksenobiyotiği moleküler olarak daha basit bir son noktaya götürürler. Bitkilerde bu metabolik sürecin yavaş olması ve patlayıcıların fitotoksitesi fitoremediasyonda sınırlayıcı faktörlerdir. Ayrıca kontamine topraklardan izole edilen bakteriler *in vitro* kültürlerde patlayıcıları hızla degrade edebilmesine rağmen, patlayıcıların çevrede kalmaya devam etmesi, bakterilerin kontamine olmuş toprakların büyük oranda degradasyonu için yeterli biyokütle ve metabolik aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir. Bitki-bakteri etkileşimleri kullanılarak 2,4-DNT gibi nitroaromatik patlayıcıların etkin ve hızlı degradasyonu amaçlanmaktadır.

Dutta ve ark., (2003), tarafından yapılan çalışmada, DNT'yi biyolojik olarak degrade edebilen plasmid *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) bakterisine aktararak, *S. meliloti* DHK1'in 2,4-DNT'yi degrade etme kapasitesi değerlendirilmiştir. *S. meliloti* DHK1 ile inoküle edilen yonca tohumları farklı 2,4-DNT konsantrasyonları

içeren saksılara ekilmiş ve 6 hafta sonunda 0.14 mM ve 0.28 mM 2,4-DNT konsantrasyonunda nodül üretimi ve kuru sürgün ağırlığında artış gözlenmiştir. Ayrıca *S. meliloti* DHK1 ile inoküle edilen ve farklı konsantrasyonlarda 2,4-DNT içeren topraklarda 2,4-DNT miktarındaki azalma HPLC ile analiz edilmiştir.

Monti ve ark., (2005), tarafından yapılan çalışmada, *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkileri 2,4-DNT'yi degrade edebilen *P. fluorescens* RE bakterisi ile inoküle edilmiş ve bitki büyümesi üzerine etkileri araştırılmıştır. 2,4-DNT içeren toprakta *P. fluorescens* RE bakterisinin varlığının, 2,4-DNT'nin bitki büyümesi üzerindeki toksik etkisini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, *P. fluorescens* RE bakterisinin 2,4-DNT'yi degrade etme yeteneği sıvı kültürde test edilmiş, 2,4-DNT miktarında azalma ve degradasyon ürünleri tespit edilmiştir.

Remans ve ark., (2012), 2,4-DNT'yi degrade edebilen dört bakteri suşunun bitki besi ortamı üzerine aşılandığında, Geobacillus dışındaki tüm suşların 1 mg/L 2,4-DNT konsantrasyonunda *A. thaliana* primer kök büyümesini ve kök tüyü oluşumunu desteklediğini göstermiştir.

2.13. Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı

A. thaliana ve *N. tabacum*'un bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine *P. putida* KT2440'ın etkisinin *in vitro* koşullarda araştırılması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkisine ait tohumlar ve fidecikler çeşitli konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarıyla farklı inokülasyon teknikleri kullanılarak *in vitro* doku kültürü koşullarında inoküle edilmiştir. Bu rizobakteri-bitki arasındaki etkileşimin bitkinin değişik fizyolojik evrelerinde yarattığı etki değerlendirilerek;

- *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkilerinin büyümesi ve gelişimi üzerine *P. putida* KT2440'ın etkisinin *in vitro* koşullarda görüldüğü inokülasyon yöntemi belirlenmiş,
- En uygun inokülasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilecek bakteriyel inokülasyon için *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkilerinin optimum fizyolojik evreleri belirlenmiş,

- Bitki-bakteri etkileşiminde *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkileri üzerinde *P. putida* KT2440'ın etkisinin görüldüğü optimum bakteri konsantrasyonu belirlenmiş ve
- İnokülasyon sonrası *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitki köklerinde *P. putida* KT2440'ın kolonizasyonu ve bitkideki lokalizasyonu belirlenmiştir.

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin hem biyotik hem de abiyotik stres faktörlerini kontrol etmek için kullanılması, sağlıklı ürünler üretmek ve tarımda mahsül verimini arttırmak için önemli bir stratejidir. Bu çalışmada *P. putida* KT2440 bakterisinin *A. thaliana* bitkisinde büyüme ve stres toleransını artırma potansiyeli değerlendirilmiştir.

2,4-DNT patlayıcı sanayinde ve poliüretan köpük yapımında kullanılan ksenobiyotik bir bileşiktir. Toksik, karsinojenik ve geniş çevresel yayılım özelliklerinden dolayı US-EPA tarafından öncelikli kirletici olarak rapor edilmiştir. Bu nedenle 2,4-DNT'nin biyoremediasyonu ve mineralizasyonu önemlidir. Tez kapsamında *Burkholderia cepacia* R34 bakterisine ait *dnt* degradasyonundan sorumlu genler genomuna aktarılmış KT.DNT bakterisi, *A. thaliana* ile inoküle edilmiştir. 2,4-DNT muamelesinin ardından, 2,4-DNT'nin bitki üzerindeki toksik etkisi ve bitki köklerinde kolonize olan KT.DNT bakterisinin 2,4-DNT'yi degrade edebilme yeteneği bitki doku kültürü koşullarında ve *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı

Bu çalışmada iki model bitki olan *A. thaliana* Col-0 ve *N. tabacum* Samsun kullanıldı. Tohumların çimlendirilmesi ve steril fidelerin yetiştirilmesi ½ MS (Murashige ve Skoog, Duchefa) besi ortamında gerçekleştirildi.

3.1.2. Bakteri Soyu ve Bakteri Kültür Ortamı

P. putida ve DNT degradasyonundan sorumlu yolağı taşıyan KT.DNT bakterisi [Akkaya, yayınlanmamış] kullanılmıştır.

P. putida KT2440 soyu daha önce *A. thaliana* bitkisi ile yapılmış deneylerde [Batoöl, 2018] besiyerinin tek başına bitki büyümesi üzerine olumlu etki göstermesi nedeniyle MPYE besiyerinde büyütülmüştür.

3.1.3. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar.

	Kimyasal Adı	Firma Adı	Katolog No
MPYE Besiyeri	Pepton	Merck	1.07214.0500
	Maya Ekstraktı	Merck	1.03753.0500
	MgCl ₂	Merck	105833
	CaCl ₂	Duchefa	C0504
	Agar	Merck	1.05450.0500
LB Besiyeri	LB Broth Miller	BD Difco	244620
	Agar	Affymetrix/USB	AAJ10907A1
MS Besiyeri	MS	Duchefa	M022
	Sukroz	Duchefa	S0809
	Gelrite	Duchefa	G1101

Tablo 3.1: Devam.

IAA	L-triptofan	Sigma	T0254-1G
	Hoechst 34850	Invitrogen, USA	H21486
Yapraklardaki Protein Miktarının Belirlenmesi	Bovin Serum Albumin (BSA)	Capricorn	CP17-1700
	Bradford	Sigma	B6916
	Polivinilpolipirrolidon	Sigma	P2307
	EDTA	Calbiochem	324503
SOD Enzim Aktivitesi	KH ₂ PO ₄	Chem Cruz	7778-77-0
	K ₂ HPO ₄	Alfa Aesar	11593
	L-metiyonin	Labochem International	LC-4587.3
	Nitrotetrazolium Blue (NBT)	Sigma	N6876-500MG
	Riboflavin	Applchem	A6279,0025
Katalaz Enzim Aktivitesi	H ₂ O ₂	Merck	107209
POX Enzim Aktivitesi	o-dianizidin	Chem Cruz	SC-215608
H ₂ O ₂ Miktarının Belirlenmesi	Trikloroasetik asit	Sigma	76-03-9
2,4-DNT'nin Biyodegradasyonu	Aseton	Merck	1000141000
	Asetonitril	Merck	
	2,4-Dinitrotoluen	Sigma	101397-100G
	DMSO	Merck	102950
	4M5NC	Santa Cruz	SC-210114

3.1.4 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.

Cihaz Adı	Cihaz Modeli	Firma Adı
Spektrofotometre	UV-1800	Shimadzu
HPLC		Shimadzu
HPLC UV Dedektör	SPD-20A	Shimadzu
McFarland	CrystalSpec Nephelometer	BD 245009
İnkübatör	EC-160	Nüve
Soğutmalı İnkübatör	ES-120	Nüve
Hassas Terazı	TP3030	Denver Enstrument
Soğutmalı Santrifüj	CF48R	Awel
pH Metre	Hanna	Ph209
Otoklav	HV-110L	Hiyarama
Etüv	DIN 1288	Binder
Konfokal Mikroskobu	Zeiss LSM 880	Zeiss
Mikroplaka Okuyucu	Thermo	Varioskan
Spektrofotometre		

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine *P. putida* KT2440’ın Etkisinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Bakteri Büyüme Koşulları

P. putida bakterisi -80 °C’teki gliserol stoktan alınarak MPYE katı besiyerinde büyütüldükten sonra, elde edilen tek koloniden MPYE besiyerinde kültür başlatılarak, bakteri gece boyu 30 °C’ta 170 rpm çalkalamalı inkübatörde büyütüldü.

MPYE (Mineral Peptone Yeast Extract) sıvı besiyeri 3 g/L pepton, 3 g/L maya ekstraktı, 1 ml 1M MgCl₂ ve 1 ml 1M CaCl₂ eklenerek hazırlanmıştır [Daldal ve ark., 1986]. pH 0.1M NaOH veya 0.1M HCl kullanılarak 7'ye ayarlandıktan sonra 1 atmosfer basınçta 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.

Gece boyu büyüme sonrası bakterinin OD₆₀₀ değeri spektrofotometre ile ölçülmüş ve bakteri kültürü MPYE besiyeri ile seyreltilerek 10²-10⁶ CFU/ml konsantrasyonlarda bakteriyel süspansiyonlar hazırlanmıştır.

3.2.1.2. *P. putida*'nın Koloni Sayısının Belirlenmesi

Gece boyu büyüme sonrası bakteri kültürü McFarland 0,5 standardı ile eşit olacak şekilde ayarlanmış ve OD₆₀₀ değeri 0,2 ölçülmüştür. Bakteri kültüründen 10⁻¹-10⁻⁸ arası seri dilüsyonlar halinde hazırlanarak, her birinden MPYE katı besiyeri içeren 3'er Petriye 100 µl örnek Drigalski spatülü ile yayılmıştır. Petriler gece boyu 30 °C'ta inkübasyona bırakılarak; inkübasyon bitiminde 30 ile 300 arasında koloni içeren seyreltimlerin bulunduğu Petriler seçilmiş ve sayılmıştır. 10⁻⁶ dilüsyona ait Petrilerden sırasıyla 139, 104 ve 104 koloni sayılmış, hesaplamalar bu Petri plakaları üzerinden yapılmıştır. Büyümüş sıvı kültürdeki bakteri sayısını CFU/ml (colony-forming units per milliliter) cinsinden belirlemek üzere aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{(Petri plakalarındaki bakteri sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü)}}{\text{Petri plakasına yayılan hacim (ml)}} \quad (3.1)$$

$$P. putida \text{ için } 0,5 \text{ McFarland} = 2 \times 10^9 \text{ CFU/ml} \quad (3.2)$$

3.2.1.3. *A. thaliana* ve *N. tabacum* Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi

A. thaliana ve *N. tabacum* tohumlarının çimlendirilmesinde ve steril fidelerin yetiştirilmesinde 2,2025 g/L ½ MS (Murashige ve Skoog, Duchefa) besi ortamına 10 g/L sukroz ve 3 g/L Gelrite (katılaştırıcı) eklenerek hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı NaOH eklenerek 5,7 ayarlandıktan sonra 1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.

Çimlendirmeden önce *A. thaliana* tohumlarının yüzey sterilizasyonu %70'lik etil alkol içerisinde bir dakika, %15'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisinde 10 dakika bekletilip, steril distile su ile 3 defa 5'er dakika yıkanılarak yapılmıştır.

N. tabacum tohumlarının yüzey sterilizasyonu %30'luk sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisinde 20 dakika bekletilip, steril distile su ile 3 defa 5'er dakika yıkanılarak yapılmıştır.

Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar ½ MS besi ortamı içeren Petrilerin üst bölümüne yatay bir sıra halinde 10'ar tane olarak yerleştirilmiştir. Petriler çimlenmeyi senkronize etmek için karanlıkta 4 °C'ta 3 gün boyunca bekletilmiştir. 3 günün sonunda Petriler bitki büyüme odasına dikey olarak yerleştirilmiş ve 22 °C'ta 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında büyümeye bırakılmıştır.

3.2.1.4. Bitkilerin *P. putida* KT2440 Bakterisi ile İnokülasyonu

A. thaliana ve *N. tabacum* bitkileri tohum ve fidecik olmak üzere iki farklı fizyolojik evrede, *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlardaki (2×10^2 - 2×10^6 CFU/ml) süspansiyonları ile inoküle edilmiştir. Vernalizasyondan hemen sonra 0-,3-,5-,10- ve 14- günlük bitkiler bakteri ile inokülasyon için kullanılmıştır.

3.2.1.4.1. *A. thaliana*'nın *P. putida* KT2440 ile İnokülasyonu

A. thaliana tohum ve fidecikleri, *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlardaki (2×10^2 - 2×10^6 CFU/ml) süspansiyonları ile 3 farklı inokülasyon yöntemi (yayma, pipetleme ve daldırma) kullanılarak inoküle edilmiştir.

Üç inokülasyon yönteminde de, bakteriyle inoküle edilmeyen *A. thaliana* bitkicikleri kontrol olarak kullanılmış, her bir Petri plakası 10 bitki içerecek ve 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak uygulanan pipetleme tekniğinde, ½ MS besi ortamındaki *A. thaliana* bitkicikleri ve üzerine MPYE besiyeri inoküle edilmiş bitkiciklerin ölçümlerinde benzer sonuçları vermesi nedeniyle; yayma yönteminde sadece bakteri inokülasyonunun olmadığı *A. thaliana* bitkicikleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.2.1.4.1.1. Pipetleme Yöntemi

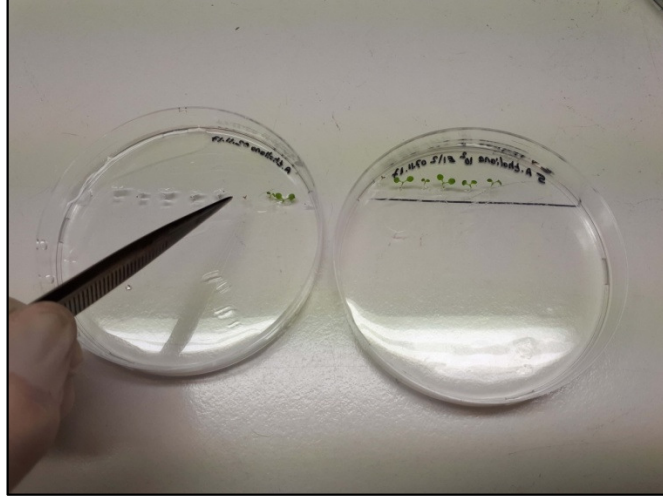
Pipetleme yöntemi ile inokülasyon Ishiga ve ark., (2011)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde yarı-katı MS besiyerinde büyütülen 0-, 3-, 5-, 10- ve 14- günlük *A. thaliana* bitkicikleri kullanılmıştır. 2×10^2 - 2×10^6 CFU/ml olacak şekilde hazırlanan bakteri dilüsyonlarından ve sadece MPYE besiyerinden 1 ml, bu bitkicikler üzerine pipetlenmiştir. Petri plakaları bir süre kurumaya bırakıldıktan sonra, dikey olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir.

3.2.1.4.1.2. Daldırma Yöntemi

Daldırma yöntemi ile inokülasyon Bashan (1986)'e göre yapılmıştır. Gece boyu büyütülmüş *P. putida* bakterisinin 2×10^2 - 2×10^6 CFU/ml farklı dilüsyonları MPYE besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri dilüsyonları steril cam Petrilere dökülmüş ve 0-, 3-, 5-, 10-, 14-günlük *A. thaliana* fidecikleri penset yardımı ile bu Petrilere içerisine konulmuştur. Oda sıcaklığında 35 rpm 30 dakika çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra steril filtre kağıdı üzerine alınan *A. thaliana* tohum ve fidecikleri penset yardımı ile yarı-katı MS besi ortamı içeren Petrilere üzerine yerleştirilmiş ve dikey olarak bitki büyüme odasına bırakılmıştır.

3.2.1.4.1.3. Yayma Yöntemi

Yayma yöntemi ile inokülasyon Monti ve ark., (2005)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde, gece boyu büyütülmüş *P. putida* bakterisinin 2×10^2 - 2×10^6 CFU/ml olacak şekilde farklı dilüsyonları MPYE besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardan ve kontrol olarak sadece MPYE besiyerinden 100 mikrolitre yarı-katı MS besiyeri üzerine Drigalski spatülü ile yayılmıştır. 2 saat 30 °C'de inkübasyon sonrası 0-, 3-, 5-, 10-, 14-günlük *A. thaliana* bitkicikleri hazırlanan bu Petri plakaları üzerine penset yardımı ile yerleştirilerek, dikey bir şekilde bitki büyüme odasına bırakılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: 5 günlük *A. thaliana* fideciklerinin yayma yöntemi kullanılarak *P. putida* ile inoküle edilmiş ½ MS besi ortamı içeren Petrilere yerleştirilmesi.

3.2.1.4.2. *N. tabacum*'un *P. putida* KT2440 ile İnokülasyonu

N. tabacum tohum ve fidecikleri *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlardaki (2×10^3 - 2×10^6 - 2×10^8 CFU/ml) süspansiyonları ile yayma ve daldırma yöntemi kullanılarak inoküle edilmiştir.

Çalışma her bir Petri plakası üzerine 10 bitki yerleştirilecek ve 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol olarak bakteri ile inoküle edilmemiş *N. tabacum* tohum ve bitkicikleri kullanılmıştır.

3.2.1.4.2.1. Yayma Yöntemi

Gece boyu büyütülmüş *P. putida* bakterisinin 2×10^3 , 2×10^6 ve 2×10^8 CFU/ml olacak şekilde dilüsyonları MPYE besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardan ve kontrol olarak sadece MPYE besiyerinden 100 mikrolitre yarı-katı MS besiyeri üzerine Drigalski spatülü ile yayılmış ve 2 saat 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5-, 10-, 14-günlük *N. tabacum* bitkicikleri hazırlanan bu Petri plakaları üzerine penset yardımı ile yerleştirilerek, dikey bir şekilde bitki büyüme odasına bırakılmıştır.

3.2.1.4.2.2. Daldırma Yöntemi

Gece boyu büyütülmüş *P. putida* bakterisinin 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonu MPYE besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri dilüsyonu 2 ml'lik steril ependorflara aktarılmış ve 0-günlük *A. thaliana* tohumları penset yardımı ile bu ependorflar içerisine konulmuştur. Ependorflar oda sıcaklığında 14 rpm 3, 6, 9 ve 18 saat çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra steril filtre kağıdı üzerine alınan *N. tabacum* tohumları penset yardımı ile yarı-katı MS besi ortamı içeren Petriler üzerine yerleştirilmiş ve dikey olarak bitki büyüme odasına bırakılmıştır.

3.2.1.4.3. Ölçüm ve Analizler

Bitki çimlenmesi ve gelişimi üzerine bakterinin etkisini gözlemleyebilmek amacıyla, *P. putida* KT2440 ile 0-,3-,5-,10-günlük iken inoküle olan *A. thaliana* bitkilerinin 14. gün, 14-günlük iken bakteri ile inoküle edilen *A. thaliana* bitkilerinin ise 21. gün ölçüm ve analizleri yapılmıştır. 0-, 5-, 10- ve 14-günlük bakteri ile inoküle olan *N. tabacum* bitkilerinin ise ölçüm ve analizleri 21. gün yapılmıştır.

A. thaliana ve *N. tabacum* tohumlarının çimlenme oranları belirlenmiş ve her bir grubun çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Çimlenme yüzdeleri Bewley ve Black, (1994), referans alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Çimlenme Oranı} = \left(\frac{\text{Çimlenen tohum sayısı}}{\text{Petriye ekilen tohum sayısı}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

Petrilerdeki her 10 bitkiden 6-8 tanesinin gövde boyu (cm) ve kök boyu (cm) ölçümleri yapılmıştır. Bitkilerin gövde boyları ve kök boyları ölçüldükten sonra, bitkinin kök ve gövdesi birbirinden ayrılarak yaş gövde ağırlığı (g) ve yaş bitki ağırlığı (g) $\pm 0,1$ g hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Yaş ölçümleri yapılan örnekler, içerisine filtre kağıdı yerleştirilen cam Petrilere sıra ile yerleştirilmiş, 65 °C etüvde 24 saat kurutulduktan sonra kuru gövde ağırlıkları ve kuru bitki ağırlıkları (g) $\pm 0,1$ mg hassas terazide tartılarak belirlenmiştir.

Her Petriden iki adet bitkinin kök ve gövdesi birbirinden ayrılıp gövde yaş ağırlığı ölçüldükten sonra, her bir gövde 2 ml saf aseton içeren ependorf tüplerine konulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: *A. thaliana* fideciklerinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarının analizi.

A. thaliana örnekleri 4 °C’de karanlıkta 2 gün, *N. tabacum* örnekleri 1 gün bekletilmiştir. Daha sonra hazırlanan örneklerin λ_{661} nm, $\lambda_{644,8}$ nm ve λ_{470} nm dalga boylarında absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okunmuştur. Klorofil a, klorofil b ve total karotenoid tayinleri Lichtenthaler ve Buschmann (2001)’e göre aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Çözücü olarak saf aseton kullanılmıştır.

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 11.24 A_{661.6} - 2.04 A_{644.8} \quad (3.4)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 20.13 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6} \quad (3.5)$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.90 c_a - 63.14 c_b) / 214 \quad (3.6)$$

Kök tüylerinin görüntülenmesi Remans ve ark., (2012)’e göre yapılmıştır. Kök tüylerini görüntülemek için kökler %70 lik etil alkol içerisinde çözünmüş %0,075’lik kristal viyole ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile durulandıktan sonra fotoğraflanmıştır.

3.2.1.5. *P. putida* KT2440 bakterisinin *A. thaliana* ve *N. tabacum* Köklerindeki Lokalizasyonu

P. putida bakterisinin bitkideki yerleşimini belirlemek amacıyla, pSEVA237-G plazmiti (Prof. Dr. Victor de Lorenzo CNB/CSIC, İspanya, tarafından sağlandı, <http://seva.cnb.csic.es>) ile transforme edilmiş bakteri [Akkaya, yayınlanmamış], *A. thaliana* ve *N. tabacum* ile inokülasyon için kullanıldı. İnokülasyondan 4 gün sonra bakterinin yerleşimini belirlemek için taze olarak *A. thaliana* bitkisi köklerinden mikroskop örnekleri hazırlanarak konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM, Zeiss LSM 880) ve mikroskoba bağlı yazılım (Zen Black) ile incelendi. Bitki dokularının boyanması için Hoechst 34850 (Invitrogen, USA) kullanıldı. Hoechst 34850 (10µg ml/l) ile boyanan hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve boyanmış hücrelere ait görüntüler Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskopta (Carl Zeiss, Jena, Germany) alındı. Bu amaçla Hoechst için 408 nm dalga boyundaki lazer ve 410 nm-497 nm aralığındaki filtre kullanıldı. GFP için de 488 nm lazer ile uyarım sağlanarak 493 nm-637 nm aralığındaki filtre kullanıldı. DIC kök görüntüleri için de 488 nm dalga boyundaki lazerde T-PMT açılarak görüntü alındı. Çalışma boyunca 10X ve 20X objektifler kullanıldı.

3.2.1.6. İndol Asetik Asit (IAA) Tayini

IAA miktar tayini Meliani ve ark., (2017)'ye göre yapılmıştır. Örneklerdeki IAA miktarını tayin edebilmek için standart eğri oluşturulmuştur. IAA'in 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır. Daha sonra içlerinde 1 ml Salkowski Reagent (1ml 0,5 M FeCl₃ + 49 ml %35 HClO₄) bulunan deney tüplerine hazırlanan IAA konsantrasyonlarından 1 ml eklenmiştir. Oda sıcaklığında 25 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometrede 530 nm'deki absorbansları ölçülüp, miktar tayininde kullanılmak üzere kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

P. putida KT2440 bakterisinin IAA üretimi L-triptofan varlığında kolorimetrik olarak hesaplanmıştır. *P. putida* KT2440 bakterisi tek koloniden 50 µg/ml - 500 µg/ml L-triptofan içeren DF salt besiyerinde (Dworkin ve Foster, 1958) kültür başlatılarak, 48 ve 72 saat 30 °C'ta 170 rpm çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Pozitif kontrol

olarak kullanılan *E. coli* kültürü, 48 saat 37 °C'ta 170 rpm çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Kontrol gruplarına L-triptofan eklenmedi. 48 ve 72 saat sonunda bakteri kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri spektrofotometrede ölçüldü. Bakteri kültürlerinden 2 ml ependorf tüplerine alınıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvıdan 1'er ml alınarak deney tüplerine konuldu. Üzerlerine 1 ml Salkowski Reagent eklenip, oda sıcaklığında 25 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometrede 530 nm'deki absorbansları ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak, ölçülen absorbans değerlerine göre bakterilerin IAA üretimi µg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.2.1.7. *A. thaliana* Bitkisinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

7 günlük *A. thaliana* bitkisi, *P. putida* KT2440 bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonundaki süspansiyonu ile yayma yöntemi ile inoküle edilmiştir. İnokülasyonu takip eden 1, 3 ve 5. günlerde toplanan 0,1 g *A. thaliana* yaprak örnekleri, sıvı azotta dondurularak analiz süresine kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.7.1. Yapraklardaki Protein Miktarının Belirlenmesi

A. thaliana yapraklarındaki protein içerikleri, Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Protein tayini için tüm standart ve örnekler iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. 0,1 mg/ml bovin serum albümin (BSA) stok standardı hazırlanmıştır. Absorbans 595 nm ölçülüp, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Yaprak örneklerinin bulunduğu ependorflar -80 °C'den sıvı azota alındı. Her bir ependorf içerisine iki adet boncuk atılarak, homojenizatör 25 frekansta 1 dakika çalıştırıldı. Buz üzerine alınan örneklerin içerisine 1 ml ekstraksiyon tamponu (%2 polivinilpolipirrolidon (PVP) ve 0,1 mM EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu, pH 7,8) eklenerek hızlıca vortekslendi. Homojenat, 4 °C'de 13000 rpm 30 dakika santrifüj sonrası üst sıvılar enzim aktivitelerinin tayininde kullanılmak üzere yeni ependorflara alınmıştır.

Yaprak ekstraktlarındaki çözülebilir protein miktarlarını belirlemek için 200 µl Bradford bulunan kuyucuklara 10 µl örnek eklenmiş, 10 dakika inkübasyon süresinden sonra 595 nm absorbans değeri kaydedilmiştir. Kör olarak 200 µl Bradford + 10 µl

ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Ölçülen absorbans değerlerinin standart eğrinin eğimine bölünmesi ile örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmış ve enzim aktivite deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.1.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD enzim aktivitesi Banowetz ve ark., (2004)'e göre belirlenmiştir. SOD enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ölçüm tamponu Tablo 3.3'e göre hazırlandı.

Tablo 3.3: SOD Ölçüm Tamponunun Hazırlanması.

Bileşenler (Stok)	Bir Reaksiyon İçin Gereken Miktar (μL)	Son Konsantrasyon
Fosfat tamponu (pH 7,8) (250 mM)	40 μL	50 mM
L-metiyonin (100 mM)	26 μL	13 mM
EDTA (0,5 mM)	4 μL	0,1 mM
NBT (750 μM)	20 μL	75 μM
Tampon Toplam Hacim	90 μL	
Riboflavin 1 mM + dH ₂ O	0,4 μL + 89,6 μL dH ₂ O	2 μM
Toplam Hacim	180 μL	

Bir reaksiyon için mikrolaka kuyucuklarına 90 μL ölçüm tamponu, 90 μL 2 μM riboflavin+dH₂O ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu olan örneklerden 20 μL eklendi. Reaksiyon riboflavinin eklenmesi ile başlatıldı. Örneklerin 560 nm'deki absorbansları Varioskan mikrolaka okuyucu ile ölçüldü. 20 dakika ışık altında bekletildikten sonra örneklerin 560 nm'deki absorbansları tekrar ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol olarak kuyucuklara tampon ve riboflavin eklendi. Negatif kontrol karanlıkta bekletildi, pozitif kontrol ise örnekler ile beraber 20 dakika ışık altında bekletildi. Negatif kontrol kör olarak kullanıldı.

Fotokimyasal olarak nitro blue tetrazolium'un (NBT) azalmasını önleme yeteneği SOD aktivitesi olarak tanımlanmıştır [Beauchamp ve Fridovich, 1971]. Bir

birim SOD aktivitesi, 560 nm’de NBT redüksiyon oranının %50 inhibisyonuna neden olmak için gereken enzim miktarıdır [Cakmak ve Marschner, 1992].

3.2.1.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesi Chance ve Maehly, (1954)’e göre hesaplanmıştır. 1 ml son hacime sahip reaksiyon karışımı 50 µl 200 mM H₂O₂, 50 µg/ml protein miktarı içeren örnek hacmi ve 50 mM fosfat tamponundan (pH 7) oluşmaktadır. Kör olarak 50 µl 200 mM H₂O₂ + 950 µl fosfat tamponu kullanılmıştır. Reaksiyon H₂O₂’nin eklenmesi ile başlatılmış ve örnekler kuvartz küvet kullanılarak ölçülmüştür. Spektrofotometrede 240 nm absorbanstaki düşüş 90 saniye boyunca kaydedilmiştir. Katalaz enzim aktivitesi, dakikada tüketilen nmol/mg H₂O₂ olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.7.4. Peroksidaz (POX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz enzim aktivitesi Quesada ve ark., (1990)’ a göre yapılmıştır. Analiz ortamı 10 mM H₂O₂, %0,02 o-dianizidin, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7) ve 200 µl protein ekstraktı kullanılarak hazırlandı. Kör olarak 50 µl H₂O₂ + 50 µl o-dianizidin + 900 µl fosfat tamponu kullanılmıştır. Örneklerin spektrofotometrede 460 nm’deki absorbanları 150 saniye boyunca kaydedilmiştir. POX enzim aktivitesi, dakikada tüketilen µmol ml⁻¹ H₂O₂ olarak tanımlanmıştır.

3.2.1.7.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

Hidrojen peroksit miktarı Brennan ve Frenkel, (1977)’e göre belirlendi. Yaprak örneklerinin bulunduğu ependorflar -80 °C’den sıvı azota alındı. Her bir ependorf içerisine iki adet boncuk atılarak, homojenizatör 25 frekansta 1 dakika çalıştırıldı. Örnekler üzerine 3 ml %0,1 trikloroasetik asit (TCA) eklenerek homojenize edildi. Homojenat, 4 °C’de 11300 rpm 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant H₂O₂ miktar tayininde kullanılmak üzere deney tüplerine alınmıştır.

H₂O₂ standart eğrisi oluşturmak için 0,05 mM-0,5 mM arasındaki konsantrasyonlarda H₂O₂ standartları Tablo 3.4’e göre hazırlandı. Standartlar hazırlanırken 100 ml 0,5 mM H₂O₂ stok kullanıldı. Hazırlanan standartların

spektrofotometrede 390 nm'deki absorbansları kaydedildi ve kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Tablo 3.4: Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Standartlarının Hazırlanması.

Deney Tüpü	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O ₂ ml	0	100 µl	200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	1000 µl
0,1 M Tris/HCl (pH 7,6)	1000 µl	900 µl	800 µl	600 µl	400 µl	200 µl	0
1M KI	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

1 ml'lik analiz ortamı 250 µl 0,1 M Tris/HCl (Ph 7,6), 500 µl 1M potasyum iyodür (KI) ve 250 µl örnek eklenerek oluşturulmuştur. Oda sıcaklığında karanlıkta 90 dakika inkübasyon sonrası, spektrofotometrede 390 nm'deki absorbansları ölçüldü.

3.2.1.8. 2,4-Dinitrotoluen'in *in vitro* *A. thaliana* Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin KT.DNT Varlığında Değerlendirilmesi

10 günlük *A. thaliana* bitkicikleri *P. putida* KT2440 ve KT.DNT bakterilerinin 2x10³ CFU/ml konsantrasyonu ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edildi. 14 günlük *A. thaliana* bitkileri 3 ve 30 µM 2,4-DNT içeren ½ MS besisi ortamına aktarıldı. Kontrol olarak bakteri ile inoküle edilmemiş 14. günlük *A. thaliana* bitkileri kullanıldı. Ayrıca 2,4-DNT'yi çözmek için kullanılan dimetil sülfoksit'in (DMSO) *A. thaliana* bitkileri üzerindeki etkisini gözlemlemek için 50 µl ve 500 µl DMSO içeren ½ MS besisi ortamına aktarılmış bitkiler kullanıldı.

Bitkilerin 21. gününde yaprak sayısı, gövde uzunluğu, yaş gövde ağırlığı, yaş kök ağırlığı, yaş bitki ağırlığı, kuru gövde ağırlığı, kuru kök ağırlığı, kuru bitki ağırlığı ölçülmüş; klorofil a, klorofil b ve total karotenoid miktarı hesaplanmıştır.

3.2.1.9. 2,4-Dinitrotoluen'in Biyotransformasyonunun Analitik Yöntemlerle Analizi

10 günlük *A. thaliana* bitkicikleri KT.DNT bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonu ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edilerek büyümeye bırakıldı. Bakteri ile inoküle edilmeyen ve aynı koşullarda büyütülen *A. thaliana* bitkicikleri deneyde kontrol olarak kullanıldı. 14 günün sonunda büyüyen bakteriyle inoküle edilmiş ve edilmemiş *A. thaliana* bitkicikleri, steril koşullar altında, 30 ml sıvı ½ MS besi ortamı içeren 100 ml'lik erlenlere aktarıldı. Her erlene 10 adet *A. thaliana* bitkisi konuldu. Erlenler bir saat bitki büyüme odasında 100 rpm'de çalkalandı. Bir saat sonra erlenlerden birine 2,4-DNT (0,5 mM), diğer erlene ise aynı hacimde (50 µl) DMSO eklenerek, bitki büyüme odasında 100 rpm'de çalkalanarak, renk değişimi takip edildi. Erlenlerden 1'er ml ikişer örnek alınarak, spektrofotometrede 420 nm'deki absorbansı ölçüldü.

Bitki-bakteri birlikteliği sonrasında köklere tutunmuş bakterinin 2,4-DNT'yi degrade edebilme kapasitesini değerlendirmek için erlenlerden alınan örnekler yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak DNT'nin degradasyonu ve degradasyon ürünü 4M5NC'ün oluşumu için analiz edildi. Erlenlerden alınan örnekler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz ependorflara alınarak analiz süresine kadar -20 °C'ye kaldırıldı. Analiz zamanında 0,45µm'lık membran filtreden geçirildi ve UV/VIS dedektör ile 254 nm dalga boyunda, C18 kolon kullanılarak HPLC (Shimadzu 10A, Shimadzu, Colombia, MD) analizine tabi tutuldu. 2,4-DNT ve 4M5NC için kullanılan HPLC metodu Tablo 3.5'te verilmiştir. Örnekler 12 dakika süresince analiz edildi.

Tablo 3.5: Kullanılan HPLC Metodu.

HPLC Metodu	
Mobil faz	Asetonitril:distile su
Akış hızı	0,5 ml/dk
Kolon sıcaklığı	30-40 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

2,4-DNT ve 4M5NC konsantrasyonlarının belirlenmesi için standartlar hazırlanarak 0,45 µm'lık membran filtreden geçirildi ve HPLC analizleri Tablo 2.5'te

belirtilen metoda göre yapıldı. Analiz sonuçlarına göre 2,4-DNT ve 4M5NC için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

3.2.1.10. İstatistiksel Analizler

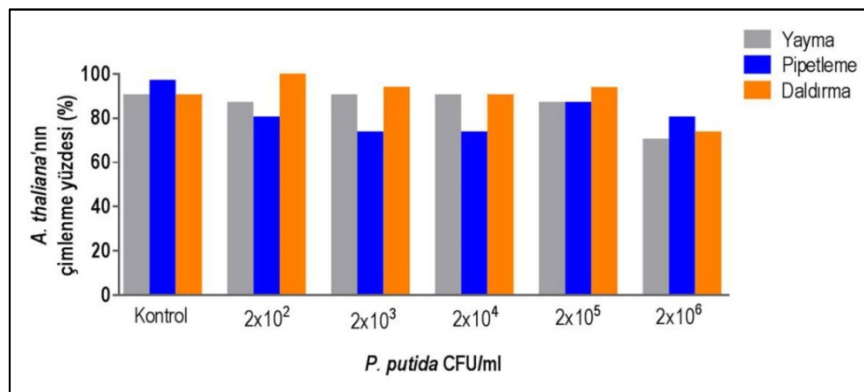
A. thaliana ve *N. tabacum* ile yapılan çalışmalarda, her grup için 3 Petri kullanılmış ve her Petriye 10 adet tohum ekilmiştir. İstatistiksel analizler tek yönlü ANOVA testi ile GraphPad Prism 6.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklar Tukey testi kullanılarak $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. *A. thaliana* Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine *P. putida* KT2440'ın Etkisinin Değerlendirilmesi

4.1.1. *P. putida* KT2440'ın *A. thaliana* Tohum Çimlenmesine Etkisi

Üç farklı inokülasyon yöntemi uygulanarak *P. putida* ile inoküle edilen *A. thaliana* tohumlarının çimlenme kapasitesini belirlemek için çimlenme testi uygulanmıştır. Her grup için 3 Petri kullanılmış ve her Petriye 10 adet tohum ekilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, daldırma yöntemi ile 2×10^2 - 2×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inokülasyonda %90-%100'e kadar tohum çimlenmesinde olumlu bir etki görülmüştür. 2×10^2 - 2×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inokülasyonda yayma yöntemi ile %87-90, pipetleme yöntemi ile %73-87 çimlenme oranı kaydedilmiştir. 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inoküle edilen tohumlarda her üç yöntemde de %70-80 çimlenme oranı görüldü. Sonuçlar değerlendirildiğinde *P. putida*'nın *A. thaliana* tohum çimlenmesine olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1). Ayrıca tüm inokülasyon yöntemleri arasında özellikle yayma ve daldırma yöntemlerinde artan bakteri konsantrasyonuna rağmen olumlu çimlenme oranları görülmüştür.

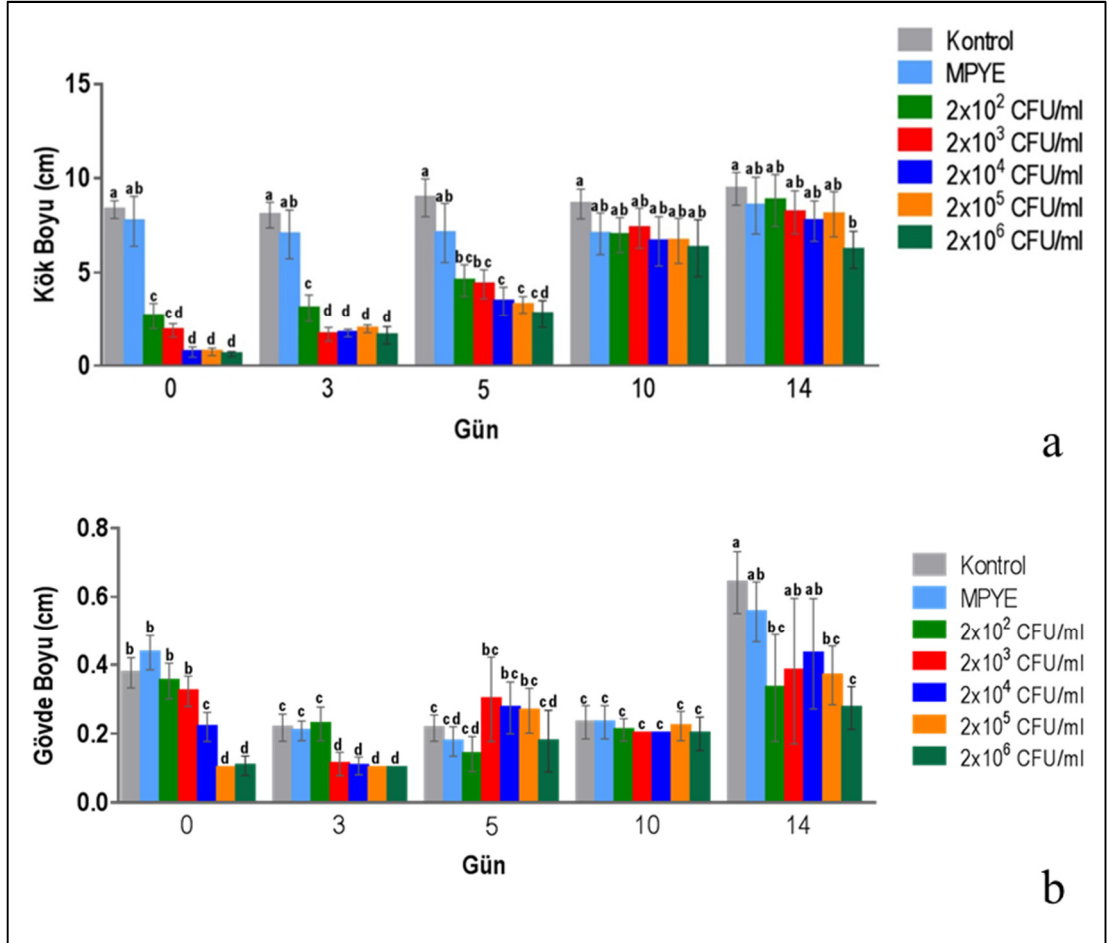


Şekil 4.1: *A. thaliana* Bitkisinde Tohum Çimlenme Yüzdesi.

4.1.2. *A. thaliana* Bitki Büyümesi Üzerine *P. putida* KT2440'ın Etkisi

4.1.2.1. Pipetleme Yöntemi

Pipetleme yöntemi aracılığıyla bakteri ile inoküle edilen *A. thaliana* tohum ve fideciklerinin gövde ve kök boyu (Şekil 4.2) istatistiksel analiz sonuçlarına göre; bitkinin gövde boylarında 0. ve 3. gününde uygulanan 2×10^3 CFU/ml ve üzeri konsantrasyonlardaki; kök boylarında ise denenen tüm konsantrasyonlardaki bakteriyel inokülasyonların kontrol grubuna kıyasla bitki üzerinde pozitif bir etki göstermediği gözlemlenmiştir.

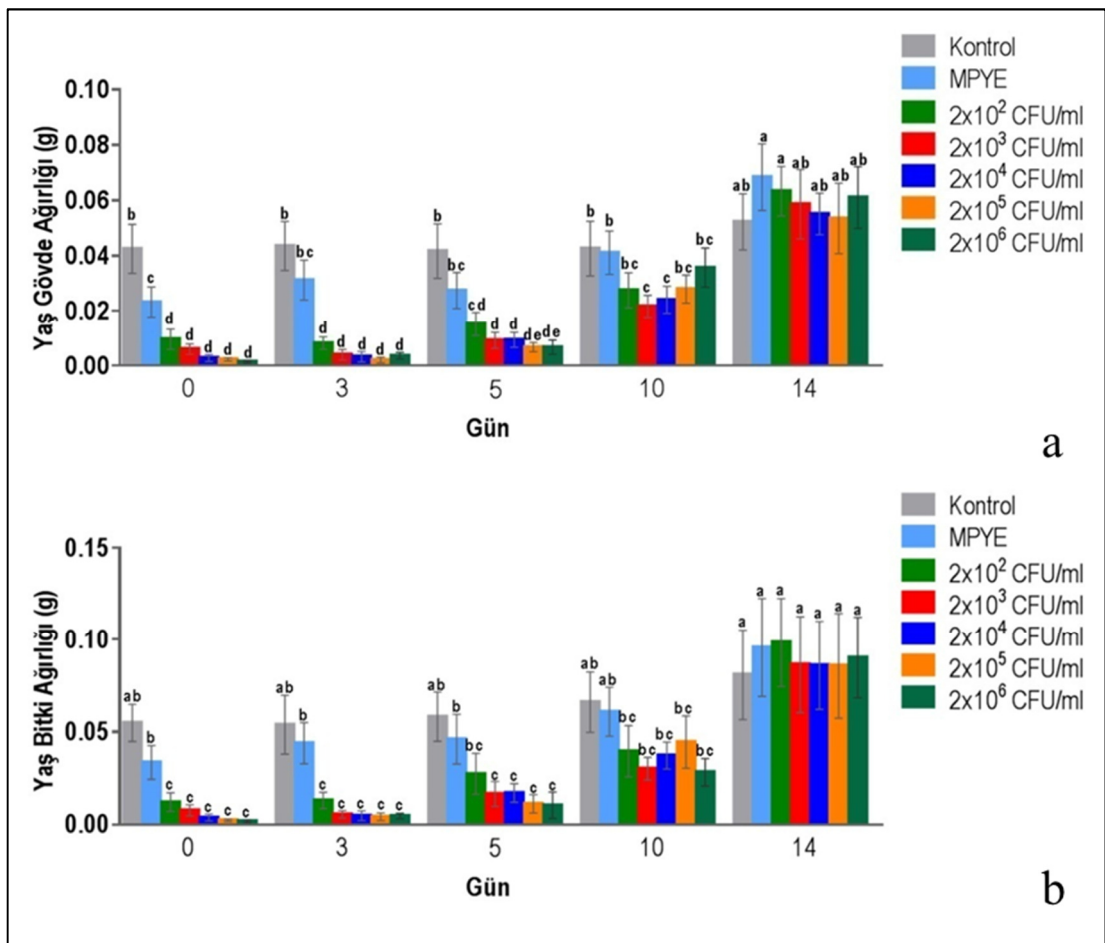


Şekil 4.2: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* kök (a) ve gövde boyuna (b) etkileri.

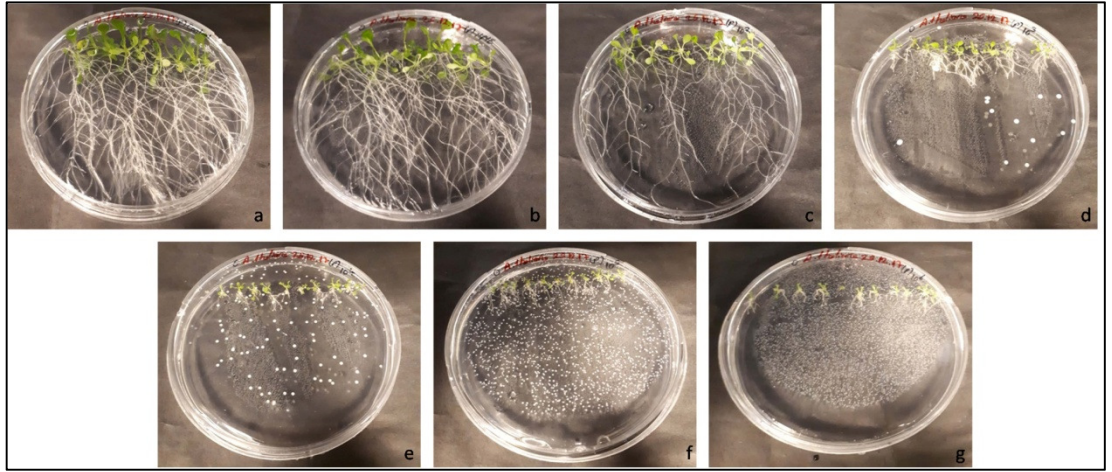
10. ve 14. günlerde uygulanan inokülasyonların ise genel olarak bitki kök boyunda kontrol grubuyla benzer bir etkiye yol açtığı; ancak denenen yüksek konsantrasyonda gövde boyunun azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca dikkat çekici bir

şekilde bu yöntemde bitkiciklerin özellikle ilerleyen dönemlerinde bakteriyle homojen bir şekilde inoküle edilemedikleri için verilere ait standart hatalarda sapmaların daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).

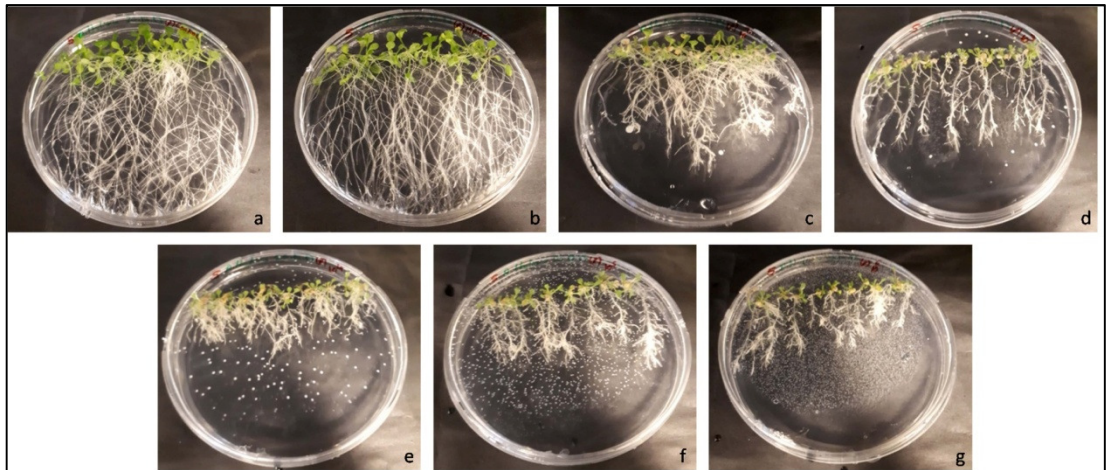
0-, 3-, 5-, 10-günlük iken bakteri ile inoküle edilen bitkiciklerde; bakteri konsantrasyonunun 2×10^2 CFU/ml ve üzerinde olduğu konsantrasyonlarda; yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bitkinin 14. gününde uygulanan bakteriyel inokülasyonlar ise bitkinin yaş gövde ağırlığı ve total yaş bitki ağırlığı üzerinde kontrol grubuyla benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.3). Söz konusu etkiler morfolojik olarak da gözlenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.2: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* yaş gövde ağırlığı (a) ve yaş bitki ağırlığına (b) etkileri.

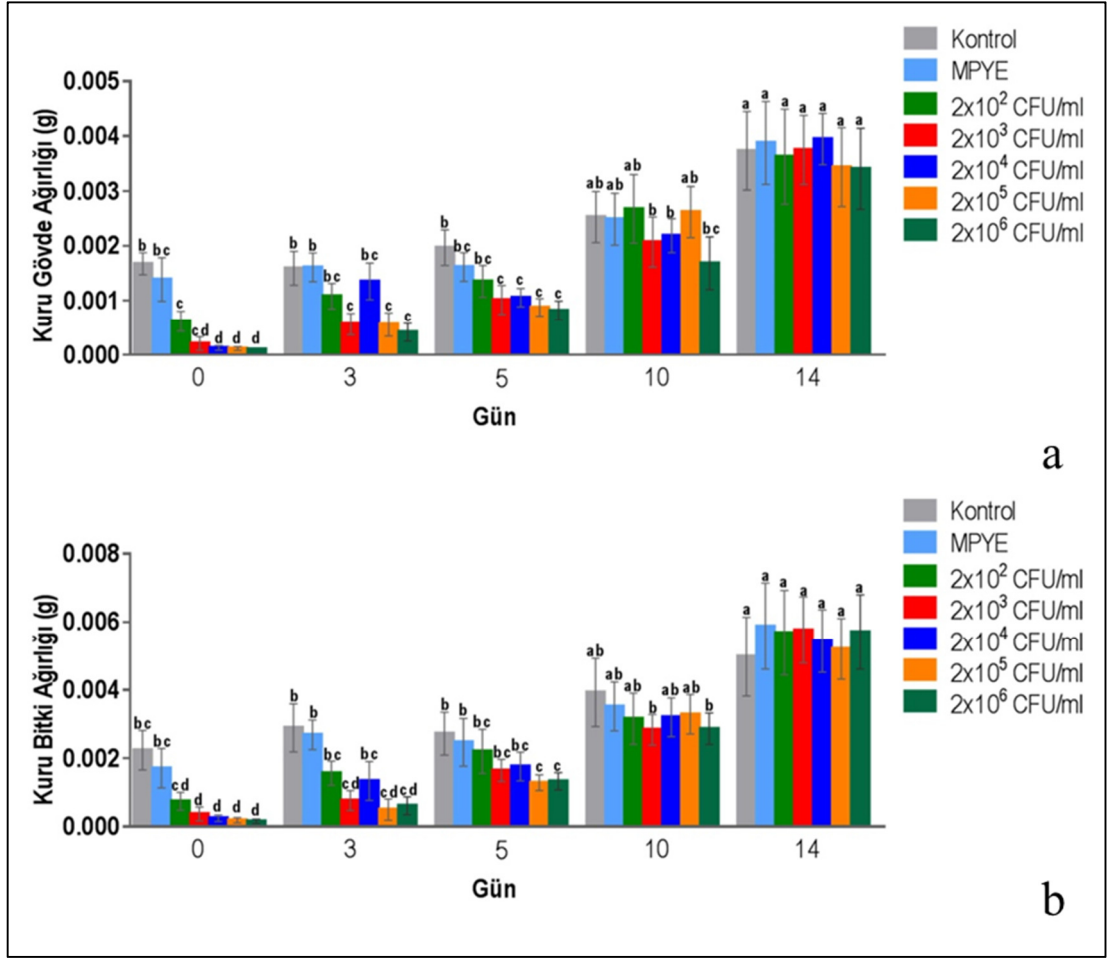


Şekil 4.3: Pipetleme yöntemi kullanılarak bakteriyle 0. gününde inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) MPYE c) 2×10^2 CFU/ml d) 2×10^3 CFU/ml e) 2×10^4 CFU/ml f) 2×10^5 CFU/ml g) 2×10^6 CFU/ml konsantrasyonlardaki bakterilerin bitki gelişimi üzerine etkileri.



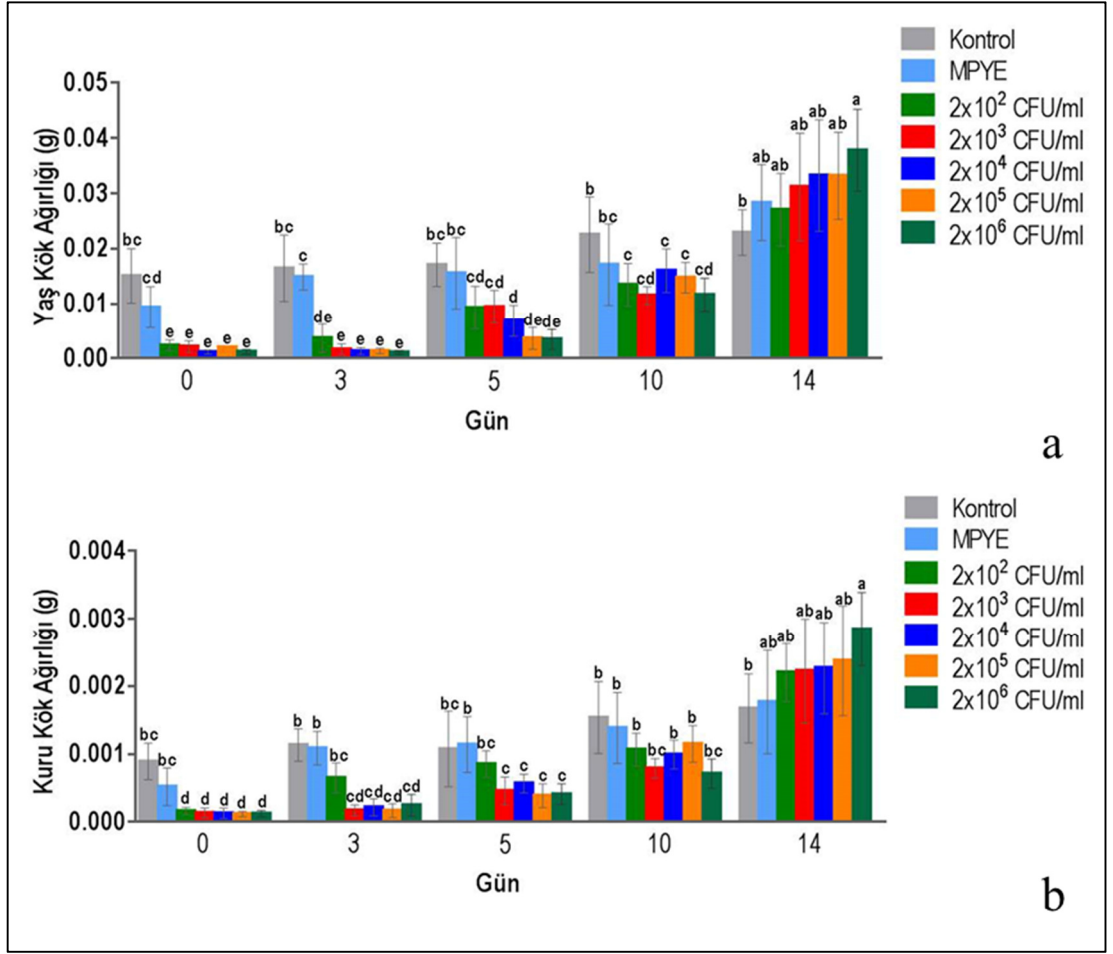
Şekil 4.4: Pipetleme yöntemi ile 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen *A. thaliana* bitkiciklerinin 14. günündeki morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) MPYE c) 2×10^2 CFU/ml d) 2×10^3 CFU/ml e) 2×10^4 CFU/ml f) 2×10^5 CFU/ml g) 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonlarının bitkiciklerin morfolojisi üzerine etkisi.

Bitkinin 0-, 3- ve 5- günlerinde 2×10^2 CFU/ml ve üzerindeki bakteriyel konsantrasyonlarla inokülasyonu; kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığı üzerinde azalmaya neden olsa da; ilerleyen günlerde (10. ve 14. gün) bitkinin bakteriyle inokülasyon stresinden kurtulduğu ve yüksek bakteri konsantrasyonlarıyla inokülasyon sonucunda bile; yaş ağırlık sonuçlarına benzer şekilde kontrol grubuyla aynı oranlarda kütleli artış göstermeye devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* kuru gövde ağırlığı (a) ve kuru bitki ağırlığına (b) etkileri.

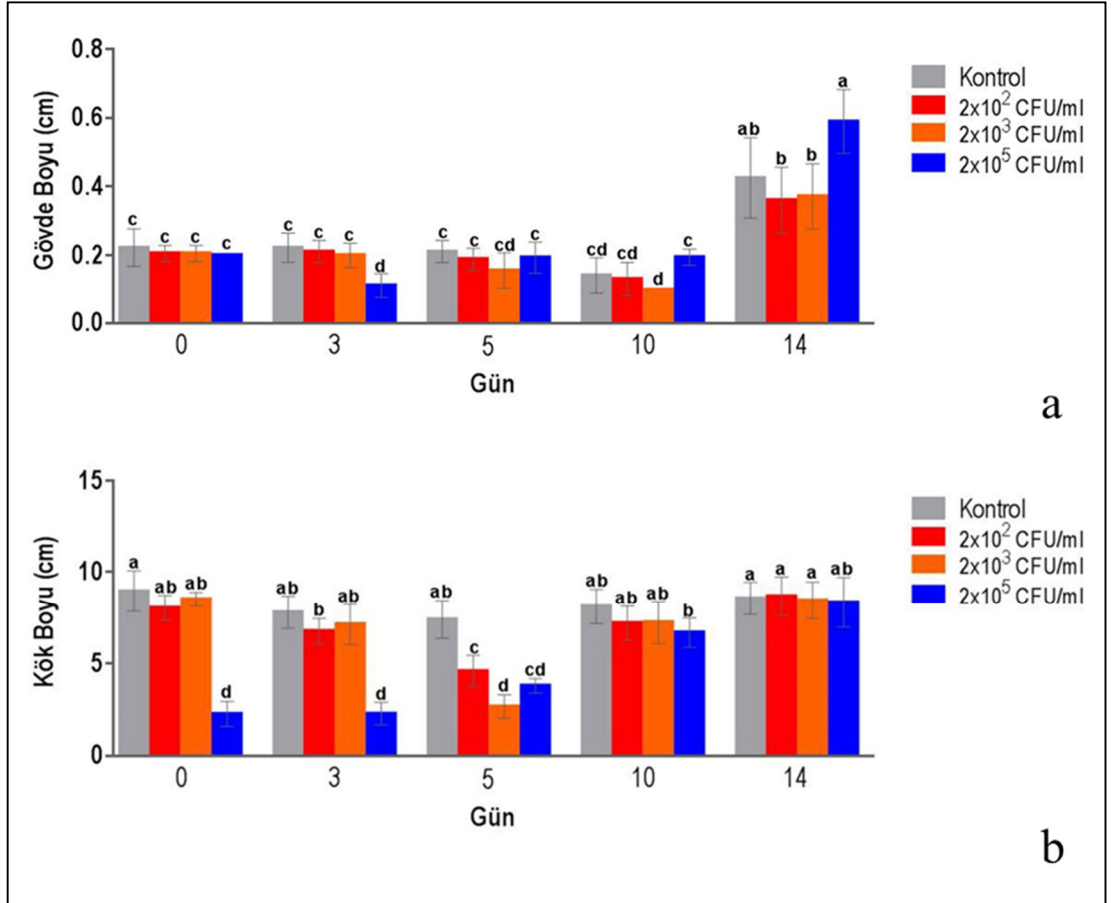
Yaş kök ağırlığı ve kuru kök ağırlığı değerlerine göre; kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Sadece 14. gününde bakterinin 2x10⁶ CFU/ml konsantrasyonuyla inoküle edilen bitkilerin yaş ve kuru kök ağırlıklarında nispeten bir artış görülse de; bitkideki lateral kök oluşumunun artması nedeniyle olması muhtemeldir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: Pipetleme yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen *A. thaliana* bitkiciklerine ait yaş (a) ve kuru (b) kök ağırlığı.

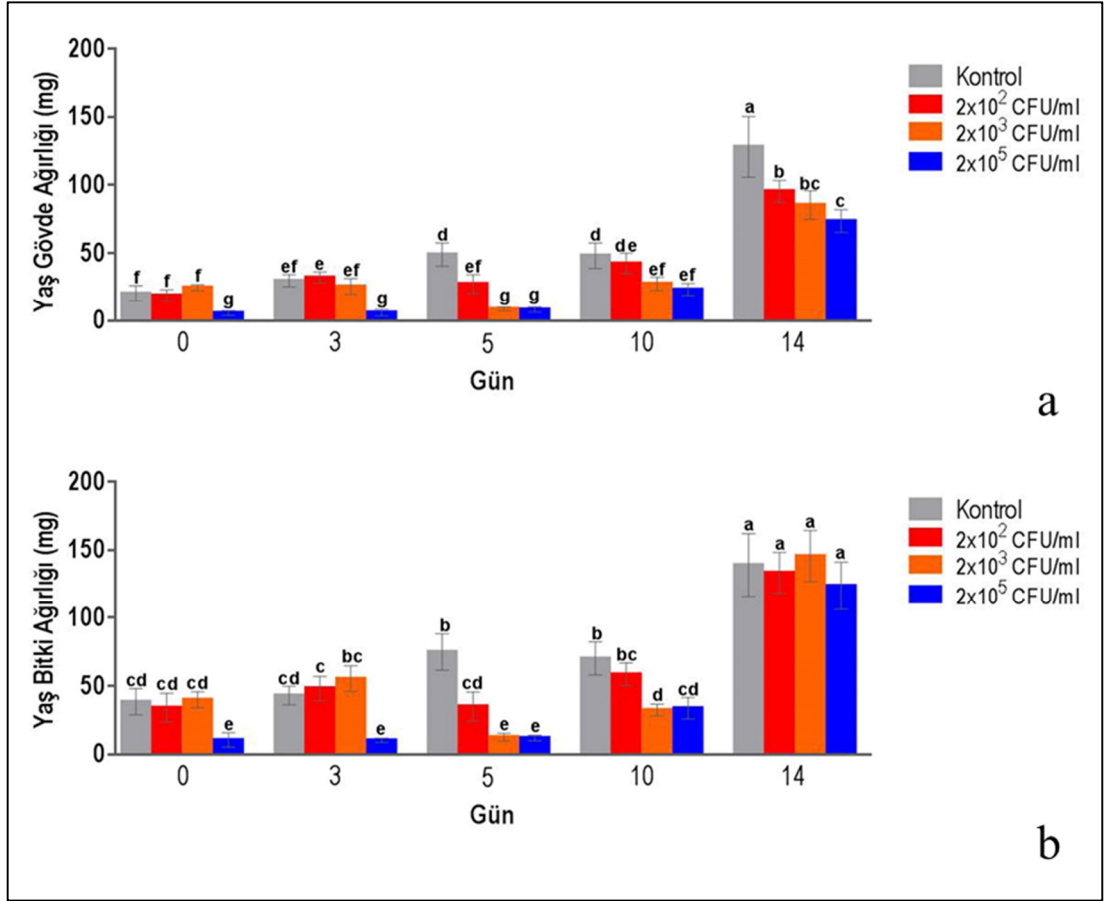
4.1.2.2. Daldırma Yöntemi

Daldırma yöntemiyle bakteri ile inoküle edilen *A. thaliana* bitkiciklerinin gövde boylarında; 2×10^2 CFU/ml, 2×10^3 CFU/ml ve 2×10^5 CFU/ml konsantrasyonlardaki bakteriyel inokülasyonların kontrol grubuna kıyasla bitki üzerinde pozitif bir etki göstermediği; kök boylarında ise 2×10^2 CFU/ml ve 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarda uygulanan inokülasyonların genellikle kontrol grubu ile benzer olduğu; 2×10^5 CFU/ml bakteri süspansiyonu ile bitkinin erken evrelerinde (0., 3. ve 5. gün) inoküle olan fidiciklerde ise bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği ancak, 10. ve 14. günlerde kontrol bitkicikleri ile benzer kök boyu gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8).

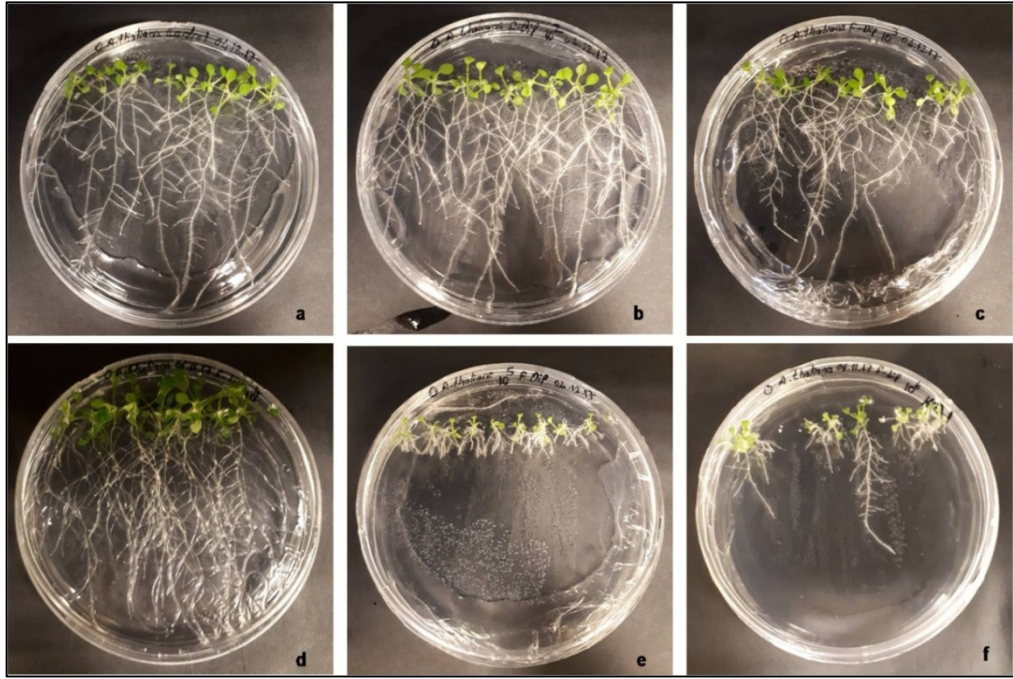


Şekil 4.7: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* kök (a) ve gövde (b) boyuna etkileri.

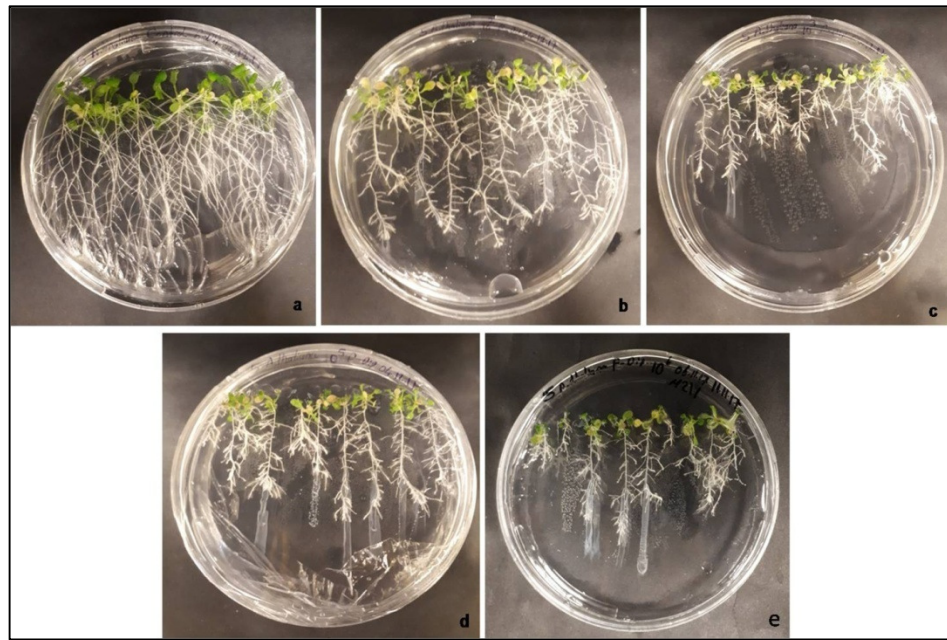
Yaş gövde ve yaş bitki ağırlık sonuçları değerlendirildiğinde; bakteriyel inokülasyon bitkinin erken evrelerinde gerçekleştirildiğinde (0. ve 3. gün) 2×10^2 CFU/ml ve 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarda kontrol grubu ile benzer ağırlıkların ölçüldüğü ancak, 2×10^5 CFU/ml konsantrasyonunun bitkinin yaş gövde ağırlığı ve toplam yaş ağırlığında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu etki morfolojik olarak da gözlenmektedir (Şekil 4.10 ve 3.11). 10. günden itibaren uygulanan bakteriyel inokülasyonlarda artan bakteri konsantrasyonu bitkinin yaş gövde ağırlığında azalmaya yol açarken, total yaş bitki ağırlığının kontrol grubu ile benzer olduğu ölçülmüştür.



Şekil 4.8: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* yaş gövde ve yaş bitki ağırlığına etkileri.



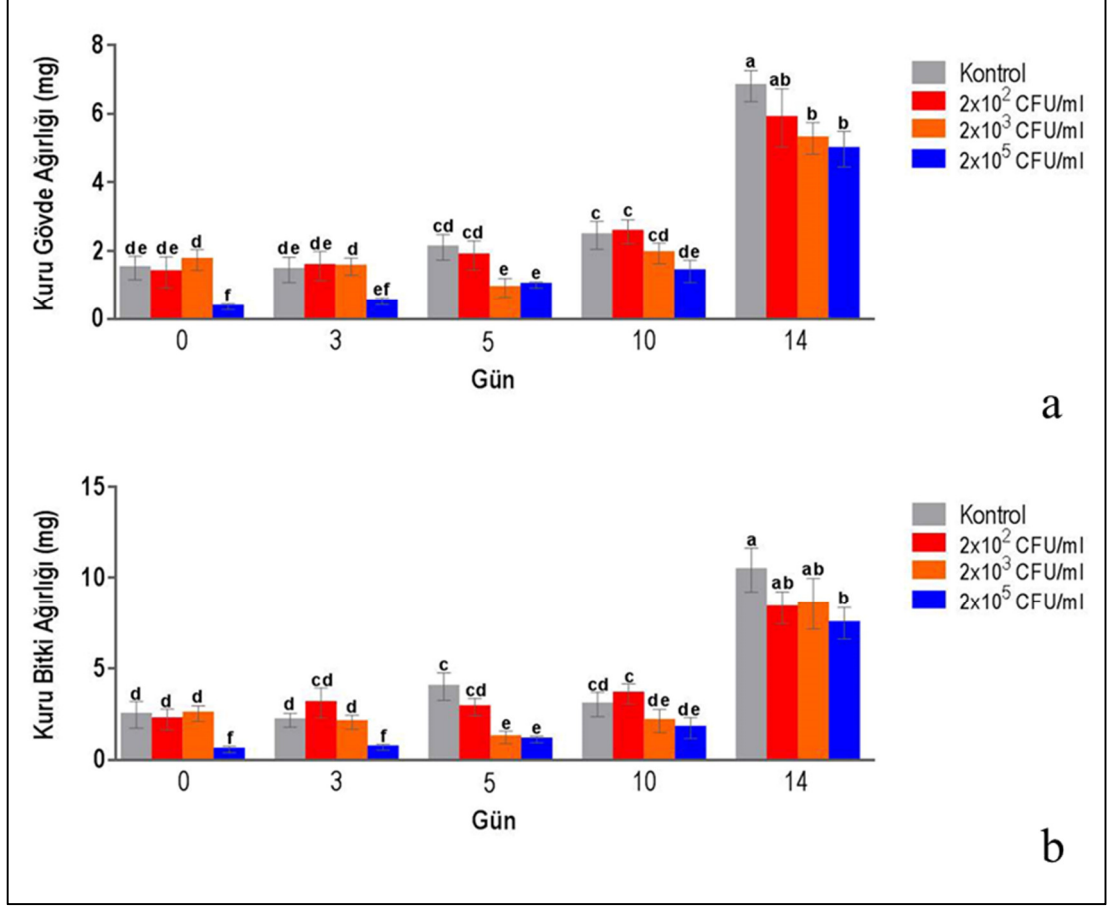
Şekil 4.9: Daldırma yöntemi ile 0. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) 2×10^2 CFU/ml c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^4 CFU/ml e) 2×10^5 CFU/ml f) 2×10^6 CFU/ml.



Şekil 4.10: Daldırma yöntemi ile 5. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) 2×10^2 CFU/ml c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^5 CFU/ml e) 2×10^6 CFU/ml.

2×10^2 CFU/ml ve 2×10^3 CFU/ml bakteriyel konsantrasyonlarda uygulanan inokülasyonlarda; bitkinin kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığında genellikle

kontrol grubu ile benzer ağırlık ölçülürken; 2×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonuyla inoküle edilen bitkilerin kuru gövde ve kuru bitki ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

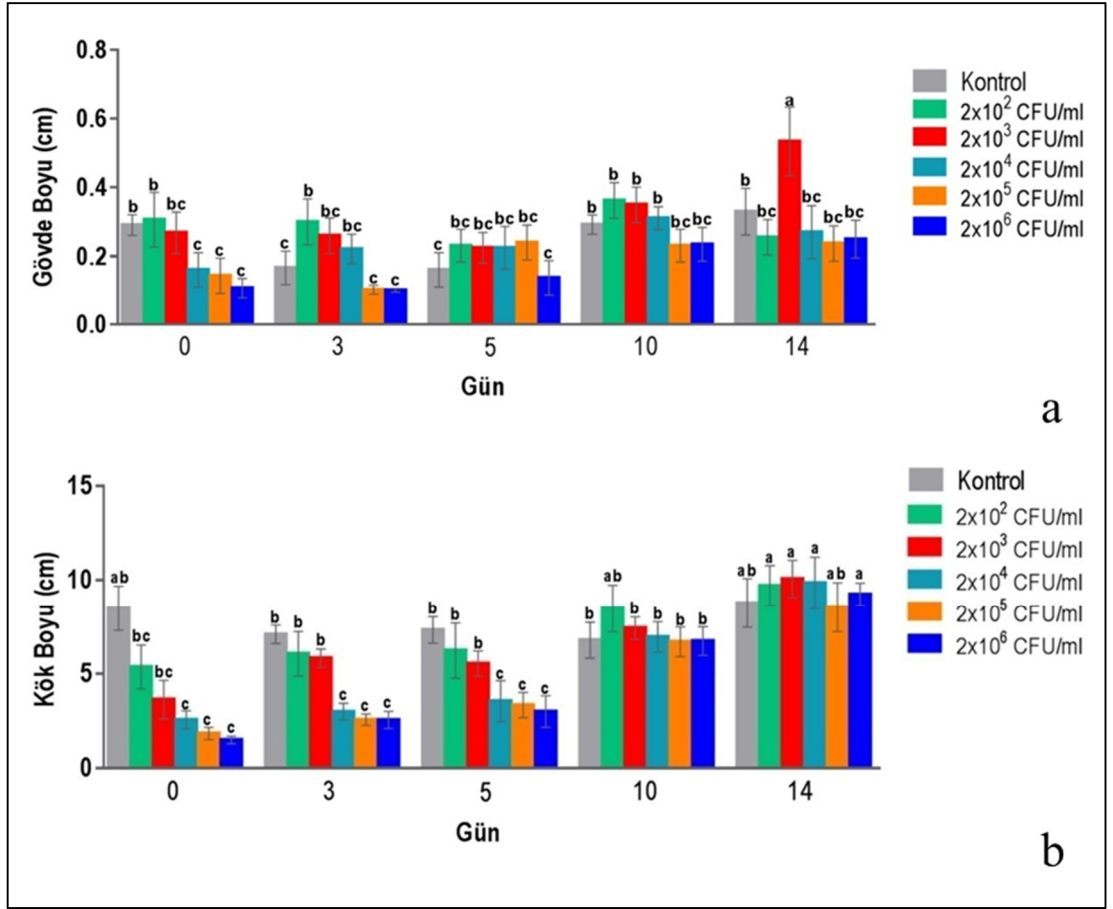


Şekil 4.11: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin kuru gövde ağırlığı (a) ve kuru bitki ağırlığına (b) etkileri.

4.1.2.3. Yayma Yöntemi

Yayma yöntemi kullanılarak *P. putida* bakterisiyle inoküle edilen *A. thaliana* tohum ve fideciklerinin gövde boyu istatistiksel analiz sonuçlarına göre; 0. günde uygulanan bakteri inokülasyonlarında 2×10^2 ve 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarında kontrol grubu ile benzer sonuçlar gözlenmektedir (Şekil 4.13). Bakteri süspansiyonlarının daha yüksek konsantrasyonları olumsuz etki göstermekle birlikte; bitki gelişiminin ilerleyen dönemlerinde bu olumsuz etkinin ortadan kalktığı; 3, 5 ve 10. günlerde 2×10^2 - 2×10^4 CFU/ml konsantrasyonlarında uygulanan bakteri inokülasyonunun gövde boylarında olumlu veya kontrol ile benzer etkiler gösterdiği

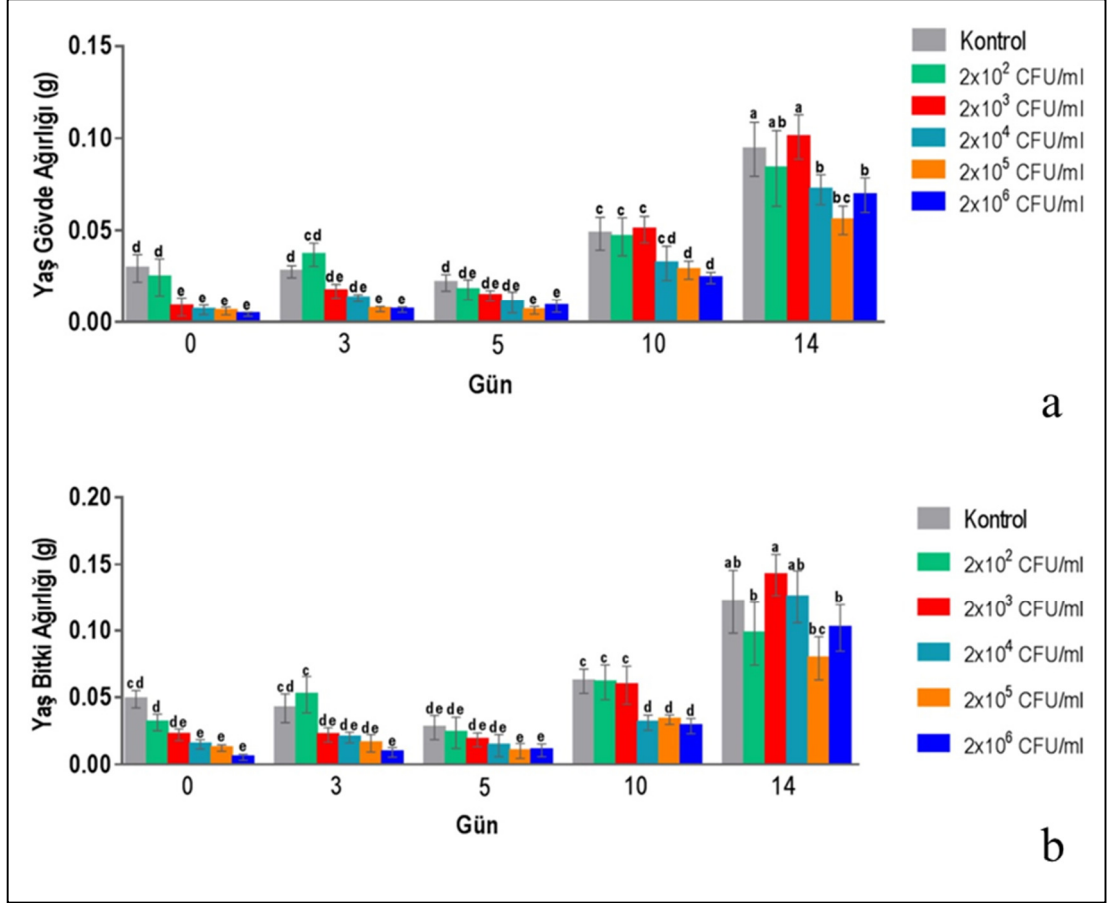
tespit edilmiştir (Şekil 4.13). 14. günde ise özellikle 2×10^3 CFU/ml bakteri süspansiyonu ile inoküle olan fideciklerin gövde boylarında artış gözlenmekle birlikte istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. Kök boylarında ise yine, bitkinin erken evrelerinde (0, 3, ve 5. gün) bakteriyle inokülasyonun bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği ancak, bitki büyümesinin ilerleyen dönemlerinde (10. ve 14. gün) bu olumsuz etkinin ortadan kalkarak, bakteriyle inoküle edilen bitkiciklerin bakterinin yüksek konsantrasyonlarında dahi; en az kontrol bitkicikleri kadar kök boyu gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13).



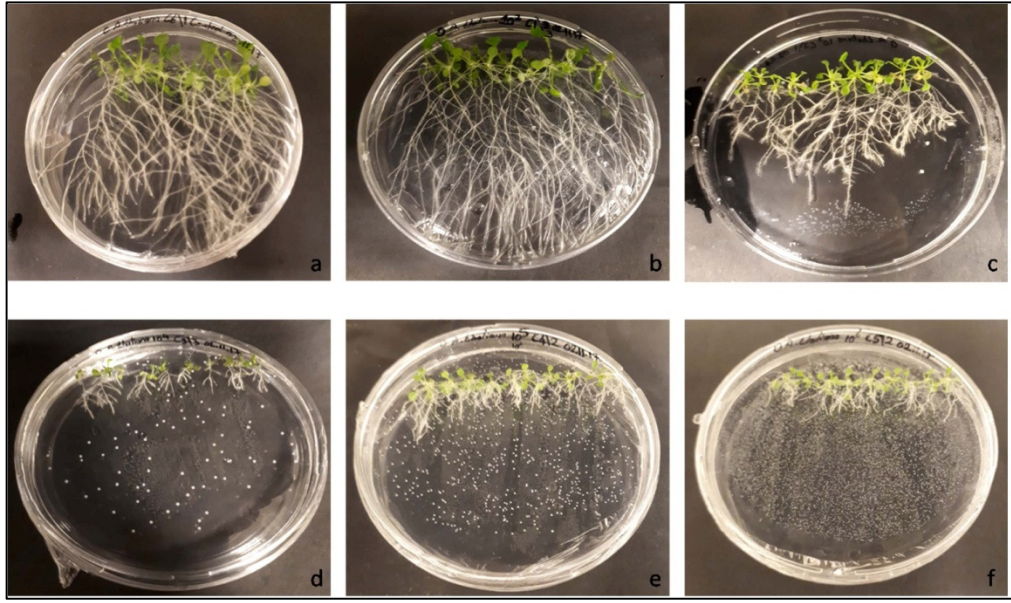
Şekil 4.12: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin gövde (a) ve kök boyu (b) gelişimine etkisi.

Yaş bitki ve yaş gövde ağırlık sonuçlarına göre; yine bakteriyel inokülasyon bitkinin erken evrelerinde gerçekleştirildiğinde (0., 3. ve 5. gün) özellikle 2×10^3 CFU/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda bitkinin yaş gövde ağırlığı ve toplam yaş ağırlığında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 4.14). Bu etki morfolojik olarak da gözlenmektedir (Şekil 4.15 ve 4.16). Bununla birlikte, 10. günden itibaren 2×10^2 -

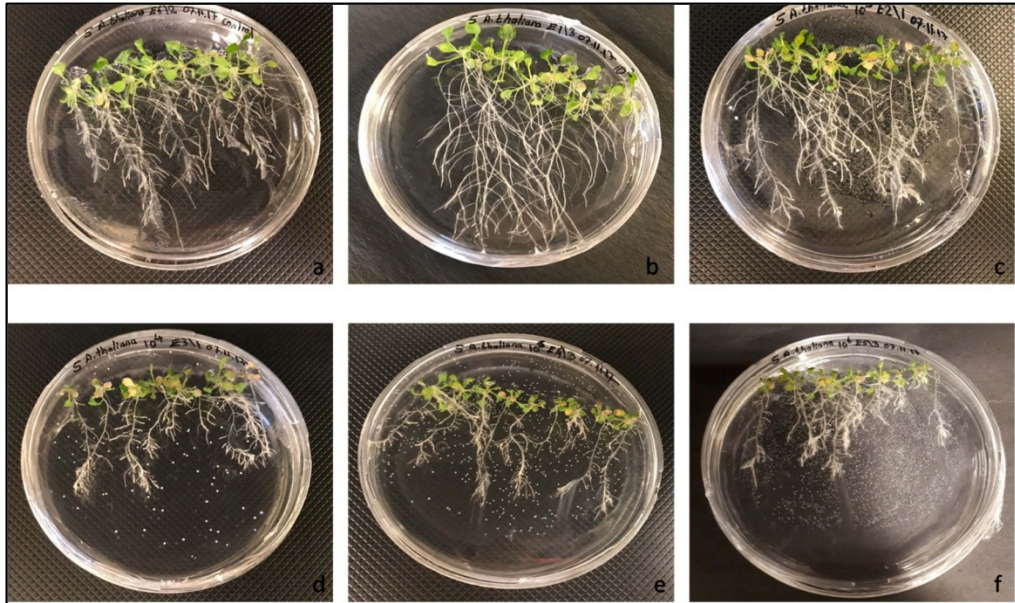
2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlardaki bakteriyel inokülasyonların bitkinin yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığı üzerine olumsuz etkisinin ortadan kalktığı, söz konusu örneklerde kontrol grubuyla benzer ağırlıkların ölçülmesi aracılığıyla tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* yaş gövde ağırlığı (a) ve yaş bitki ağırlığına (b) etkileri.



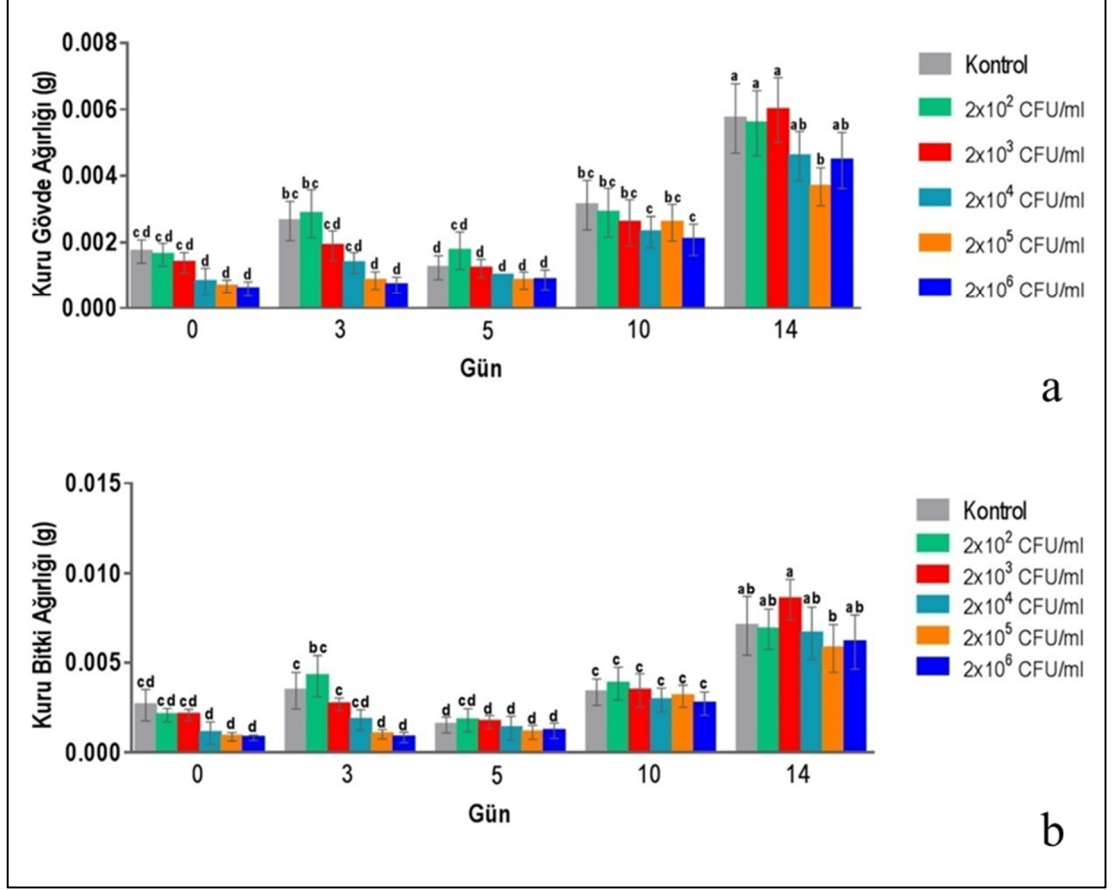
Şekil 4.14: Yayma yöntemi ile 0. günde bakteriyle inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) 2×10^2 CFU/ml c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^4 CFU/ml e) 2×10^5 CFU/ml f) 2×10^6 CFU/ml bakterileri konsantrasyonlarında bakteriyle inokülasyon sonrası.



Şekil 4.15: Yayma yöntemi kullanılarak 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin morfolojik görünüşleri a) Kontrol b) 2×10^2 CFU/ml c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^4 CFU/ml e) 2×10^5 CFU/ml f) 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerine etkisi.

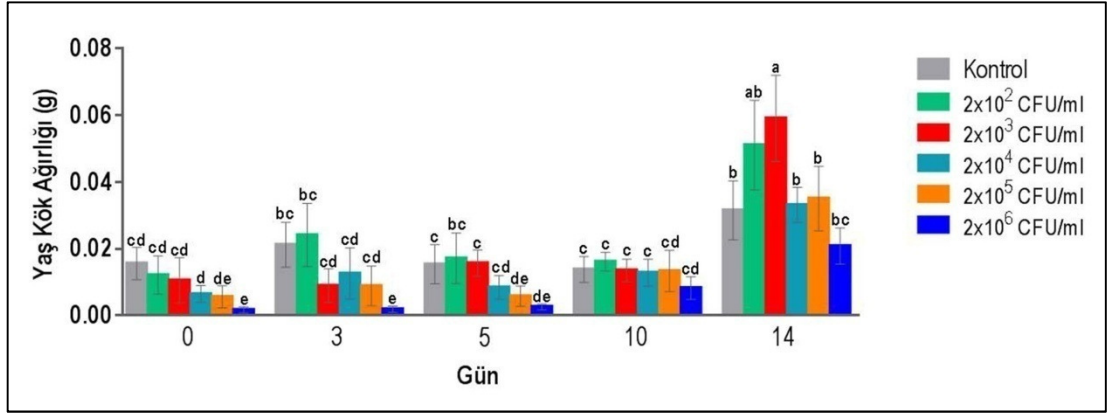
Bakteriyel inokülasyonun 10. ve 14. günlerde uygulandığı *A. thaliana* bitkiciklerinde; 10. günde uygulanan bütün bakteriyel konsantrasyonlar için kuru gövde ağırlığı ve kuru bitki ağırlığında kontrol grubuyla aynı oranda artış

kaydedilirken; 14. gün uygulanan inokülasyonlarda ise; özellikle 2×10^3 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inoküle edilen bitkiciklerin kuru ağırlıklarında bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.17).

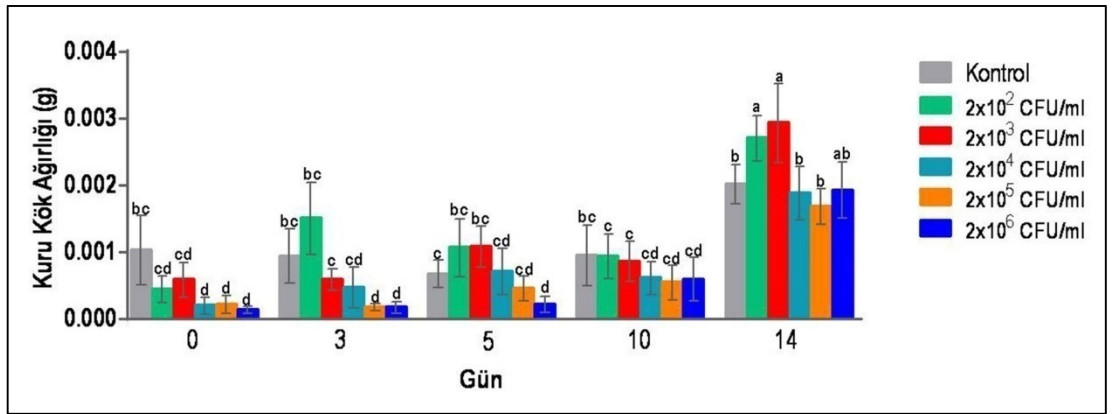


Şekil 4.16: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin kuru gövde ağırlığı (a) ve kuru bitki ağırlığına (b) etkileri.

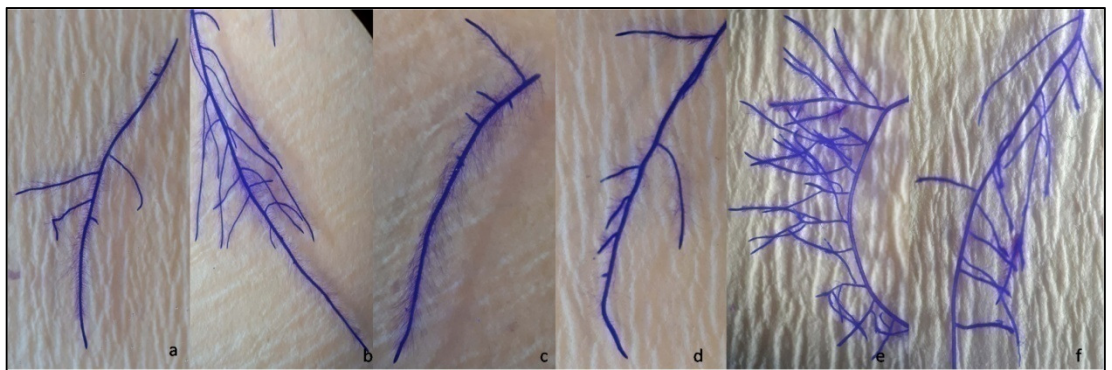
Yaş kök ve kuru kök ölçüm sonuçlarına göre (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19), 2×10^2 CFU/ml ve 2×10^3 CFU/ml bakteri konsantrasyonlarıyla bitkinin inoküle edilmesi sonucunda kök ağırlığında artış meydana gelmiştir. Bu durumun Şekil 4.20'de görüldüğü üzere, bitkideki lateral köklerin ve kök tüylerinin artması nedeni ile olması muhtemeldir.



Şekil 4.17: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin yaş kök ağırlığına etkileri.



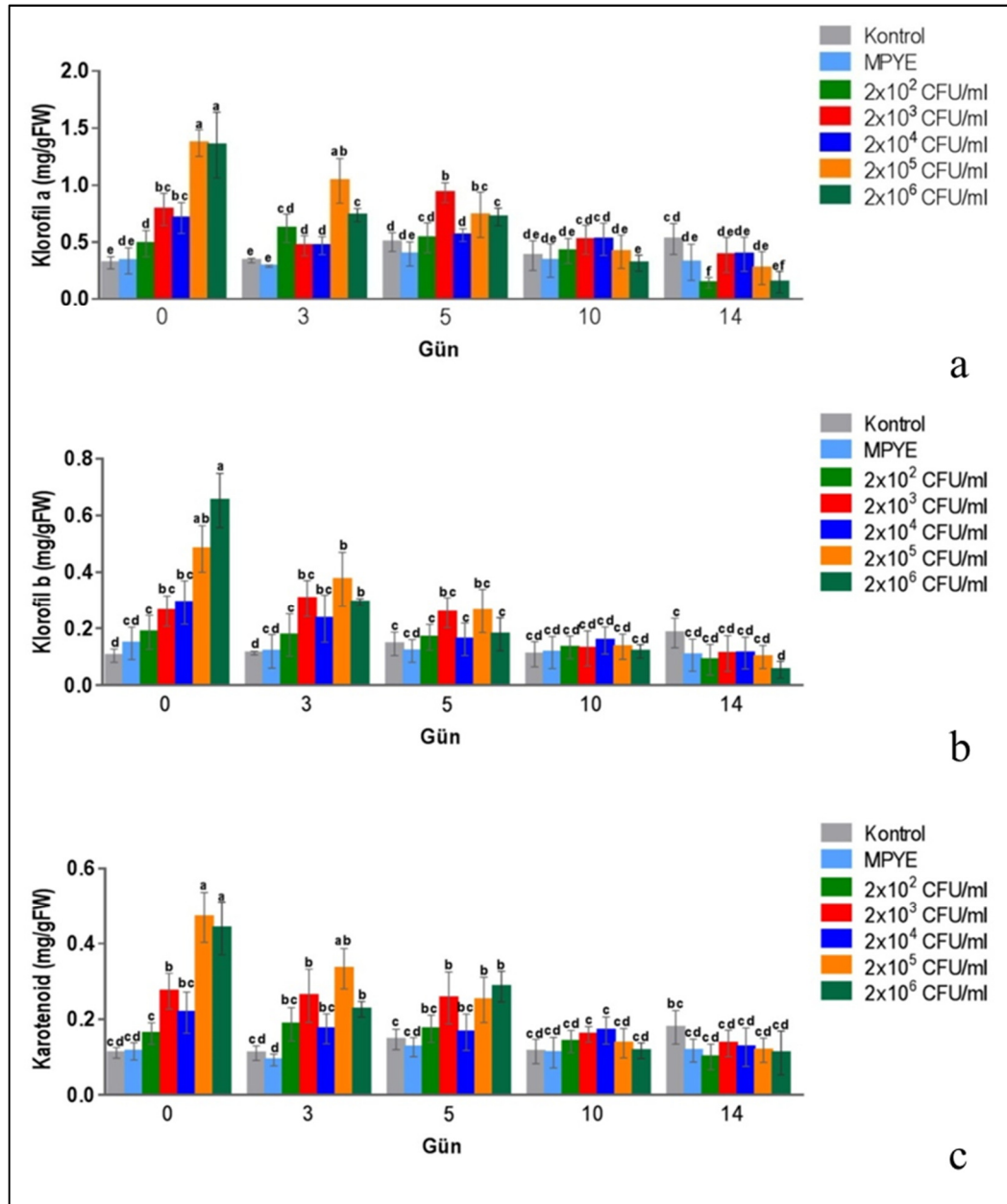
Şekil 4.18: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin kuru kök ağırlığına etkileri.



Şekil 4.19: Yayma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkiciklerinin kristal viyole ile boyama sonrası kök fotoğrafları. a) Kontrol b) 2x10² CFU/ml c) 2x10³ CFU/ml d) 2x10⁴ CFU/ml e) 2x10⁵ CFU/ml f) 2x10⁶ CFU/ml konsantrasyonlarında bakteriyle inokülasyonu sonrası.

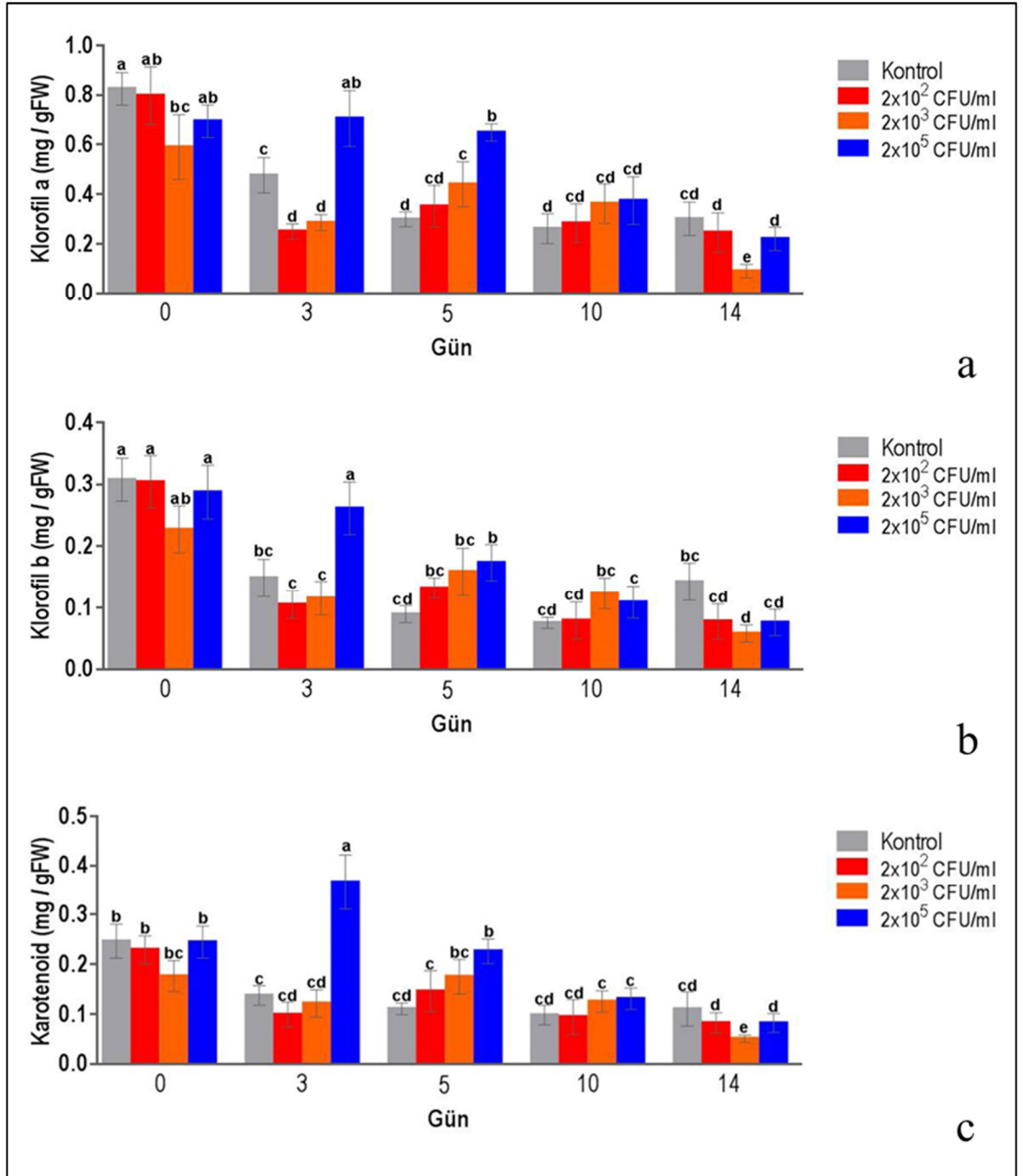
4.1.3. *A. thaliana* Bitkisinin Fotosentetik Pigmentleri Üzerine *P. putida* KT2440'ın Etkisi

Pipetleme yöntemi ile 0., 3. ve 5. günlerde uygulanan inokülasyonlarda 2×10^3 CFU/ml, 2×10^5 CFU/ml ve 2×10^6 CFU/ml bakteriyel konsantrasyonlarda klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarında artış görülmektedir. 10. ve 14. gün uygulanan inokülasyonlarda artan bakteri konsantrasyonuna rağmen her üç fotosentetik pigment de kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.21).



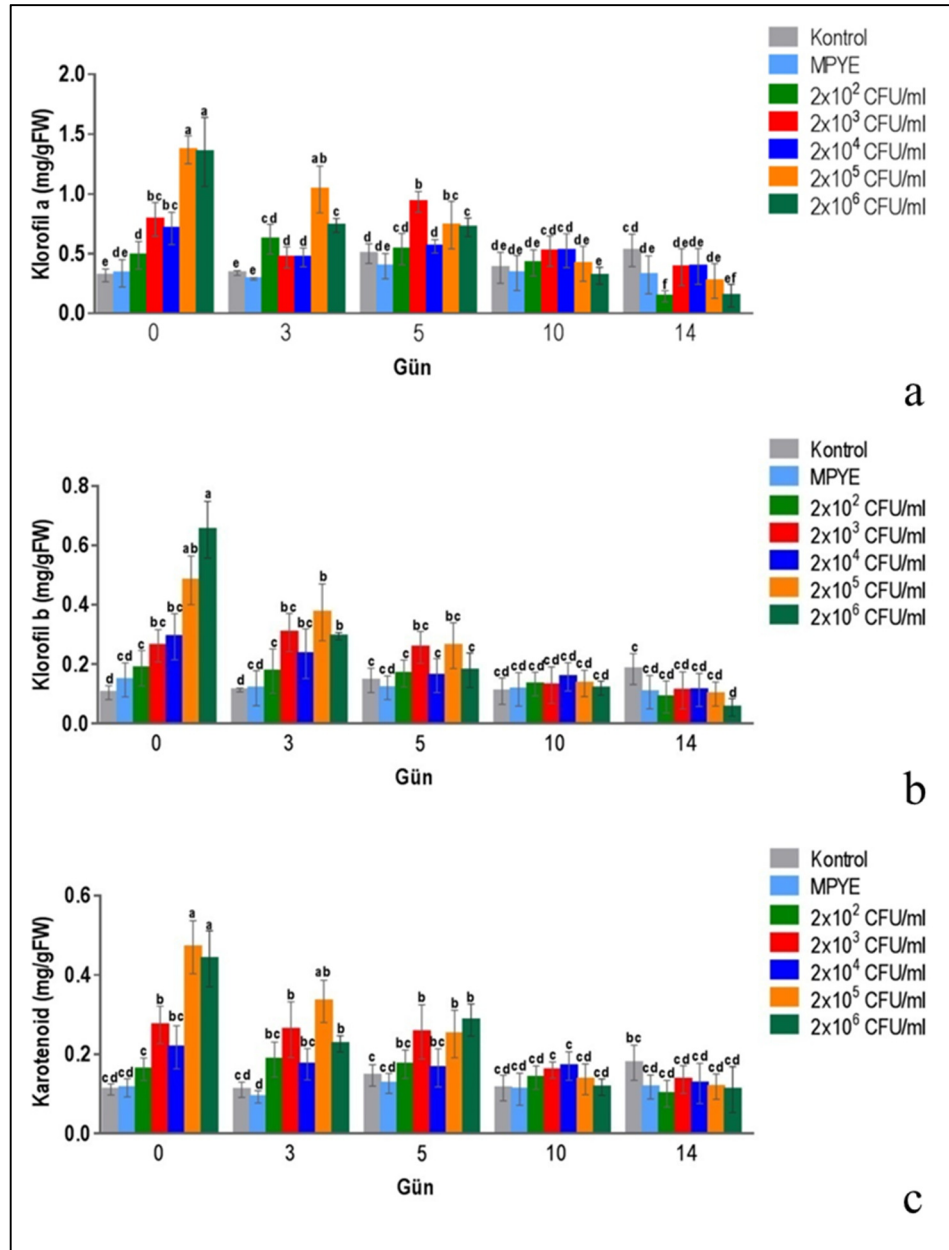
Şekil 4.20: Pipetleme yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin klorofil a (a), klorofil b (b) ve karotenoid (c) miktarı üzerine etkileri.

Daldırma yöntemi ile 3. ve 5. günlerde uygulanan inokülasyonlarda 2×10^5 CFU/ml ve bakteriyel konsantrasyonlarda klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarında artış görülmektedir. 0., 10. ve 14. gün uygulanan inokülasyonlarda artan bakteri konsantrasyonuna rağmen her üç fotosentetik pigment de kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.22).



Şekil 4.21: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.

Farklı günlerde ve artan bakteri konsantrasyonlarıyla yayma yöntemi kullanılarak uygulanan bakteriyel inokülasyonun bitkinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarları üzerine genel olarak olumsuz bir etkisi yoktur. Sonuçlar incelendiğinde 0. gün uygulanan inokülasyonda 2×10^3 CFU/ml ve üzeri konsantrasyonlarda her üç fotosentetik pigmentte kontrol grubu ile benzerlik veya artış görülmektedir. 10. ve 14. gün uygulanan inokülasyonda artan bakteri konsantrasyonuna rağmen her üç fotosentetik pigment de kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.23).



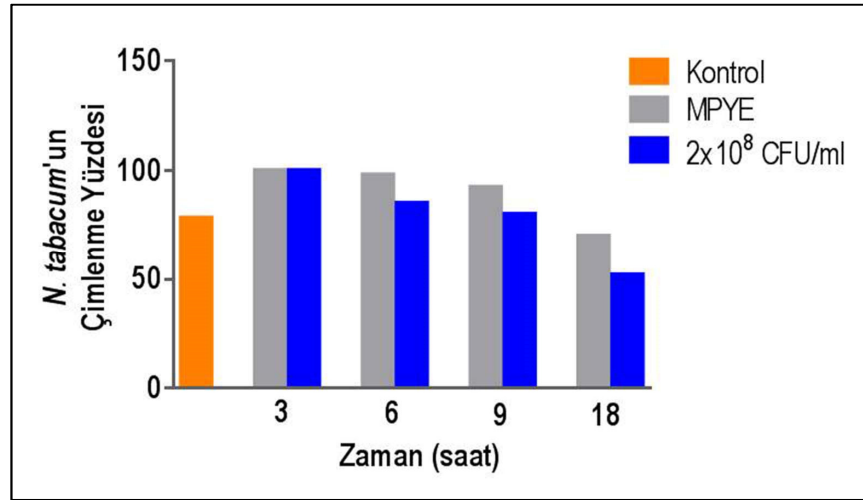
Şekil 4.22: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinin klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkileri.

4.2. *N. tabacum* Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine *P. putida* KT2440'ın Etkisinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Daldırma Yöntemi ile İnoküle Edilen *P. putida* KT2440'ın *N. tabacum* Tohum Çimlenmesi ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

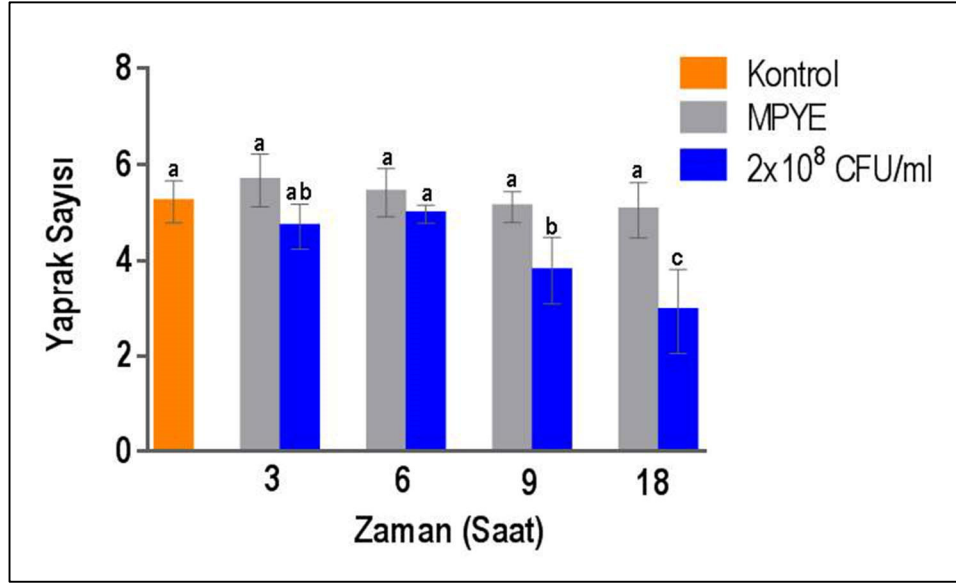
Daldırma yöntemi kullanılarak 2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki bakteriyel süspansiyon ile 3, 6, 9 ve 18 saat inoküle edilen *N. tabacum* tohumlarının çimlenme kapasitesi çimlenme testi uygulanarak belirlenmiştir. Tohumların çimlenmeleri ve bitkiciklerin büyüme özellikleri 21 gün boyunca izlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, daldırma yöntemi ile 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonundaki bakteri süspansiyonu inokülasyonda; *N. tabacum* tohum çimlenmesinde 3 ve 6 saat inokülasyon sonrası kontrol grubuna benzer bir etki, 9 ve 18 saat uygulanan inokülasyonlarda ise olumlu bir etki görülmemiştir (Şekil 4.24).



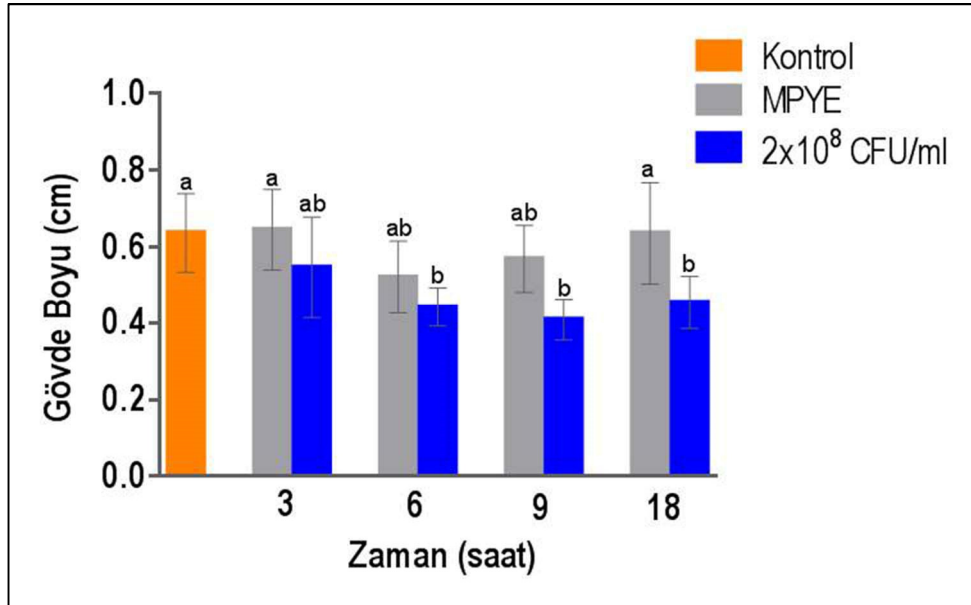
Şekil 4.23: *N. tabacum* Çimlenme Yüzdesi.

2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki bakteriyel süspansiyon ile daldırma yöntemi kullanılarak 3, 6, 9 ve 18 saat inoküle edilen *N. tabacum* bitkisinin 21 gün sonundaki ölçüm sonuçlarında; 3 ve 6 saatte kontrol grubu ile aynı yaprak sayısına sahip iken, 9 ve 18 saatte yaprak sayısında azalma görülmüştür (Şekil 4.25).

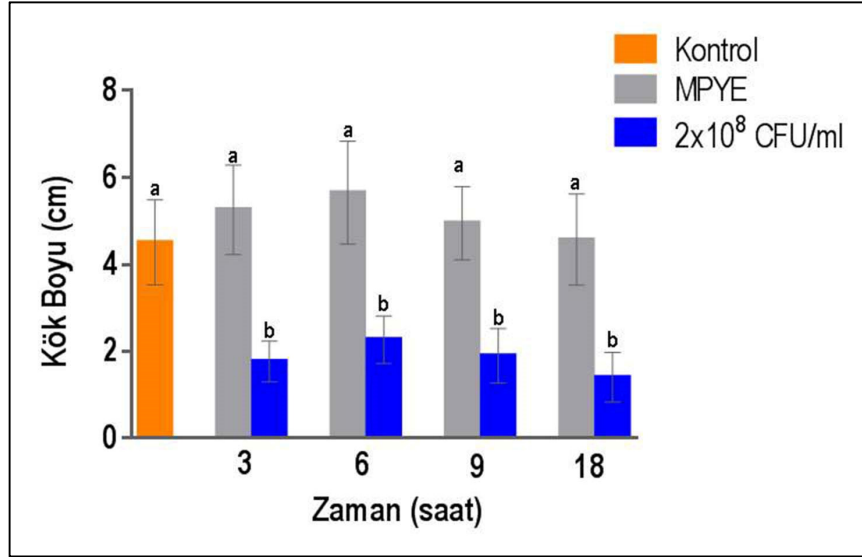


Şekil 4.24: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin yaprak sayısına etkisi.

N. tabacum bitkiciklerinin gövde boyu ve kök boyu analiz sonuçlarına göre; 3 saat uygulanan bakteri inokülasyonu kontrol ile benzer sonuç göstermekle birlikte; artan inokülasyon süresi ile birlikte (6, 9 ve 18 saat) gövde boyunda azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).

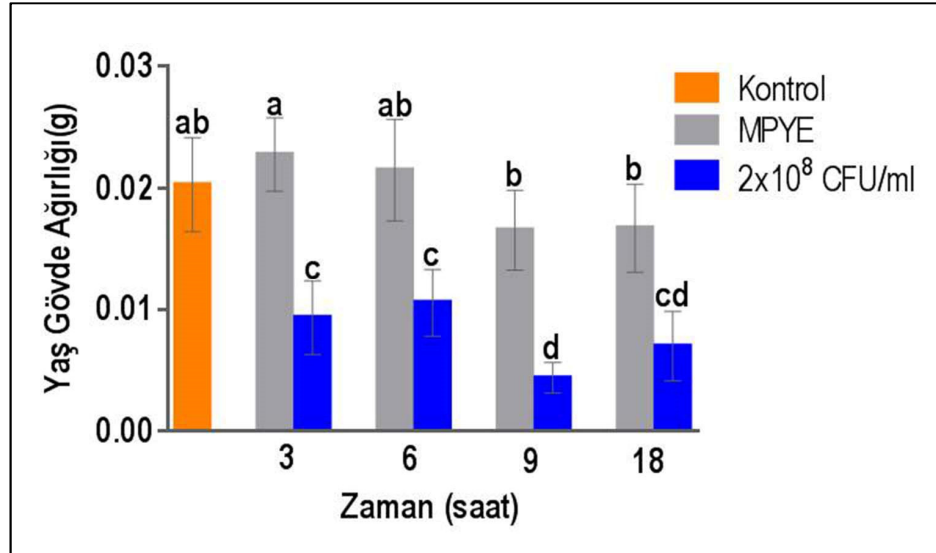


Şekil 4.25: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin gövde boyu gelişimine etkisi.

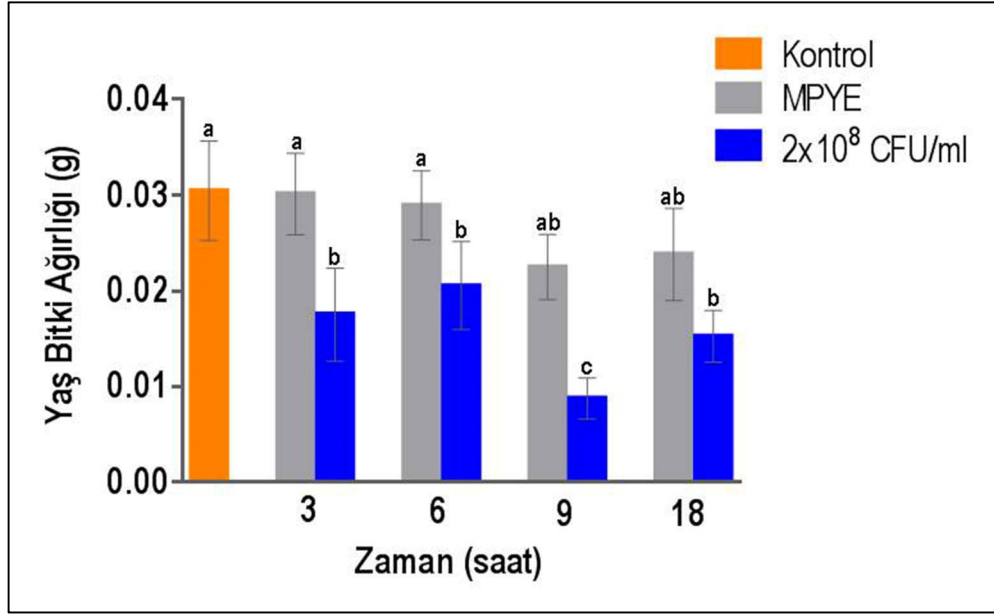


Şekil 4.26: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin kök boyu gelişimine etkisi.

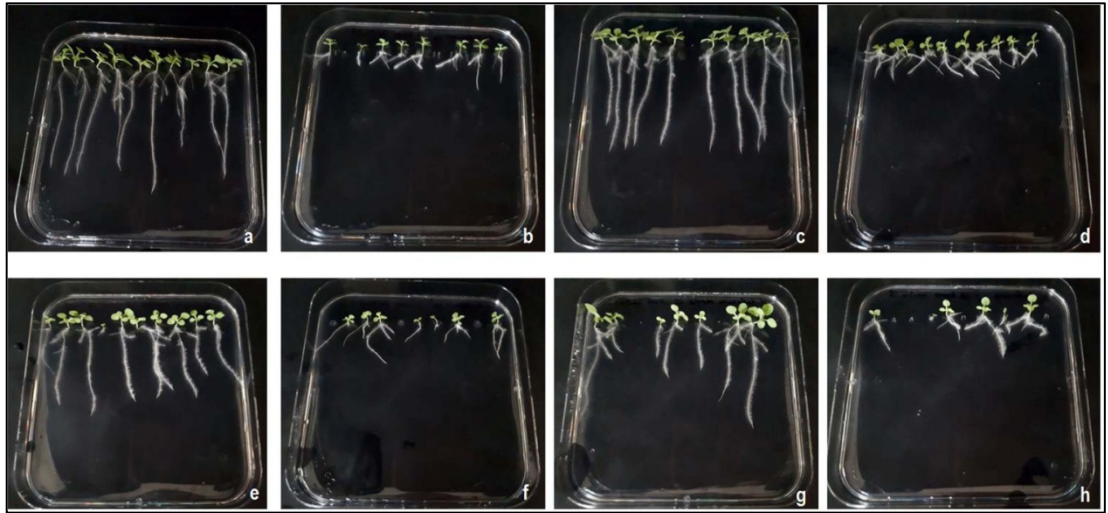
Yaş bitki ağırlığı ve yaş gövde ağırlığı sonuçlarına göre; 2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki bakteri süspansiyonunun 3, 6, 9 ve 18 saat süreyle inokülasyonunun bitkinin yaş gövde ağırlığı ve total yaş ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29). Bu etki morfolojik olarak da gözlenmektedir (Şekil 4.30).



Şekil 4.27: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* yaş gövde ağırlığına etkisi.

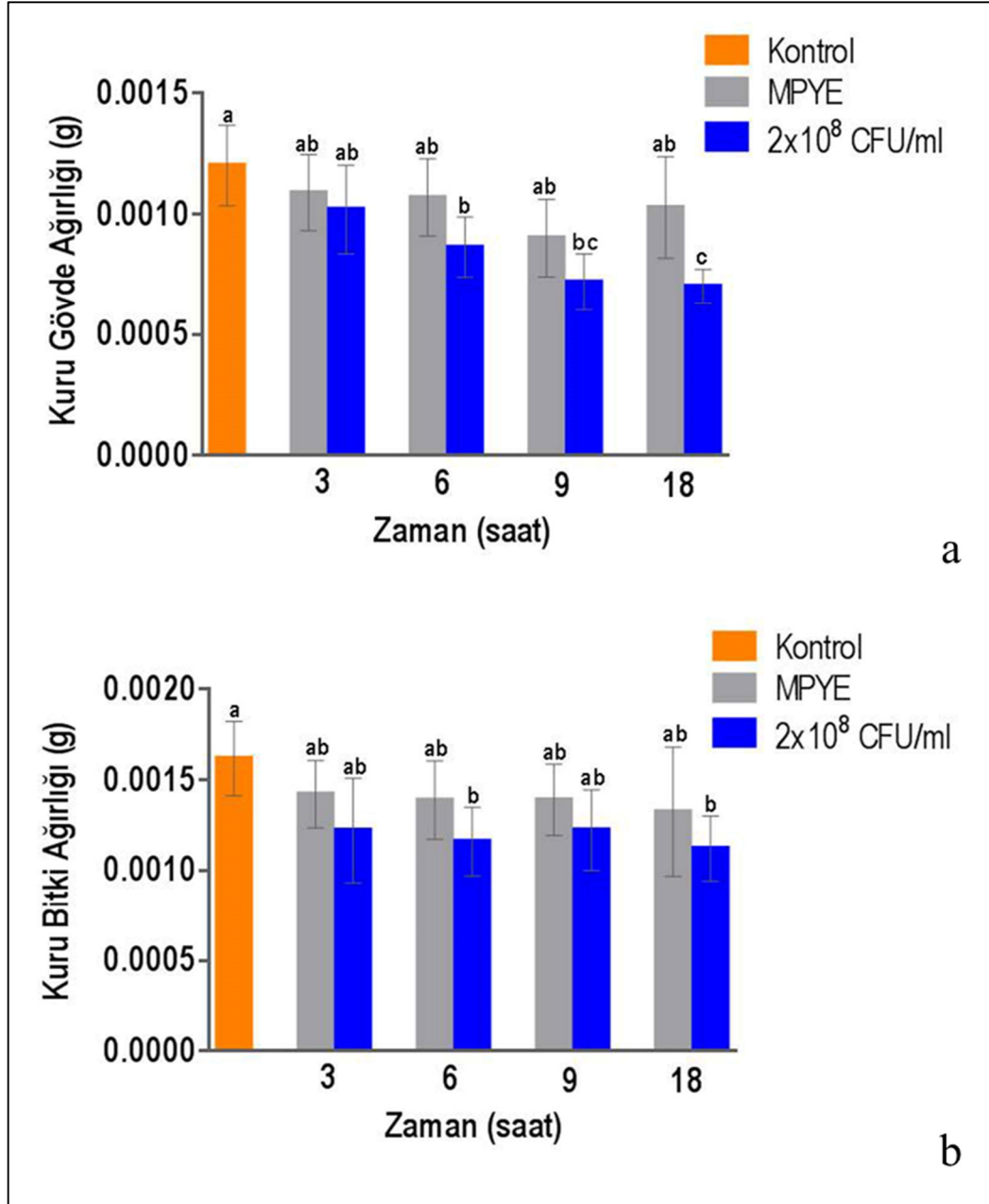


Şekil 4.28: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* yaş bitki ağırlığına etkisi.



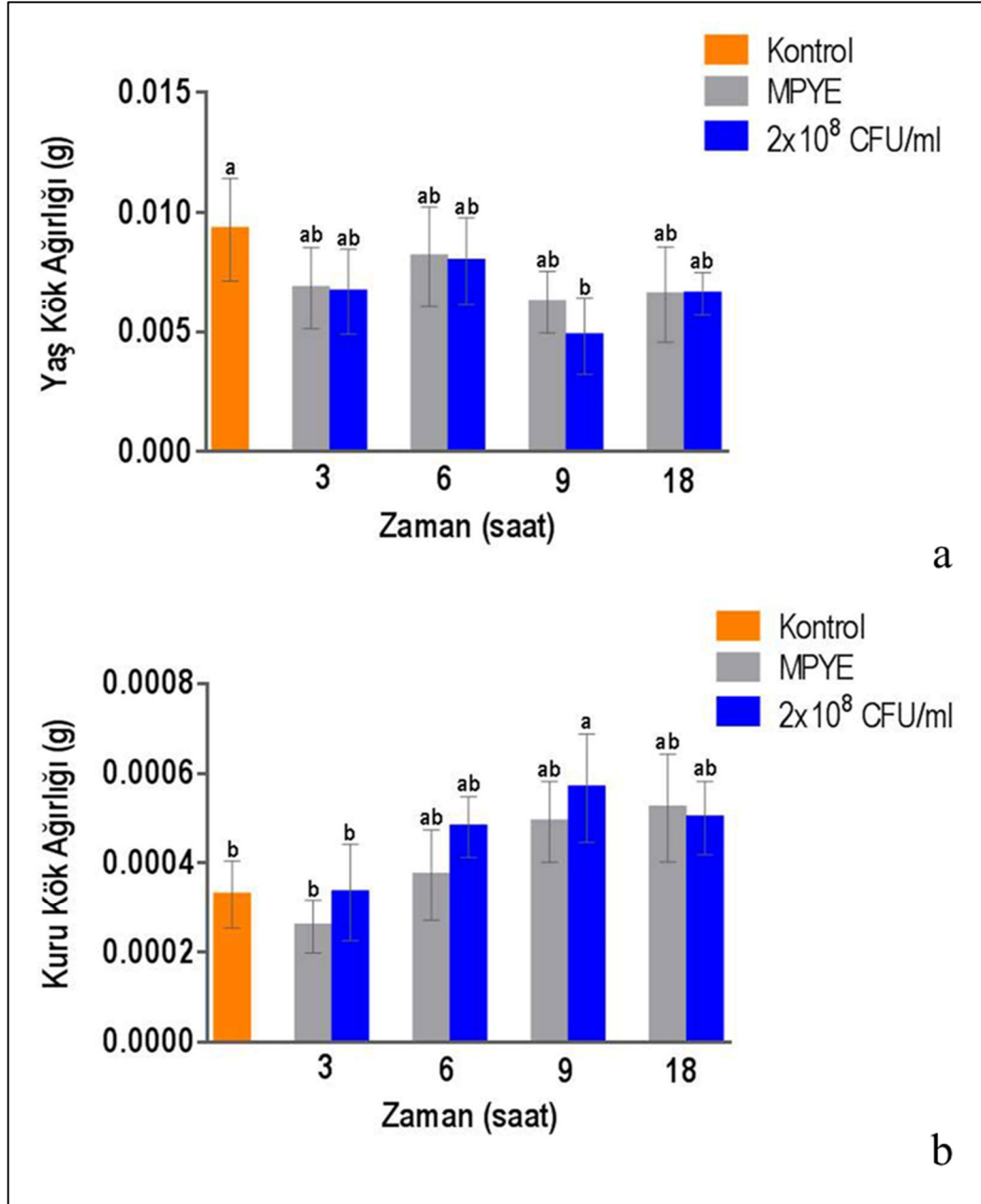
Şekil 4.29: Daldırma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen *N. tabacum* tohumlarının 21 gün sonundaki morfolojik görünüşleri a) MPYE 3 Saat b) 2x10⁸ CFU/ml 3 saat c) MPYE 6 Saat d) 2x10⁸ CFU/ml 6 saat e) MPYE 9 Saat f) 2x10⁸ CFU/ml 9 saat g) MPYE 18 Saat h) 2x10⁸ CFU/ml 18 saat süre ile uygulanan bakteri konsantrasyonunun bitki gelişimi üzerine etkisi.

Elde edilen sonuçlara göre; artan bakteri ile inokülasyon süresi ile birlikte bitkinin kuru gövde ağırlığı kontrol grubuna göre azalırken, uygulanan tüm inokülasyon sürelerinde kontrol grubu ile benzer kuru bitki ağırlığı ölçülmüştür (Şekil 4.31).

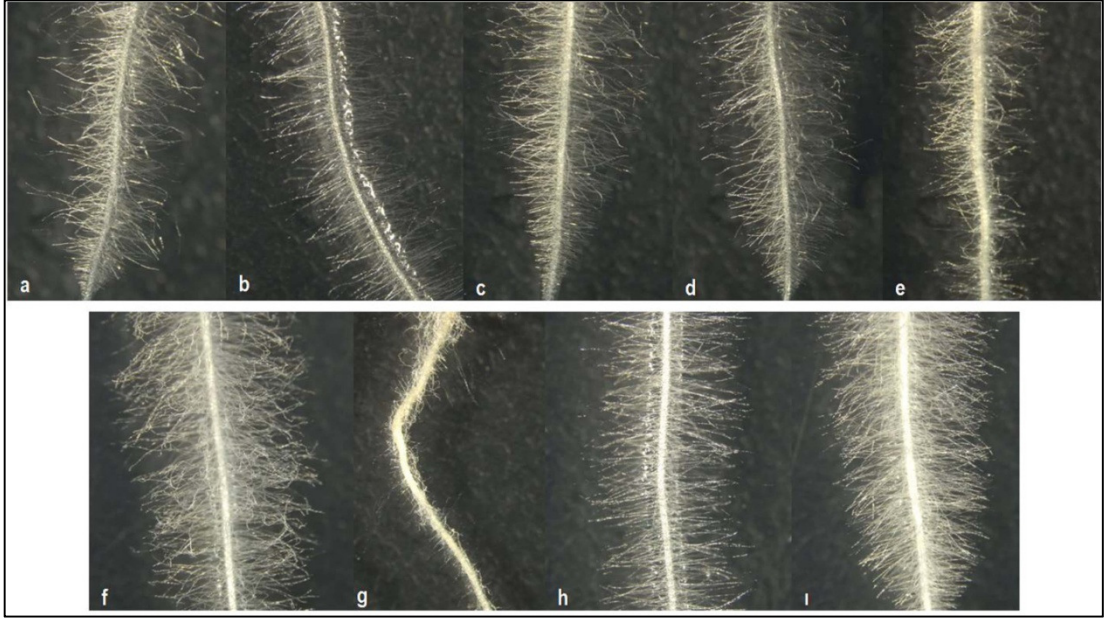


Şekil 4.30: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* kuru gövde (a) ve kuru bitki ağırlığına (b) etkisi.

Yaş kök ve kuru kök ölçüm sonuçlarına göre (Şekil 4.32); 2×10^8 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile bitkinin farklı sürelerde inoküle edilmesi sonucunda kök ağırlığı kontrol grubu ile benzer veya kök ağırlığında artış tespit edilmiştir. İnokülasyon sonrası kök boylarındaki azalmaya rağmen; bu durumun Şekil 4.30 ve Şekil 4.33'te görüldüğü üzere, bitkideki lateral köklerin ve kök tüylerinin artması nedeni ile olması muhtemeldir.



Şekil 4.31: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* yaş kök ağırlığı a) ve kuru kök ağırlığına b) etkileri.

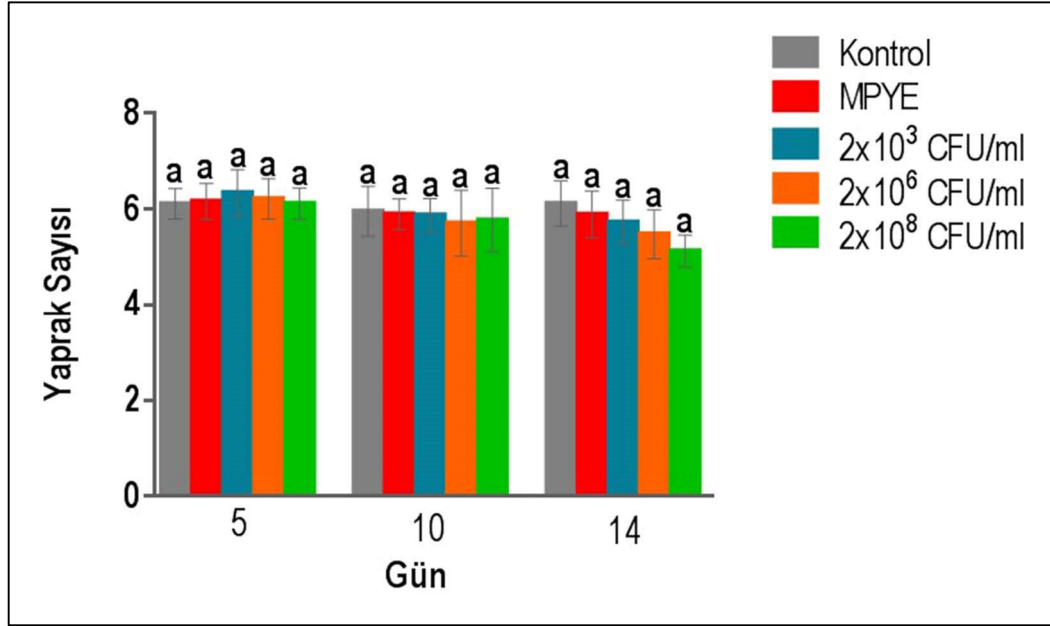


Şekil 4.32: Daldırma yöntemi kullanılarak bakteriyle inoküle edilen *N. Tabacum* tohumlarının 21 günlük kök tüyü fotoğrafları. a) Kontrol b) MPYE 3 Saat c) 2×10^8 CFU/ml 3 saat d) MPYE 6 Saat e) 2×10^8 CFU/ml 6 saat f) MPYE 9 Saat g) 2×10^8 CFU/ml 9 saat h) MPYE 18 Saat i) 2×10^8 CFU/ml 18 saat süre ile uygulanan bakteri konsantrasyonu ile inokülasyon sonrası.

4.2.2. Yayma Yöntemi ile İnoküle Edilen *P. putida* KT2440'ın *N. tabacum* Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

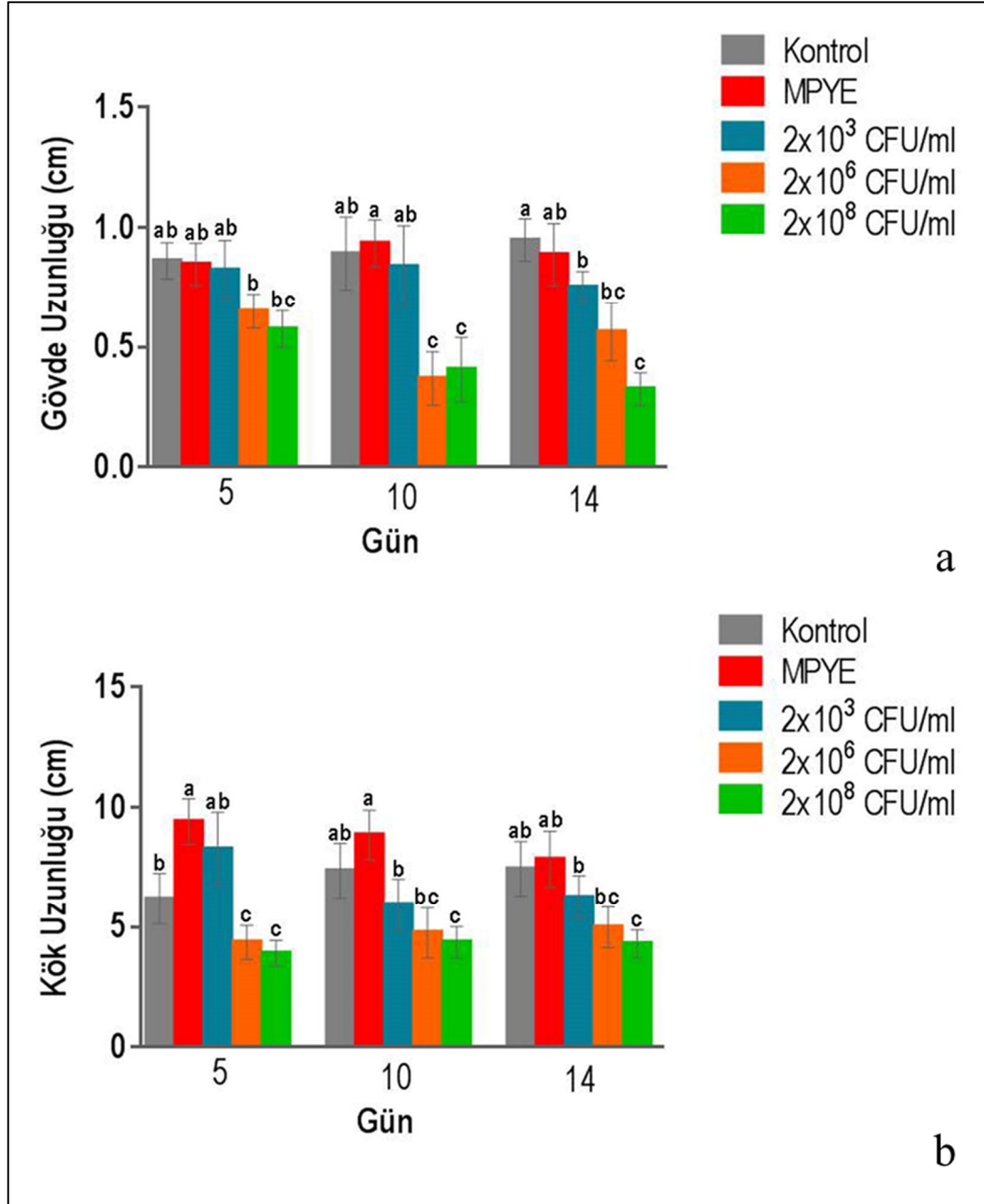
Yayma yöntemi kullanılarak 2×10^3 CFU/ml, 2×10^6 CFU/ml ve 2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki bakteriyel süspansiyonlar ile 5-, 10- ve 14-günlük inoküle edilen *N. tabacum* bitkiciklerinin büyüme özellikleri 21 gün boyunca izlenmiştir.

Üç farklı konsantrasyonda bakteri süspansiyonu ile 5-, 10- ve 14-günlük inoküle edilen *N. tabacum* bitkiciklerinin 21 gün sonundaki ölçüm sonuçlarında; yaprak sayısı kontrol grupları ile aynı olup, artan bakteri konsantrasyonuna rağmen yaprak sayısında azalma görülmemiştir (Şekil 4.34).



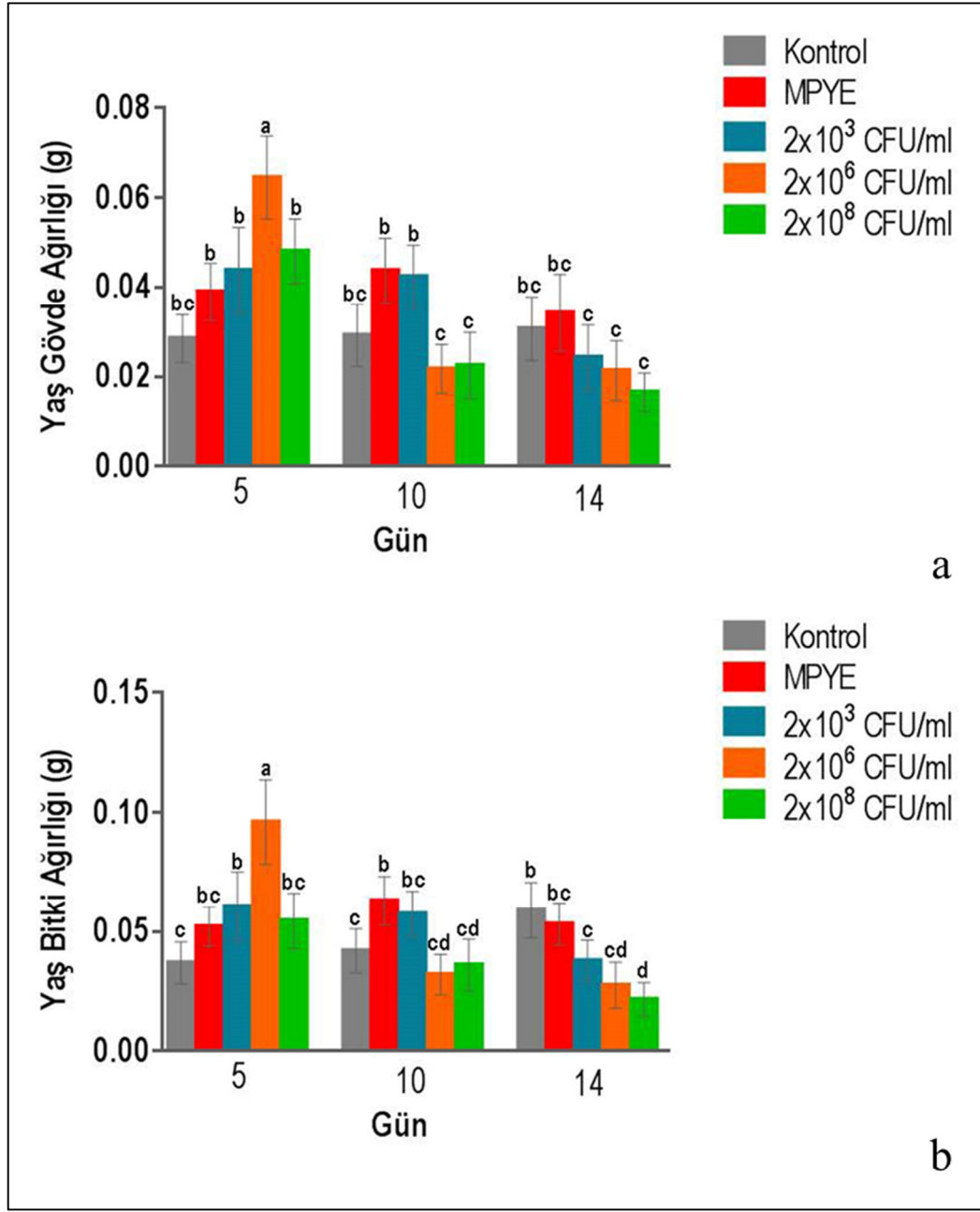
Şekil 4.33: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin yaprak sayısına etkisi.

Yayma yöntemi kullanılarak *P. putida* bakterisiyle inoküle edilen *N. tabacum* fideciklerinin gövde boyu istatistiksel analiz sonuçlarına göre; 5. ve 10. günde uygulanan bakteri inokülasyonlarında; 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarında kontrol grubu ile benzer gövde uzunluğu ölçülmüştür. Bakteri süspansiyonunun daha yüksek konsantrasyonları (2×10^6 CFU/ml ve 2×10^8 CFU/ml) 5. ve 10. gün uygulanan inokülasyonlarda olumsuz etki göstermiştir. 14. günde ise artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte *N. tabacum* bitkiciklerinin gövde boylarında azalma ölçülmüştür (Şekil 4.35). Kök boylarında ise; 5. gün uygulanan bakteri inokülasyonunda 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonunda kontrol grubu ile benzer ve olumlu bir etki görülmekte; artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte kök boyu azalmaktadır. 10. ve 14. gün uygulanan inokülasyonlarda yine artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte kök boylarında azalma ölçülmüştür (Şekil 4.35).



Şekil 4.34: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin gövde boyu (a) ve kök boyu (b) gelişimine etkisi.

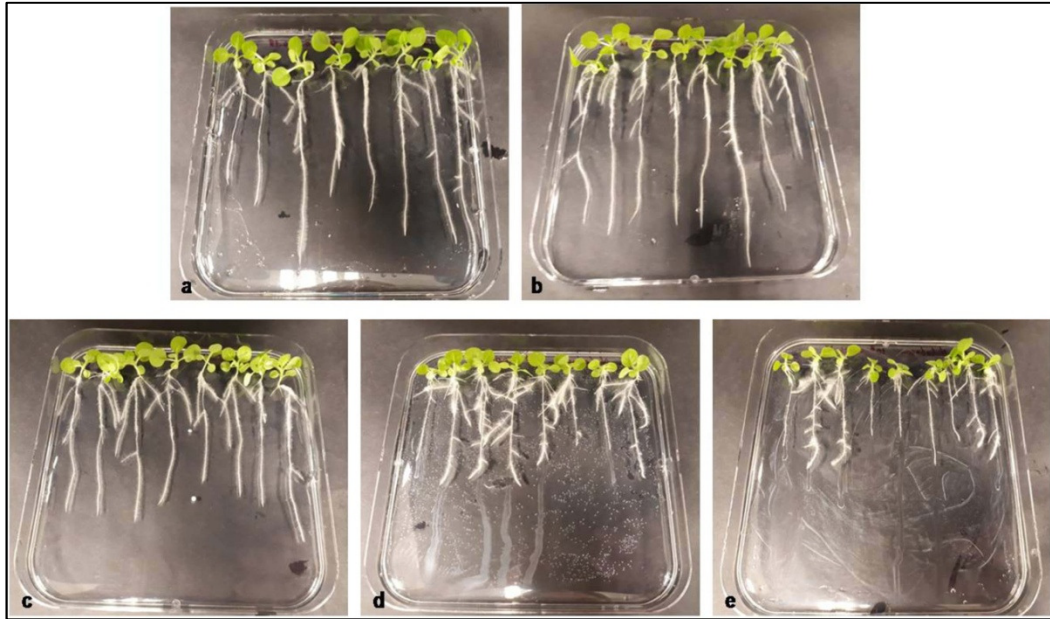
Elde edilen sonuçlara göre; *N. tabacum* bitkiciklerinin yaş gövde ve yaş bitki ağırlığında, 5. gün uygulanan tüm bakteri konsantrasyonlarında kontrol grubu ile benzer veya olumlu etkiler gözlenmekte; özellikle 2x10⁶ CFU/ml konsantrasyonda yaş gövde ve total bitki ağırlığında artış tespit edilmiştir. 14. gün uygulanan inokülasyonlarda artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte yaş gövde ve yaş bitki ağırlıklarında azalma ölçülmüştür (Şekil 4.36). Elde edilen sonuçlar morfolojik olarak da gözlenmektedir (Şekil 4.37 ve Şekil 4.38).



Şekil 4.35: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin yaş gövde ağırlığı ve yaş bitki ağırlığına etkisi.



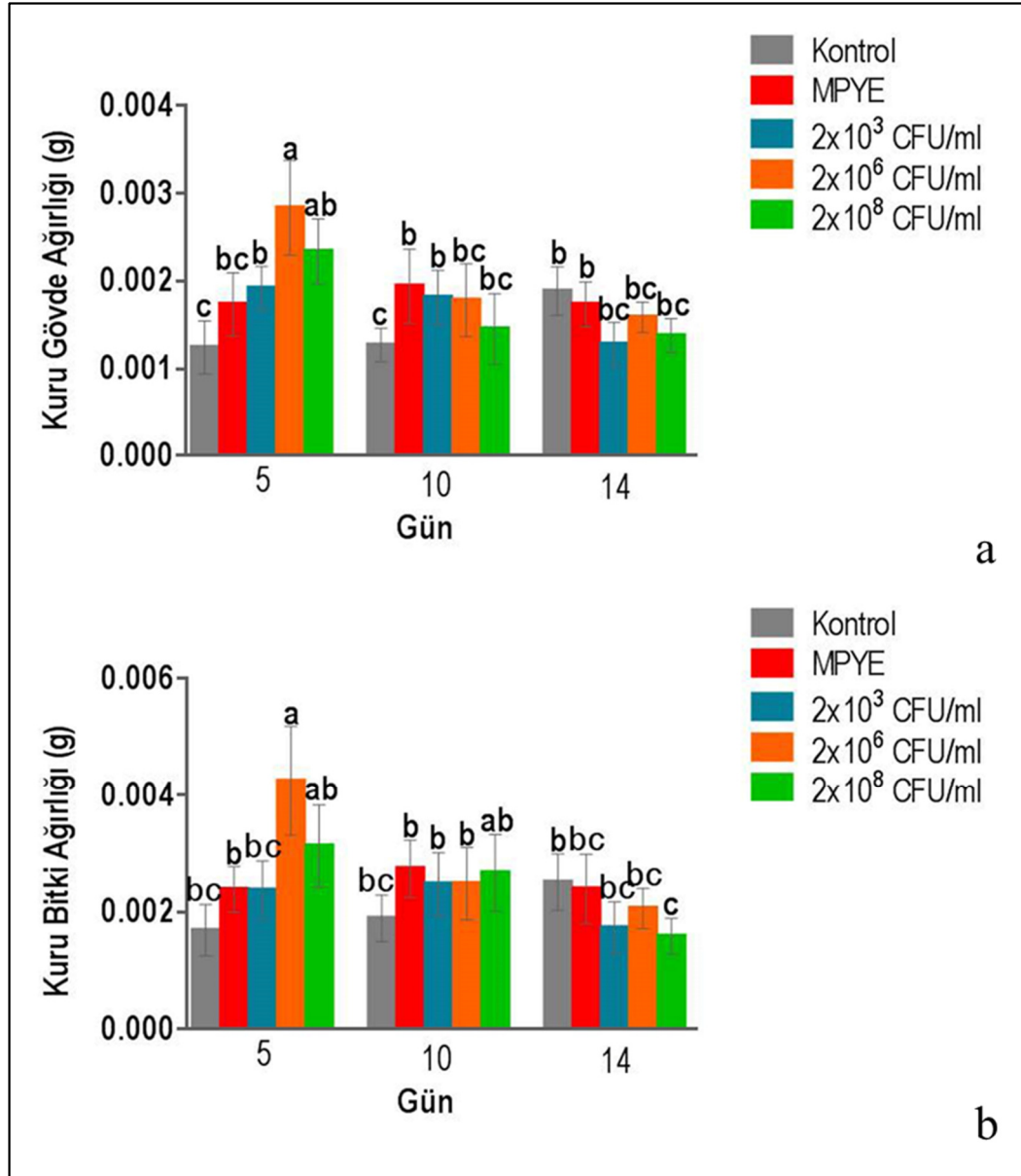
Şekil 4.36: Yayma yöntemi ile 5 günlük iken bakteriyle inoküle edilen *N. tabacum* bitkiciklerinin 21. günündeki morfolojik görünümleri. a) Kontrol b) MPYE c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^6 CFU/ml e) 2×10^8 CFU/ml bakterileri konsantrasyonlarının bitkiciklerin morfolojisi üzerine etkisi.



Şekil 4.37: Yayma yöntemi ile 14 günlük iken bakteriyle inoküle edilen *N. tabacum* bitkiciklerinin morfolojik görünümleri. a) Kontrol b) MPYE c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^6 CFU/ml e) 2×10^8 CFU/ml bakterileri konsantrasyonlarının bitkiciklerin morfolojisi üzerine etkisi.

N. tabacum bitkiciklerinin kuru gövde ve kuru bitki ağırlığı ölçüm sonuçlarına göre; yaş ağırlık sonuçlarına benzer şekilde, 5. gün uygulanan tüm bakteri

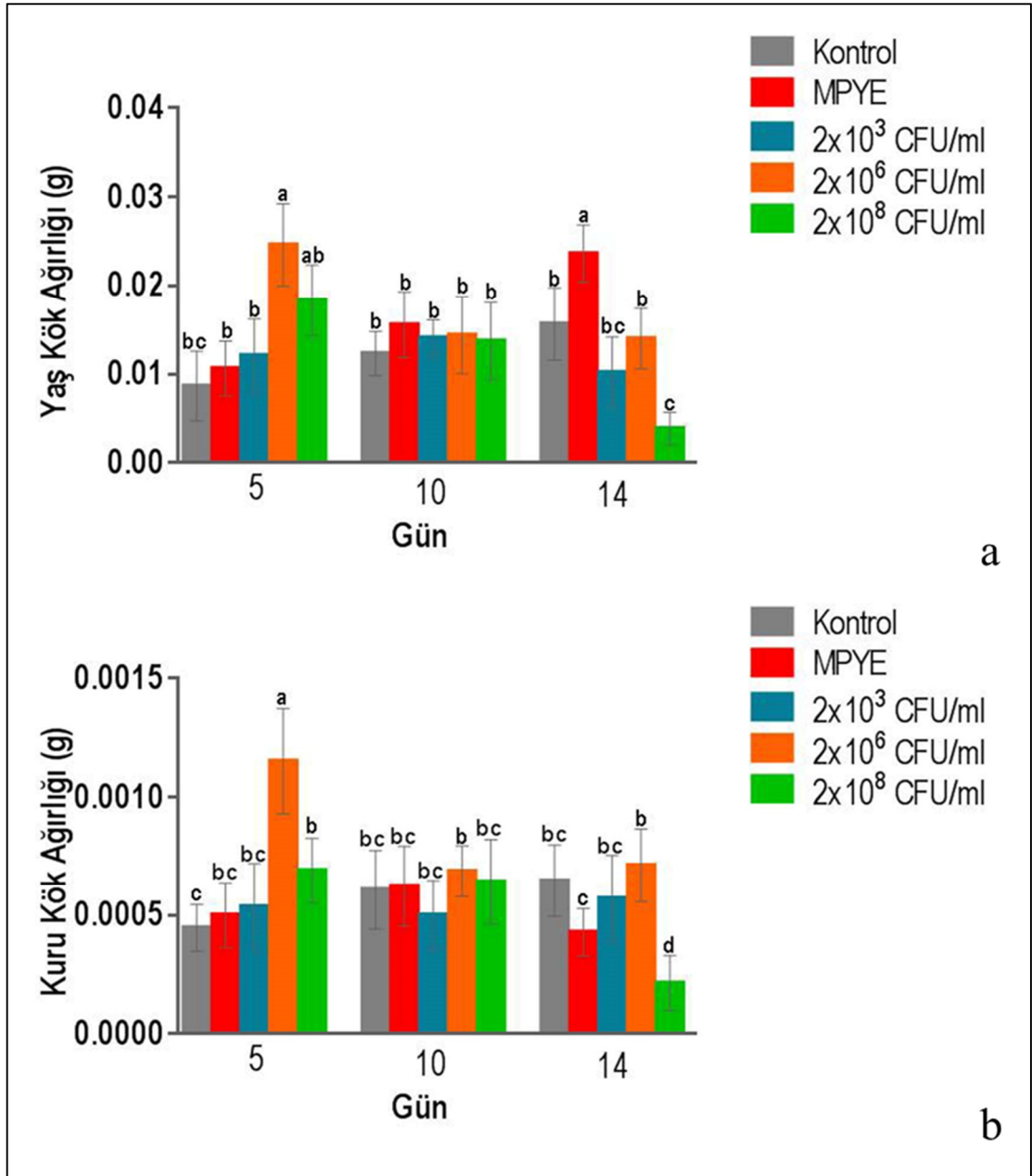
konsantrasyonlarında kontrol grubu ile benzer veya olumlu etkiler gözlenmekte; özellikle 2×10^6 CFU/ml konsantrasyonda kuru gövde ve kuru bitki ağırlığında artış tespit edilmiştir. 10. ve 14. gün uygulanan inokülasyonlarda yine artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte kontrol grubu ile benzer veya olumlu etkiler tespit edilmiştir (Şekil 4.39).



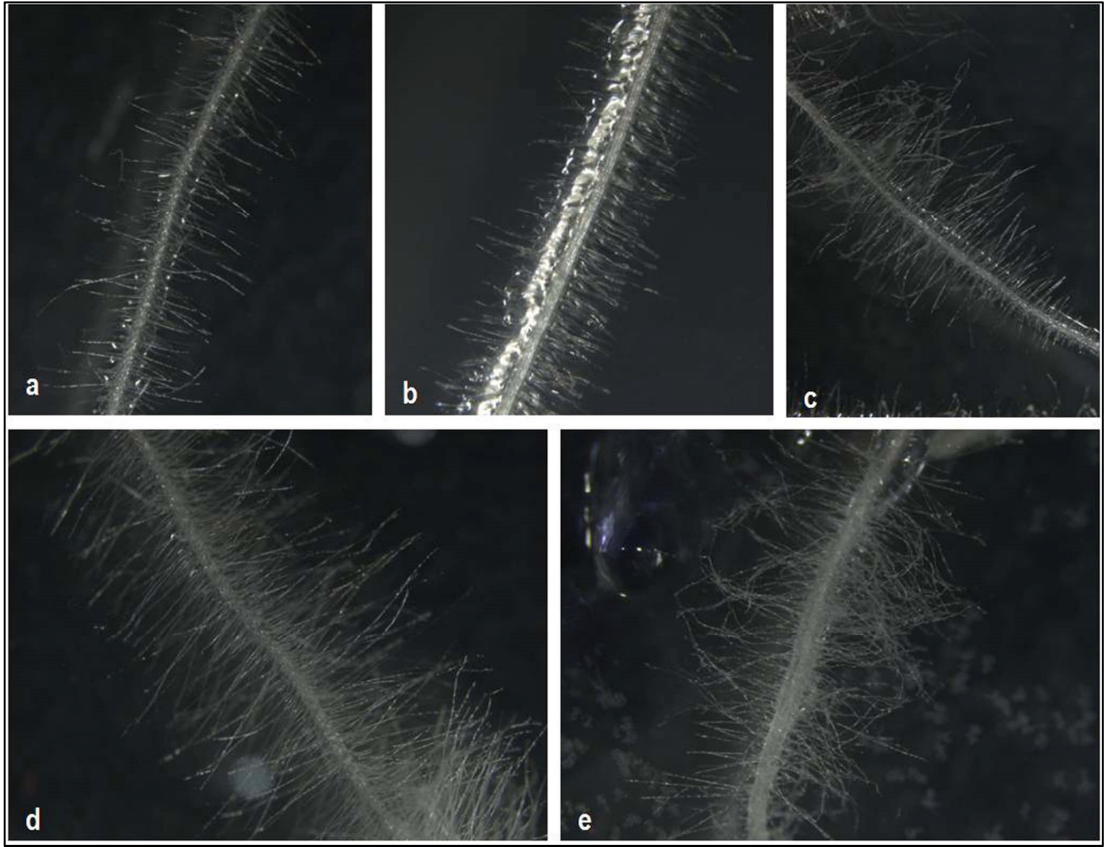
Şekil 4.38: Yayıma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin kuru gövde ağırlığı (a) ve kuru bitki ağırlığına (b) etkisi.

Yaş kök ağırlığı ve kuru kök ağırlığı değerlerine göre; 5. gün uygulanan 2×10^6 CFU/ml konsantrasyonda yaş kök ağırlığı ve kuru kök ağırlığında artış gözlenmektedir. Bu artışların bitkideki lateral kök oluşumunun ve kök tüylerinin

artması nedeniyle olması muhtemeldir (Şekil 4.37 ve Şekil 4.41). 10. gün uygulanan inokülasyonlarda artan bakteri konsantrasyonuna rağmen kontrol grubu ile benzer ağırlıklar ölçülmekte; 14. gün uygulanan 2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki inokülasyonda ise kök ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.40).



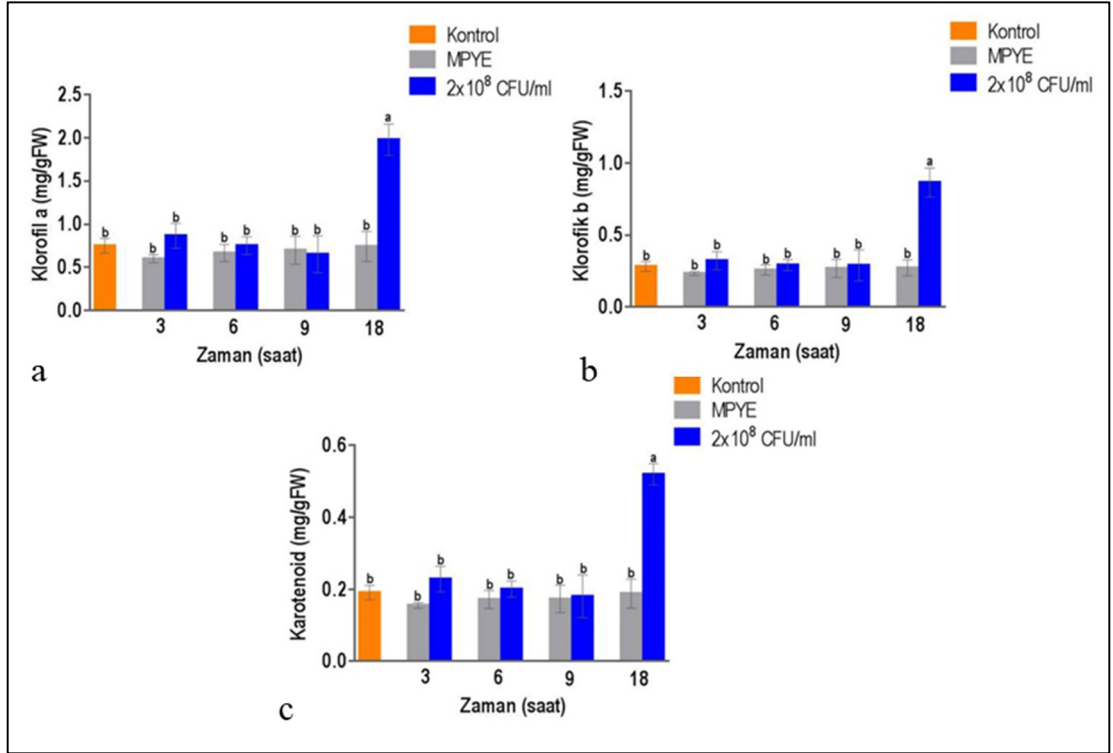
Şekil 4.39: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin yaş kök (a) ve kuru kök (b) ağırlığına etkisi.



Şekil 4.40: Yayma yöntemi kullanılarak 5. gün bakteriyle inoküle edilen *N. tabacum* bitkiciklerinin 21 günlük kök tüyü fotoğrafları. a) Kontrol b) MPYE c) 2×10^3 CFU/ml d) 2×10^6 CFU/ml e) 2×10^8 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inokülasyon sonrası.

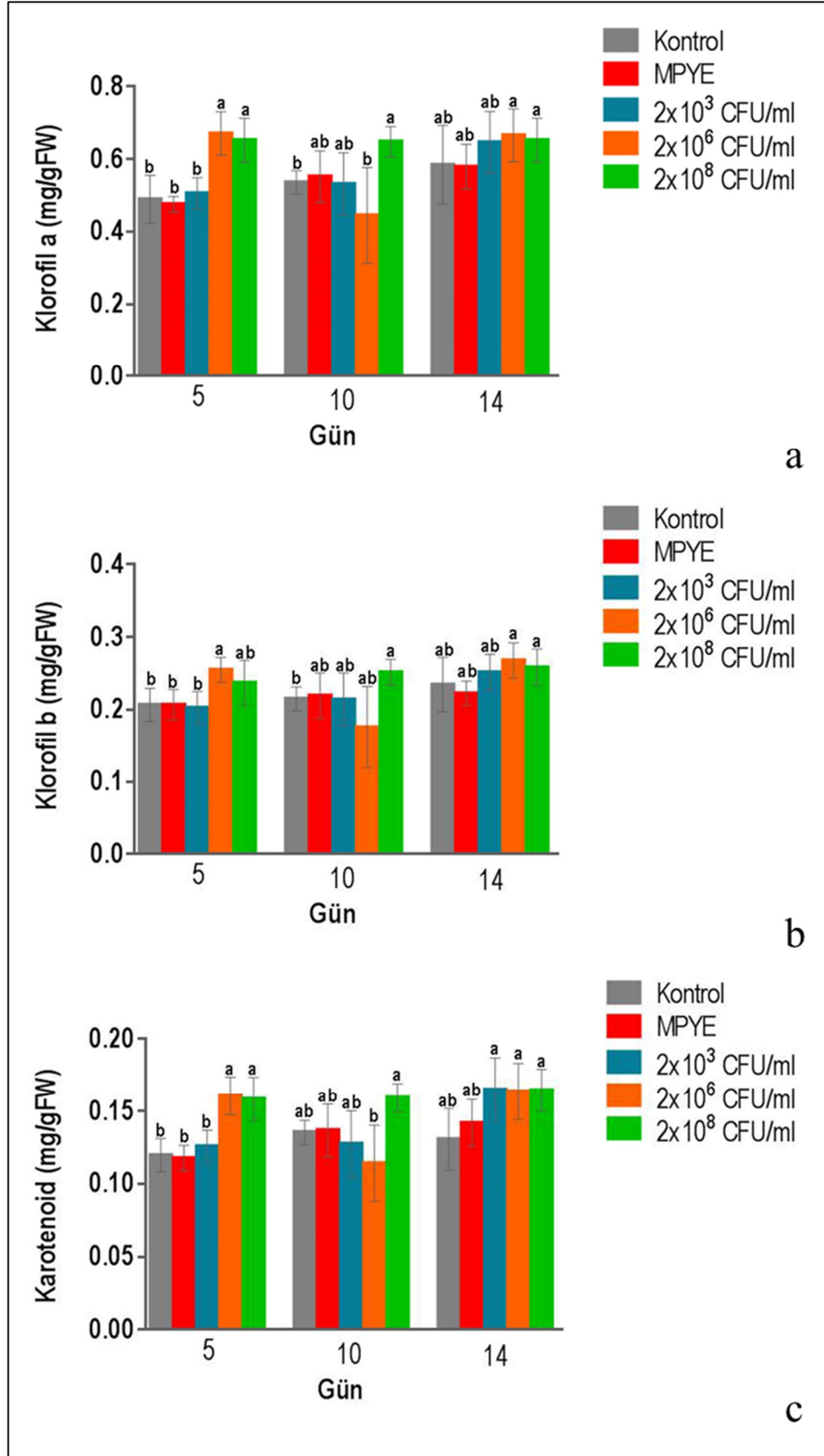
4.2.3. *N. tabacum* Bitkisinin Fotosentetik Pigmentleri Üzerine *P. putida* KT2440'm Etkisi

Daldırma yöntemi ile 2×10^8 CFU/ml konsantrasyondaki bakteriyel süspansiyon ile inokülasyon sonrası *N. tabacum* bitkiciklerinin fotosentetik pigment ölçümlerinde; 18 saat uygulanan inokülasyonda klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarında artış görülmektedir. 3, 6 ve 9 saat uygulanan inokülasyonlarda her üç fotosentetik pigment de kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.42).



Şekil 4.41: Daldırma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin klorofil a (a), klorofil b (b) ve karotenoid (c) miktarı üzerine etkileri.

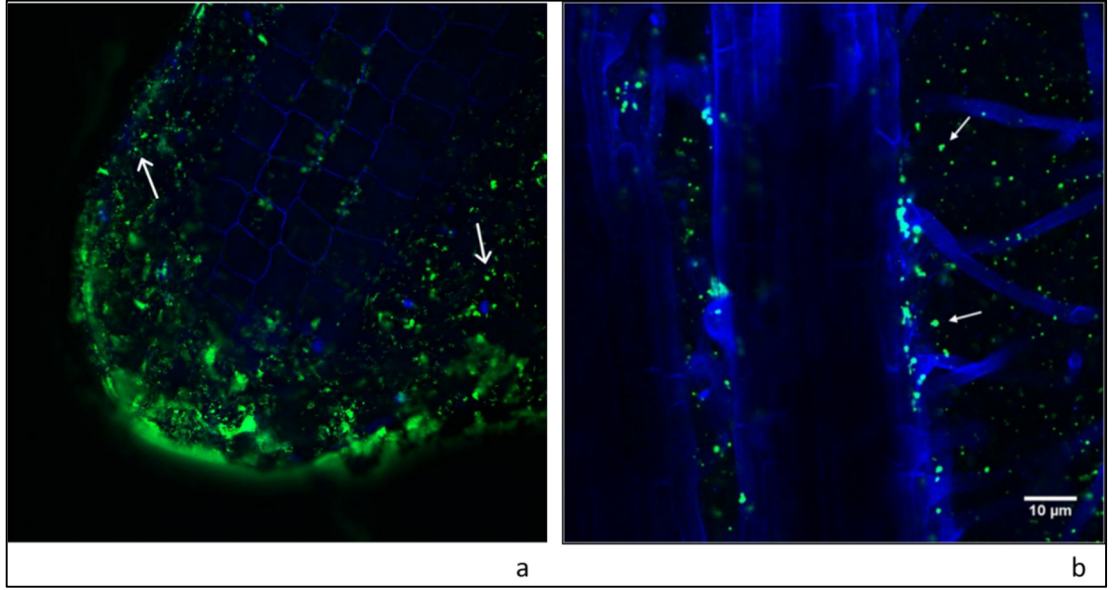
5-, 10- ve 14- günlük *N. tabacum* bitkilerinde, artan bakteri konsantrasyonlarıyla yayma yöntemi kullanılarak uygulanan bakteriyel inokülasyonun bitkinin fotosentetik pigment miktarları üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 5. gün uygulanan inokülasyonda 2×10^6 CFU/ml ve 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonlarda her üç fotosentetik pigmentte artış görülmektedir. 10. gün uygulanan inokülasyonda 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonlarda yine her üç fotosentetik pigmentte artış görülmekte; 14. gün uygulanan inokülasyonda ise artan bakteri konsantrasyonuna rağmen her üç fotosentetik pigment de kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.43).



Şekil 4.42: Yayma yöntemi ile bakteriyel inokülasyonun *N. tabacum* bitkisinin klorofil a a), klorofil b b) ve karotenoid c) miktarı üzerine etkileri.

4.3. *P. putida* KT2440 Bakterisinin *A. thaliana* ve *N. tabacum* Köklerindeki Lokalizasyonu

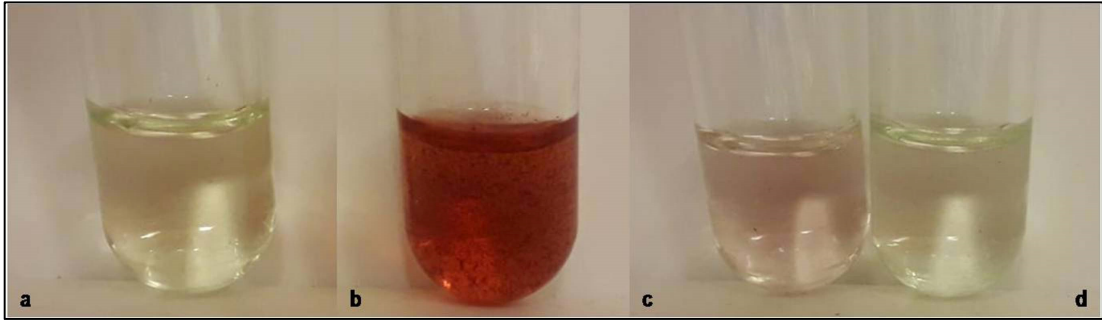
GFP ile işaretlenmiş *P. putida* KT2440'ın *A. thaliana* ve *N. tabacum* köklerindeki lokalizasyonu konfokal lazer mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş, *P. putida* bakterisinin her iki bitkinin de kök yüzeylerinde, yan köklerinde ve kök tüylerinde lokalize olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.44).



Şekil 4.43: GFP ile işaretlenmiş *P. putida* KT2440'ın *N. tabacum* (a), *A. thaliana* (b) köklerindeki lokalizasyonu. Ok işareti *P. putida* bakterisini göstermektedir.

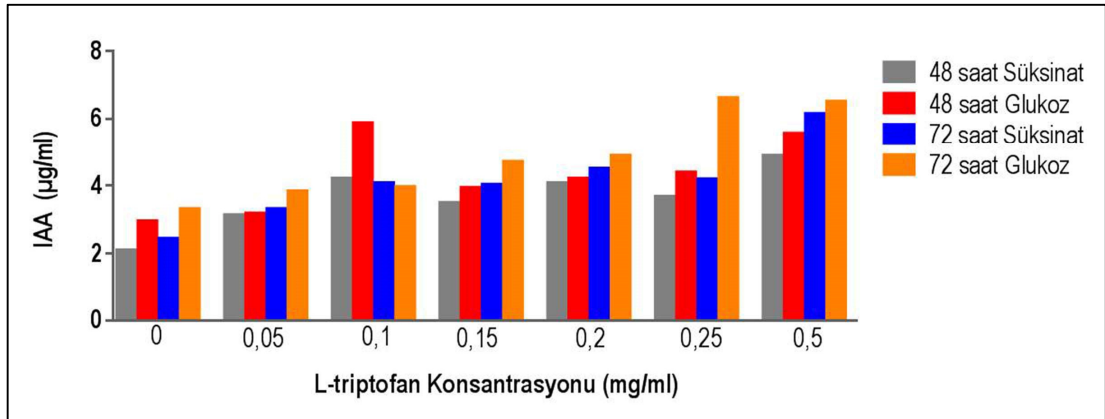
4.4. İndol Asetik Asit (IAA) Tayini

P. putida KT2440 bakterisinin IAA üretimi L-triptofan varlığında kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bakteri kültürleri glukoz ve süksinat içeren DF salt besiyerinde büyütülmüştür. 0,5 mg/ml L-triptofan varlığında IAA üretimi; *E. coli* izolatında koyu kırmızı, *P. putida* KT2440 izolatında ise açık pembe renk oluşumu ile belirlenmiştir. Kontrol gruplarında renk oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.45).



Şekil 4.44: IAA üretiminin kalitatif analizi. L-triptofan (-) (a, d), L-triptofan (+) (b, c). a) *E. coli* (kontrol), b) *E. coli* (kırmızı renk), c) *P. putida* (pembe renk), d) *P. putida* (kontrol) izolatlarının 0,5 mg/ml L-triptofan varlığında IAA üretimi.

P. putida KT2440 izolatlarının IAA üretimi artan L-triptofan konsantrasyonu ile birlikte artmıştır. *P. putida* KT2440 0,5 mg/ml L-triptofan konsantrasyonu varlığında ortalama 6 µg/ml IAA üretmiştir. 48 saat büyümeye bırakılan bakteri izolatları ile karşılaştırıldığında, 72 saat büyümeye bırakılan bakteri izolatlarının IAA üretiminde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.46). Ayrıca artan L-triptofan konsantrasyonu ile birlikte, IAA üretimi glukoz varlığında artmıştır.

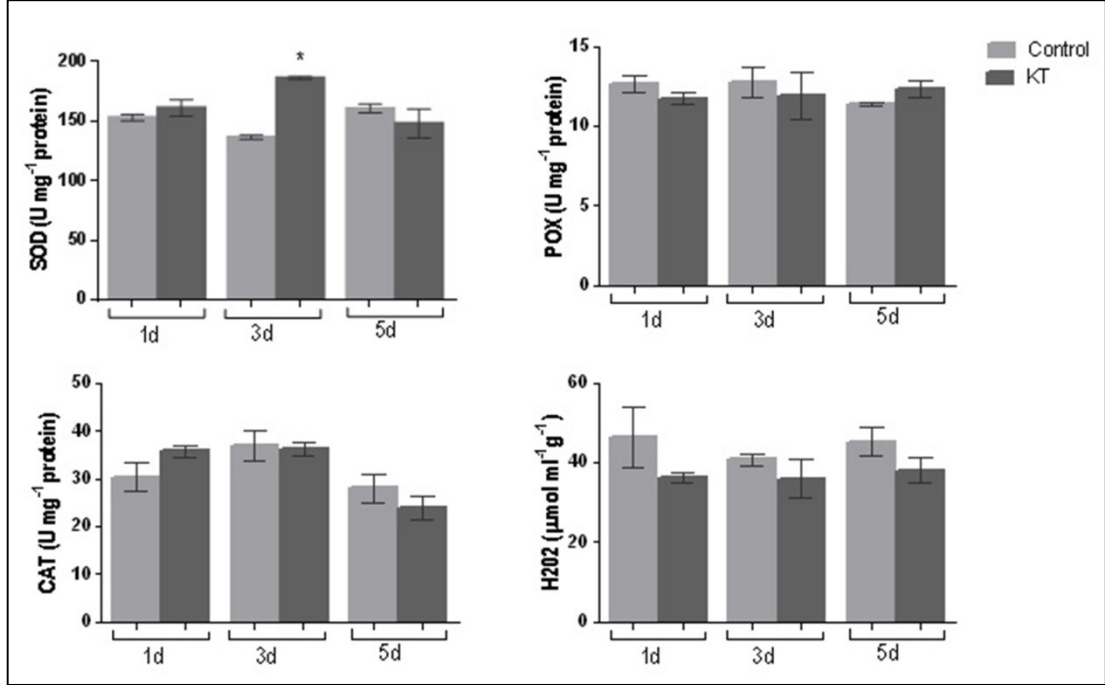


Şekil 4.45: *P. putida* KT2440 izolatlarının artan L-triptofan varlığında DF salt besiyerinde IAA üretimi.

4.5. *A. thaliana* Bitkisinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

P. putida KT2440 bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonundaki süspansiyonu ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edilen 7 günlük *A. thaliana* bitkisinin antioksidan enzim aktiviteleri inokülasyonu takip eden 1., 3. ve 5. günlerde izlendi. Analiz sonuçlarına göre; bakteri ile inokülasyonun 3. gününde SOD

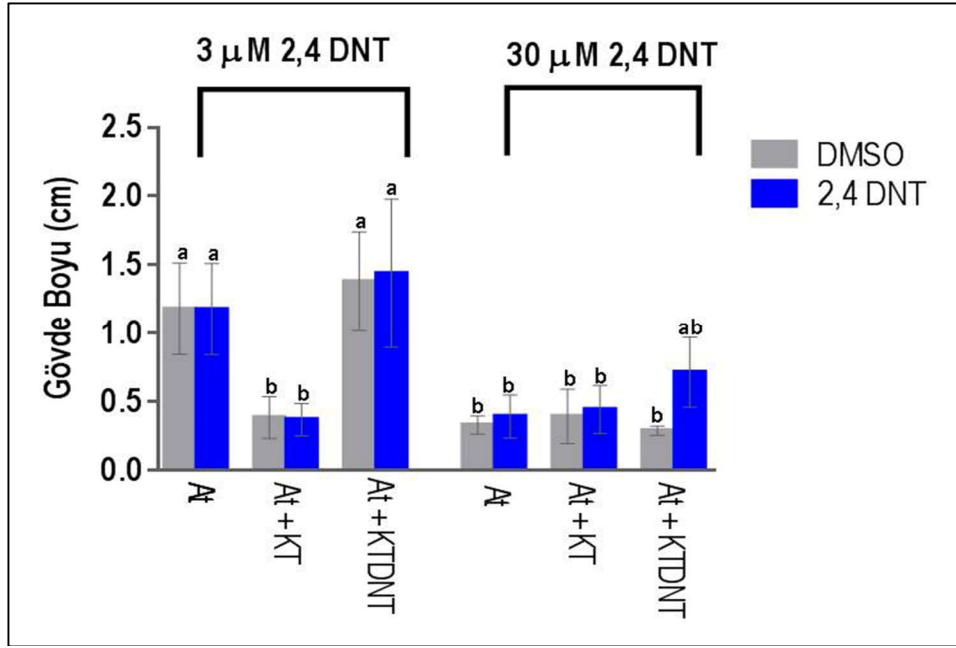
aktivitesinde artış görülürken, 5. güne gelindiğinde SOD aktivitesi kontrol grubu ile benzerdir. İnokülasyonu takiben H₂O₂ miktarında artış görülmemekte olup, CAT ve SOD aktiviteleleri kontrol grubu ile benzerdir (Şekil 4.47).



Şekil 4.46: *P. putida* KT2440'ın *A. thaliana* antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

4.6. 2,4-Dinitrotoluen'in *A. thaliana* Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin KT.DNT Varlığında Değerlendirilmesi

P. putida KT2440 (KT) ve KT.DNT bakterileri ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edilen ve 14 günlük 2,4-DNT içeren ½ MS besi ortamına aktarılan *A. thaliana* bitkilerinin 21 gün ölçüm analiz sonuçlarına göre; 3 μM ve 30 μM 2,4-DNT konsantrasyonlarının bitki üzerinde ölümcül bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Yaprak sayısı ve kök uzunluğu, ölçüm sonuçları her iki 2,4-DNT konsantrasyonu için de kontrol grubu ile benzer olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. KT.DNT ile inoküle olan bitkilerde 30 μM 2,4-DNT konsantrasyonunda gövde boyunda artış gözlenmektedir (Şekil 4.48). Ayrıca, bakteri ile inoküle edilen bitkilerde, bakteri ile inoküle edilmemiş kontrol grubuna kıyasla her iki 2,4-DNT konsantrasyonunda da *P. putida* KT2440 ile inokülasyona benzer olarak lateral köklerde artış gözlenmektedir (Şekil 4.49).



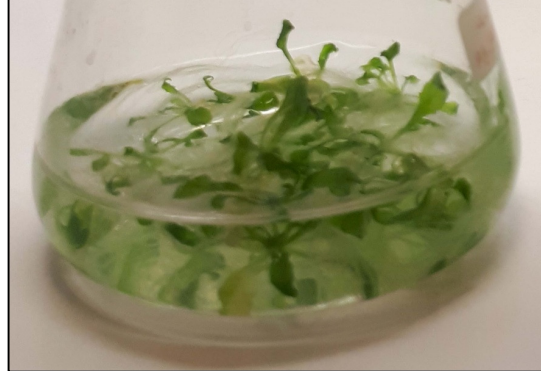
Şekil 4.47: Farklı konsantrasyonlardaki (3 µM ve 30 µM) 2,4-DNT'nin *A. thaliana* gövde boyuna etkisi.



Şekil 4.48: 2,4-DNT'nin *A. thaliana* bitki gelişimi üzerine etkisi. 3 µM 2,4-DNT (a, b, c) ve 30 µM 2,4-DNT (d, e, f) konsantrasyonunda: a) Kontrol, b) KT, c) KTDNT d) Kontrol, e) KT, f) KTDNT. Çizgi ölçek 1 cm'yi ifade etmektedir.

4.7. 2,4-Dinitrotoluen'in KT.DNT Varlığında *A. thaliana* ile *in vitro* Biyodegradasyonu

KT.DNT bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonu ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkicikleri 0,5 mM 2,4-DNT içeren erlenlere aktarılarak; bitki köklerine tutunmuş bakteriler ile 2,4-DNT'nin *in vitro* degradasyonunun gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 4.50). 2,4-DNT degradasyon yolağının ilk adımı 2,4-DNT dioksijenaz enziminin, ilk nitro grubunu parçalayarak 4M5NC halkasını oluşturmasıdır. Bu reaksiyonun oluşumu erlenlerde gerçekleşen renk değişimi ile gözlenmektedir (Şekil 4.51).



Şekil 4.49: KT.DNT bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonu ile inoküle edilen 14 günlük *A. thaliana* bitkilerinin ½ MS besiyeri içeren erlenlere aktarılması.



Şekil 4.50: 2,4-Dinitrotoluen'in *in vitro* koşullarda bakteriyle inoküle edilmiş *A. thaliana* bitkicikleri tarafından biyodegradasyonu. a) 0,5 mM 2,4-DNT içeren besiyeri, b) 2,4-DNT içermeyen kontrol besiyeri.

4.7.1. 2,4-DNT Biyodegradasyonunun Analitik Yöntemler Kullanılarak Gösterilmesi

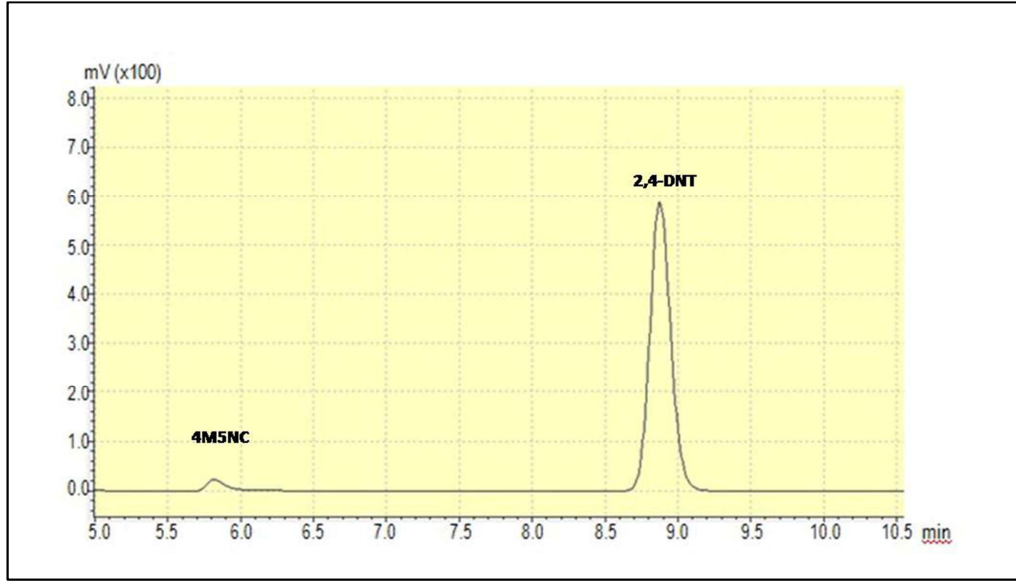
KT.DNT bakterisinin 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonu ile yayma yöntemi kullanılarak inoküle edilen *A. thaliana* bitkilerinin bulunduğu erlenlere 0,5 mM 2,4-DNT eklenmesiyle birlikte; 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda toplanan örnekler spektrofotometrik ve kromatografik analizlerde kullanıldı. Spektrofotometrik analizler sonucunda; erlende oluşan sarı-turuncu metabolitin 4M5NC olduğu, Nishino ve ark., (2000), referans alınarak 420 nm absorbanstaki artış ile belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Erlenlerden Toplanan Örneklerin 420 nm'deki Absorbansları. A) 0,5 mM 2,4-DNT içeren besiyeri, B) 2,4-DNT içermeyen kontrol besiyeri.

Zaman (dakika)	λ 420	
	A	B
0	0,125 $\pm$ 0,01	0,012 $\pm$ 0,01
30	0,250 $\pm$ 0,008	0,019 $\pm$ 0,01
60	0,335 $\pm$ 0,03	0,014 $\pm$ 0,02
90	0,368 $\pm$ 0,01	0,025 $\pm$ 0,02

HPLC analizlerinde 2,4-DNT ve degradasyon ürünü olan 4M5NC'ün miktar tayini için, kalibrasyon eğrisi hazırlanarak degradasyon sonucu kalan 2,4-DNT ve oluşan 4M5NC miktarı belirlenmiştir.

HPLC analiz sonuçlarına göre; 0,5 mM 2,4-DNT içeren erlende 2,4-DNT ve degradasyon ürünü olan 4M5NC'e ait pikler görülmüştür. Alıkonma zamanları sırasıyla 8,8 ve 5,8 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.51: 2,4-DNT'in degradasyonunun 120. dakikasına ait HPLC kromatogramı.

Tablo 4.2'de görüldüğü üzere; 2,4-DNT'nin KT.DNT bakterisi tarafından degradasyonu sonucu ortamdaki 2,4-DNT miktarı azalmakta ve degradasyon ürünü olan 4M5NC miktarında artış görülmektedir. 120. dakika örneğinin HPLC analiz sonucunda başlangıçtaki 2,4-DNT'nin yaklaşık %31 oranında azaldığı belirlenmiştir. Degradasyon ürünü olan 4M5NC miktarı ortamda 60. dakikada 0,25 µg/ml ve 120. dakikada 0,53 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: 2,4-DNT ve 4M5NC'e ait HPLC analiz sonuçları.

2,4-DNT İçeren Erlen Örnekleri	2,4-DNT			4M5NC		
	Alıkonma zamanı (dk)	Konsantrasyon (µg/ml)	Pik Alanı	Alıkonma zamanı (dk)	Konsantrasyon (µg/ml)	Pik Alanı
60 dk	8,891	75,67039	6487527	6,324	0,25552	108733
90 dk	8,874	74,19109	6360701	6,261	0,49352	210012
120 dk	8,871	68,75288	5894462	5,812	0,5329	226746

5. TARTIŞMA

Genel olarak, bakteri süspansiyonları toprağa direkt olarak aşılandıktan kısa bir süre sonra, çoğu PGPR türünde bakteri popülasyonu hızlıca azalır. Bakteriyel biyokütlenin zayıf üretimi, aşılama zamanındaki bakterinin fizyolojik durumu, rizosferde aktivitesini sürdürme zorluğu gibi sınırlayıcı faktörler rizosferde büyük bir PGPR popülasyonunun oluşmasını engelleyebilir [Bashan ve ark., 2014]. Bitki-bakteri etkileşimini kullanılan yöntemlerde ise bitki kökleri ve etrafını çevreleyen rizosfer, bakterilerin kök besinlerinden gelişmesini sağlarken, bakteri de çeşitli yollar ile bitki büyümesini indükler. Bir toprak bakterisi olan *P. putida* ile model organizma olan iki dikotil bitkinin etkileşimini inceleyen bu çalışmadaki sonuçlar bize hem fitoremediasyon çalışmalarında hem de tarımsal alanda öncü veriler kazandırmaktadır.

PGPR ile bitkilerin biyotizasyonu düşünülürken ilk hedef uygulanacak bakteriyel konsantrasyonun ve inokülasyon yönteminin belirlenmesidir. Bu çalışmada üç farklı inokülasyon yöntemi, 2×10^2 CFU/ml– 2×10^6 CFU/ml aralığında 5 farklı bakteri konsantrasyonu; *A. thaliana* ve *N. tabacum* model organizmalarının farklı fizyolojik evrelerinde (0-, 3-, 5-, 10- ve 14-gün) uygulanarak en uygun koşullar belirlenmiştir.

Yayma, pipetleme ve daldırma yöntemleri kullanılarak *A. thaliana* bitkisinin erken evrelerinde (0-, 3-, 5-gün) bakteri ile inokülasyon, bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine olumsuz etki göstermiş; ancak 10. günden sonra bitki bu stresi tolere ederek; kontrole benzer sonuçlar kaydedilmiştir. Ayrıca her üç yöntemde de; bakterinin artan konsantrasyonuna karşın, bitki çimlenmesi üzerine olumsuz etkisi tespit edilmemiştir. Çimlenme oranlarındaki farkın tohumun kendi içsel özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [Chahtane ve ark., 2017].

Bakterinin farklı konsantrasyonlarıyla farklı günlerde yayma yöntemiyle inokülasyonu sonucunda bitkiciklerin 10. günden sonra stresi tolere ettiği, özellikle 14. gününde 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonla inokülasyonu bitkiciklerin gövde boyunda belirgin artış sağlarken; 2×10^3 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inokülasyon sonrasında bitkinin kuru ağırlığında; 2×10^2 CFU/ml ve 2×10^3 CFU/ml konsantrasyonlarıyla inokülasyon sonrasında ise bitkinin kuru kök ağırlığında artış gözlenmiştir. Ayrıca bakteriyle inokülasyonun lateral kök oluşumu ve kök tüylerini çoğalttığı morfolojik olarak da gözlenmiştir. Farklı günlerde ve artan bakteri konsantrasyonlarında yayma yöntemi ile inokülasyon sonrasında; özellikle 0. ve 3.

günlerde pigment miktarında bir artış görülse de; bitki gelişiminin ilerleyen günlerinde klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarında kontrole görece önemli farklılıkların olmadığı belirlenmiştir.

Bakterinin farklı konsantrasyonları kullanılarak farklı günlerde yayma yöntemiyle *N. tabacum* bitkilerinin inokülasyonu sonunda; bitkiciklerin kök ve gövde boylarında artan bakteri konsantrasyonu ile birlikte azalma gözlenirken, 5. günlük 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inoküle edilen bitkiciklerin yaş ve kuru gövde, kök ve total bitki ağırlıklarında belirgin artış gözlenmiştir. Yine bakteriyel inokülasyonun lateral kök oluşumu ve kök tüylerini çoğalttığı morfolojik olarak da gözlenmiştir. 5. gün uygulanan inokülasyonda 2×10^6 CFU/ml ve 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonlarda her üç fotosentetik pigmentte artış görülmekte olup, bitki gelişiminin ilerleyen günlerinde klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarında kontrole görece önemli farklılıkların olmadığı belirlenmiştir.

Ishiga ve ark., (2011)'e göre *A. thaliana* bitkilerinin pipetleme yöntemi ile inokülasyonu, Arabidopsis-Pseudomonas etkileşimlerini çalışmak için hızlı, verimli ve ekonomik bir yöntem sağlamaktadır. Çalışmamızda pipetleme yöntemi kullanılarak bakteriyle yapılan inokülasyon sonucunda, yayma yöntemiyle elde edilen ve yukarıda özetlenen olumlu verilere benzer sonuçlar gözlenmemiştir. Pipetleme yöntemi ile inokülasyonda; genel olarak bakteri ile inoküle edilen bitkilerin istatistiksel verileri arasında homojen bir dağılım olmayıp, standart sapmalarında büyük farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın bitki üzerine pipetlerken bakteriyel süspansiyonun Petrinin her tarafına homojen yayılmaması nedeniyle, yöntemsel kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Daldırma yönteminde ise; tohumların bir inokülasyon eşiğine ihtiyaç duyabilecekleri [Bashan ve ark., 2014], bu yüzden *A. thaliana* bitkisinde 0. ve 3. gün uygulanan inokülasyonların düşük konsantrasyonunda bakteriyel tutunmanın olmadığı, tohumlara uygulanan yüksek konsantrasyonda inokülasyonun ve 5-, 10-, 14-günlük bitkilere uygulanan fazla hacimde inokülasyonun tohum ve bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. Yine daldırma yöntemi kullanılarak 2×10^8 CFU/ml konsantrasyon ile inoküle edilen *N. tabacum* tohumlarında; yaprak sayısı, gövde boyu, kök boyu ve bitki ağırlığında görülen olumsuz etkilerin, artan inokülasyon süresi ile birlikte tohum yüzeyine tutunan fazla bakteri sayısı ve yüksek bakteri konsantrasyonu nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Bakterinin bitki ile inokülasyonu için denenen inokülasyon yöntemlerinden; *A. thaliana* için; 10 günlük bitkiciklerin yayma yöntemi ve 2×10^3 CFU/ml bakteri

konsantrasyonunu, *N. tabacum* için; 5 günlük bitkiciklerin yayma yöntemi ve 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inokülasyonunun daha uygun olduğu belirlenmiştir. Kullanılan bakteri konsantrasyonu ve inokülasyon oranı, test edilen bitkilerin optimum fizyolojik evreleri her iki dikotil tür için farklılık göstermiştir. Bu sonuçlar *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkileri arasındaki fizyolojik farklılıklar ile ilişkilendirilebilir ve türe özgü bir yanıtın ortaya çıktığı ön görülebilir [Mohamed Iqbal ve Iqbal, 2019].

Tez çalışmasında hedeflenen; uygulanan inokülasyon yöntemi ve bakteri konsantrasyonunun bitkinin fizyolojik evresine bağlı olarak vereceği yanıtı ne ölçüde etkilediğini değerlendirmek olup; elde ettiğimiz sonuçlar, tüm bu faktörlerin bitki-bakteri etkileşimine dayalı çalışmalar tasarlanırken göz önünde bulundurulması gereken önemli etmenler olduğunu göstermiştir.

Abbamondi ve ark., (2016), *A. thaliana* ile yaptıkları çalışmada *Pseudomonas*'ın birincil kök büyümesini inhibe ederken, lateral köklerin ve kök tüylerinin büyümesini arttırdığını göstermişlerdir. Zamioudis ve ark., (2013), *P. fluorescens*'in *A. thaliana* bitkisinde ana kök büyümesini baskıladığını, lateral kök büyümesini ve kök tüy oluşumunu artırdığını vurgulamışlardır. Meliani ve ark., (2017), *P. putida* bakterisinin 2×10^8 CFU/ml konsantrasyonu ile inoküle edilen *Lens culinaris* tohumlarında, bakteri ile inoküle edilmemiş kontrol bitkilerine kıyasla ortalama kök ve gövde uzunluğunda artış belirlemiştir. Tez çalışmasında da, *P. putida* ile inokülasyon sonucu *Arabidopsis* ve bütün bitkilerindeki lateral kök ve kök tüylerinde artış gözlenmiştir. Yine inokülasyon sonrası *A. thaliana* gövde ve total ağırlığında artış görülmez iken, 5 günlük 2×10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inoküle edilen *N. tabacum* bitkisinde belirgin bir artış görülmektedir. Taze gövde ağırlığının artmasının, bitkilerin daha geniş yaprak ayasına sahip olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bakteriler kök tüyleri ve lateral kök gelişimini uyarak, su ve mineral maddelerin kullanımını arttırmış olabilir [Rodríguez-Navarro ve ark., 2007].

PGPR ile inokülasyon sonrası lateral köklerde meydana gelen artışın; rizosfer alanını genişleterek bu bölgedeki mikrobiyal topluluk sayısının çoğalmasına neden olması ve bu sayede topraktaki kirleticilerin *in situ* biyoremediasyonunda etkin sonuçların eldesi muhtemeldir.

Pseudomonas bakterileri, özellikle *P. putida* IAA verimini teşvik eden önemli PGPR türlerindendir. Meliani ve ark., (2017), *P. fluorescens* ve *Pseudomonas putida*'nın 0,2 g/L L-triptofan varlığında sırasıyla 89 µg/ml ve 116 µg/ml

konsantrasyonlarında IAA ürettiğini HPLC analiziyle göstermiştir. Ayrıca, *P. putida*'nın salgıladığı yüksek IAA seviyeleri bitki büyümesini arttırmıştır. Abbamondi ve ark., (2016), *A. thaliana*'da kök tüy oluşumunu artıran bütün izolatların IAA üretim testinde pozitif sonuçlar verdiğini, IAA üretimi ile kök tüylerinin gelişiminin uyarılması arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda artan L-triptofan konsantrasyonu ile birlikte *P. putida* izolatlarının IAA üretiminde artış gözlenmiş; 0,5 mg/ml L-triptofan konsantrasyonunda ortalama 6 µg/ml IAA üretimi tespit edilmiştir.

Reaktif oksijen türlerinde artış oksidatif strese neden olur. ROS'un lipid peroksidasyonu, proteinlerin parçalanması ve hücrede DNA hasarı gibi bir dizi zararlı işlemi tetiklediği bilinmektedir. Hücresel hasarı önlemek için SOD aktivitesi ile üretilen ve toksik olan H₂O₂, sonraki reaksiyonlarda H₂O'ya dönüştürülerek ortadan kaldırılmalıdır. SOD, CAT ve POX arasındaki denge O₂ ve H₂O₂ seviyesini belirlemek için çok önemlidir [Sharma ve ark., 2012]. Yüksek antioksidan aktiviteler nedeni ile bitkide daha az ROS birikir ve bunun sonucunda oksidatif hasar azalır. CAT, POX ve SOD gibi antioksidan enzimler zararlı ROS'ların uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır.

Bakteri inokülasyonu sonrası oluşan strese karşı erken bitki tepkisinde, üretilen O₂⁻ genellikle SOD aktivitesi ile hızlıca H₂O₂'ye dönüştürülür. H₂O₂ daha sonra CAT ve POX aktivitesi ile yıkılır. Bu işlem sayesinde bitki hücre duvarı, mikrobiyal penetrasyon ve enzimatik bozulmaya karşı daha dirençli hale gelir [Singh ve ark., 2013]. Bu çalışmada bakteri ile inokülasyonun 3. gününde SOD aktivitesinde görülen artış bitkinin stres direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bakteri ile inokülasyonun 3. gününde SOD aktivitesindeki artışın, 5. günde azalarak kontrol ile aynı seviyede olması, inokülasyonu takiben H₂O₂ miktarında artış görülmemesi; *P. putida* ile inokülasyonun *A. thaliana* bitkisinde ciddi bir biyotik strese neden olmadığını göstermektedir. 3. gün artan SOD aktivitesi sonucu oluşan H₂O₂'nin POX veya diğer enzim aktiviteleri ile yıkılmış olması muhtemeldir.

Nitroaromatik bileşiklerin fitoremediasyonunda transgenik bitkiler kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Tognetti ve ark., (2007) ve Kayıhan ve ark., (2015), tarafından transgenik tütün ile yapılan çalışmalarda, 35 µM ve 70 µM 2,4-DNT'nin detoksifikasyonu incelenmiştir. Tognetti ve ark., (2007), tarafından yapılan çalışmada ise, 30-40 saat sonunda 2,4-DNT konsantrasyonunda ilk azalma gözlenmiş, 40 gün sonunda ortamda 2,4-DNT bulunamamıştır.

Çevresel kirleticilerin etkin bir şekilde parçalanması için yapılan çalışmalarda, sentetik biyoloji kullanılarak oluşturulan heterolog metabolik yolların kullanılması güçlü bir araç haline gelmiştir. Gong ve ark., (2017), doğal olarak hiçbir dönüştürücüsü bulunmayan 1,2,3-trikloropropan (TCP)'nin aerobik mineralizasyonu için sentetik bir degradasyon yolağını kodlayan gen genomuna aktarılmış *P. putida* KT2240 bakterisi kullanarak, TCP'yi mineralize etmişlerdir. Bu çalışmada *Burkholderia cepacia* R34 bakterisindeki 2,4-DNT degradasyonundan sorumlu *dnt* genlerini genomunda taşıyan *P. putida* KT2440 suşu kullanılarak, 2,4-DNT'in etkin degradasyonu bitki-bakteri birlikteliği eşliğinde *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir.

2,4-DNT bitkilerde öldürücü derecede toksiktir. Yoon ve ark., (2006), tarafından yapılan çalışmada, 4 günlük *A. thaliana* bitkileri farklı konsantrasyonlarda 2,4-DNT içeren Petrilere aktarılmış ve 7 gün sonunda kök boyları ölçülmüştür. 1 mg/L ve üzeri 2,4-DNT konsantrasyonunun *A. thaliana* bitkilerinde kök büyümesi için toksik olduğu gösterilmiştir.

Podlipná ve ark., (2015), 200 mg/L 2,4-DNT konsantrasyonunun kenevir, keten, ayçiçeği ve hardal bitkilerinin çimlenmesinde %20-30 azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir. Remans ve ark., (2012), tarafından yapılan çalışmada, bitki-bakteri etkileşiminin büyümeyi artırma ve kirletici degrade etme potansiyeli, 2,4-DNT'ye maruz bırakılan bitkilerin kök büyümesinde meydana gelen gelişme ile gösterilmiştir. 0,5 mg/L 2,4-DNT konsantrasyonunun *A. thaliana* primer kök uzunluğunda ciddi bir azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir. 1 mg/L 2,4-DNT konsantrasyonunda kontrol grubunda primer kökte %80 azalma ile birlikte, lateral köklerde artış görülürken, *Ralstonia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* bakterileri ile inoküle edilen bitkilerde primer kök büyümesinde iyileşme gözlenmiştir. Tez çalışmasında bitki-bakteri etkileşimi aracılığıyla 0,5 mM 2,4-DNT kullanılarak yapılan degradasyon amaçlı denelemelerde; bitkilerin toksisiteye karşı daha hassas olması probleminin üstesinden gelinerek; daha yüksek konsantrasyonlardaki kirleticilerin daha hızlı biyodegradasyonunun mümkün olabileceği gösterilmiştir.

Monti ve ark., (2005), tarafından yapılan çalışmada, *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkileri sırasıyla 2×10^7 CFU/ml ve 2×10^8 CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile inoküle edilmiştir. Çalışmamızda *P. putida* bakterisi ile inoküle edilen *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitkilerinde, bakterinin yüksek konsantrasyonları bitki gelişimine olumsuz etkisi göstermiştir. Yine Monti ve ark., (2005), tarafından yapılan *in vitro* deneylerde *Burkholderia sp.* DNT soyunun *A. thaliana* tohum çimlenmesini inhibe ettiği ve

bitkiler için öldürücü olduğu, 2,4-DNT'yi degrade edebilen *P. fluorescens* RE bakterisinin ise *A. thaliana* ve *N. tabacum* için toksik olmadığı bulunmuştur. *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitki çimlenmesi ve gelişimi üzerine *P. putida*'nın toksik bir etkisi olmadığı bu tez çalışmasında da gösterilmiştir.

P. fluorescens RE bakterisinin 2,4-DNT'yi degrade etme yeteneği sıvı kültürde test edilmiş ve 185 µM 2,4-DNT konsantrasyonu içeren kültürde 56 saat sonunda 92 µM 2,4-DNT, 24 µM 4M5NC bulunarak, başlangıçtaki 2,4-DNT'nin %50'sinin degrade olduğu Monti ve ark., (2005) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Akkaya ve ark., (2018), *Burkholderia cepacia* R34 bakterisine ait *dnt* genleri genomuna aktarılmış EM.DNT ile yaptıkları çalışmada, sıvı kültürde 24 saat sonunda 0,5 mM 2,4-DNT'nin yaklaşık %90'ının metabolize olduğu ve erlen üst sıvısından alınan örnekte 0,11 mM $\pm$ 0,03 mM konsantrasyonunda metabolik bir ürün olan 2H5MQ tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise bitki-bakteri etkileşimi sonrası bitki köklerinde kolonize olan KT.DNT bakterisinin 2,4-DNT'yi degrade etme kabiliyeti sıvı kültürde test edilmiştir. 500 µM 2,4-DNT konsantrasyonu içeren kültürde 2 saat sonunda, toplam 2,4-DNT'nin %31'inin degrade olduğu bulunmuştur. 2,4-DNT miktarındaki azalma ve degradasyon ürünü olan 4M5NC'nin ortamda bulunması degradasyon yolağının işlevsel olduğunu ve bitki köklerine tutunmuş KT.DNT bakterinin degradasyon kabiliyetini sürdürdüğünü göstermektedir. Ayrıca 2 saat gibi bir sürede ortamdaki 2,4-DNT'nin %31'inin bitki köklerinde kolonize olan KT.DNT tarafından degrade edilmesi, bakterinin hızlı ve etkin bir degradasyon yeteneğine sahip olduğuna işaret etmektedir. Elde edilen bu sonuç bitki-bakteri etkileşimlerinin çok sayıda organik ve aromatik kirleticinin çevresel arıtımı için çevreyle-dost, ucuz ve alternatif bir uygulama olarak kullanılma potansiyeline işaret etmektedir.

Bakteriyel aşılama olmadan, kirlenmiş toprağın ıslahı için sadece bitkilerin kullanılması yaklaşımı etkili bir ıslah için yeterli değildir. 2,4-DNT'yi degrade edebilen ve bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin aşılmasının, bitki büyümesini ve 2,4-DNT ile kirlenmiş alanlarda fitoremediasyon potansiyelini arttıracak tahmin edilmektedir. Bulgularımız, geniş kapsamlı çalışmalar için temel oluşturmakta ve çevresel kirleticilerin biyodegradasyonunda bitki-bakteri etkileşimlerini desteklemede önemli bir veri sağlamaktadır.

In vitro doku kültüründen gelen bitkilerin toprağa transferinde abiyotik ve biyotik stresler ve zayıf kök sisteminin neden olduğu transplantasyon şoku sonucu canlılık kaybı görülmektedir. Gosal ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada *in vitro* çoğaltılmış *Chlorophytum borivillianum* bitkisinin *P. indica* ve *P. fluorescens* ile inokülasyonu; sürgün uzunluğu ve lateral köklerde artış, tarlaya aktarım sonrası artan besin alımı ve bitki canlılığı ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmada biyotize edilmiş *A. thaliana* ve *N. tabacum* bitki köklerinde *P. putida* kolonizasyonu gözlenmiştir. *In vitro* biyotizasyon sonrası gövde boyu, bitki ağırlığı ve lateral köklerdeki artış, *P. putida*'nın bitki büyümesi ve gelişimini desteklediğini göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tarla çalışmalarında kullanılabilir. *P. putida* ile biyotizasyonun toprakta bitki sağ kalım oranını, besin alımını ve verimini arttıracakı düşünülmektedir. Lateral köklerdeki artışın toprakta daha fazla besin alımına yardımcı olacağı, gövde ve bitki ağırlığındaki artış ile daha sağlıklı bitkiler elde edileceği muhtemeldir. Bir bütün olarak, sözkonusu tez çalışmasından kazanılan bilgi, biyoremediasyon stratejilerinin, tarımsal verimin ve gıda güvenliğinin etkinliğini arttırmak için PGPR'in saha uygulamalarına etkin bir şekilde uyarlanmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbamondi G. R., Tommonaro G., Weyens N., Thijs S., Sillen W., Gkorezis P., Iodice C., Rangel W. de M., Nicolaus B., Vangronsveld J., (2016), "Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids", *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 3(1), 1–10.
- Aburto-Medina A., Taha M., Shahsavari E., Ball A. S., (2017), "Degradation of the Dinitrotoluene Isomers 2,4- and 2,6-DNT: Appraising the Role of Microorganisms". In: Anjum N. A., Gill S. S., Tuteja N., (2017), "Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants".
- Ahmad F., Husain F. M., Ahmad I., (2001), "Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research". In: Ahmad F., Ahmad I., Pichtel J., (2011), "Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications", *Microbes Microb. Technol. Agric. Environ. Appl.*: 1–516.
- Ahmad P., Umar S., Sharma S., (2010), "Mechanism of Free Radical Scavenging and Role of Phytohormones in Plants Under Abiotic Stresses". In: Ashraf M., Ozturk M., Ahmad M. S. A., (2010), "Plant adaptation and phytoremediation", 1–481.
- Akkaya Ö., Şeker G. M., ÇİFTÇİ Ö. Y., (2019), "Plant Growth Promoting Microbiome Networks". In: Sangeetha J., Thangadurai D., Islam S., (2019), "Beneficial Microbes for Sustainable Agriculture and Environmental Management".
- Akkaya Ö., Pérez-pantoja D. R., Calles B., Nikel P. I., de Lorenzo V., (2018), "The Metabolic Redox Regime of *Pseudomonas putida* Tunes Its Evolvability toward Novel Xenobiotic Substrates", *mBio* 9:e01512-18.
- Ali B., Sabri A. N., Ljung K., Hasnain S., (2009), "Auxin production by plant associated bacteria: Impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L.", *Lett. in Appl. Microbiol.*, 48, 542–547.
- Apel K., Hirt H., (2004), "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373–99.
- ATSDR, (2016), "Toxicological Profile for Dinitrotoluenes".
- Banowetz G. M., Dierksen K. P., Azevedo M. D., Stout R., (2004), "Microplate quantification of plant leaf superoxide dismutases", *Anal. Biochem.*, 332, 314–320.
- Bashan Y., (1986), "Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants", *Soil Biol. Biochem.*, 18(3), 297–301.
- Bashan Y., de-Bashan L. E., Prabhu S. R., Hernandez J. P., (2014) "Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013)", *Plant Soil*, 378, 1–33.

Batool M., (2018), "Determination of Interaction Between *Arabidopsis thaliana* and Putative Endophytic Bacterium Associated With Frasier Photinia", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Beauchamp C., Fridovich I., (1971), "Superoxide Dismutase: Improved Assay and an Assay Applicable to Acrylamide Gels", Analytical Biochemistry, 44, 276–287.

Bewley J. D., Black M., (1994), "Seeds Physiology of Development and Germination". 2th edition Plenum Press, New York, 445 p.

Bhattacharyya P. N., Jha D. K., (2012), "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture", World J. Microbiol. Biotechnol., 28, 1327–1350.

Bradford M. M., (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Brennan T., Frenkel C., (1977), "Involvement of Hydrogen Peroxide in the Regulation of Senescence in Pear", Plant Physiol., 59, 411–416.

Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. & Garrity G.M., (2005), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2, parts A, B and C, Bergey's Man. Syst. Bacteriol. 2, 1–399.

Cakmak I., Marschner H., (1992), "Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves", Plant Physiol., 98, 1222–1227.

Caverzan A., Casassola A., Brammer S. P., (2016), "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress". In: Shanker A., (2016), "Abiotic and Biotic Stress in Plants".

Chahtane H., Kim W., Lopez-Molina L., (2017), "Primary seed dormancy: A temporally multilayered riddle waiting to be unlocked", J. Exp. Bot., 68(4), 857–869.

Chance B., Maehly A. C., (1954), "Assay of catalases and peroxidases", Methods Biochem Anal., 1, 357-424.

Cherian S., Oliveira M. M., (2005) "Transgenic plants in phytoremediation: Recent advances and new possibilities", Environ. Sci. Technol., 39, 9377–9390.

Cunningham S. D., Berti W. R., (1993), "Remediation of Contaminated Soils With Plants: An Overview", In Vitro Cell. Dev. Biol., 29P, 207–212.

Daldal F., Cheng S., Applebaum J., Davidson E., Prince R. C., (1986), "Cytochrome *c*₂ is not essential for photosynthetic growth of *Rhodospseudomonas capsulata*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2012–2016.

Delfan A. S., Etemadifar Z., Bouzari M., Emtiazi G., (2012), "Screening of Novel Bacteriophage Infection in *Pseudomonas putida* Isolated From Potato Disease", Jundishapur J. Microbiol., 5, 550–554.

Doherty S. J., Messan K. S., Busby R. R., Barbato R. A., (2019), "Ecotoxicity of 2,4-dinitrotoluene to cold tolerant plant species in a sub-Arctic soil", International Journal of Phytoremediation, 1–11.

Doty S. L., (2008), "Enhancing phytoremediation through the use of transgenic and endophytes", New Phytol., 179, 318–333.

Duca D., Lorv J., Patten C. L., Rose D., Glick B. R., (2014), "Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions", Antonie van Leeuwenhoek, 106, 85-125.

Dutta S. K., Hollowell G. P., Hashem F. M., Kuykendall L. D., (2003) "Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*", Soil Biol. Biochem., 35, 667–675.

Dworkin M., Foster J. W., (1958), "Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen", J. Bacteriol., 75(5), 592-603.

Eapen S., Singh S., D'Souza S. F., (2007), "Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants" Biotechnol. Adv., 25, 442–451.

EPA., (2008), "Drinking Water Health Advisory for 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene", EPA Document Number: 822-R-08-010, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

EPA., (2014), "Technical Fact Sheet-Dinitrotoluene", EPA Document Number: 505-F-14-010, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

EPA., (2017), "Technical Fact Sheet-Dinitrotoluene", EPA Document Number: 505-F-17-010, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

Fedeson D. T., Saake P., Calero P., Nikel P. I., Ducat D. C., (2018), "Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene in a phototrophic co-culture of engineered *Synechococcus elongatus* and *Pseudomonas putida*", bioRxiv, 404988.

French C. E., Rosser S. J., Bruce N. C., (2001), "Biotransformations of explosives", Biotech. and Genet. Eng. Rev., 18(1), 171–217.

Gill S. S., Tuteja N., (2010), "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", Plant Physiol. Biochem., 48, 909–930.

Gilroy S., Jones D. L., (2000), "Through form to function, root hair development and nutrient uptake", Trends In Plant Sci., 56, 1385.

Gong T., Xu X., Che Y., Liu R., Gao W., Zhao F., Yu H., Liang J., Xu P., Song C., Yang C., (2017), "Combinatorial metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient mineralization of 1,2,3-trichloropropane", Sci. Rep., 7, 112.

Gosal S. K., Karlupia A., Gosal S. S., Chhibba I. M., Varma A., (2010), "Biotization with Piriformospora indica and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponin content of micropropagated *Chlorophytum sp.*", Indian J. Biotechnology, 9, 289-297.

Haffaressas Y., Ayad N., Boussayoud R., Mouffok F., (2018), "Opportunistic Bacteria: *Pseudomonas putida*", Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, Vol 10, No 5, 132-143.

Hartmann A., Rothballer M., Schmid M., (2008), "Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research", Plant Soil 312, 7–14.

Haughn G., Kunst L., (2010), "*Arabidopsis thaliana*, a Model Organism for Molecular Genetic Studies in Plants : How and Why Was Arabidopsis Chosen", Biol. Cut. Edge Concepts, Issues, Can. Res. around Globe, 7–11.

Hayat R., Ahmed I., Sheirdil R. A., (2012), "An Overview of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture". In: Ashraf M., Öztürk M., Ahmad M. S. A., Aksoy A., (2012), "Crop Production for Agricultural Improvement", 9789400741, 1-796.

Hudcova T., Halecky M., Kozliak E., Stiborova M., Paca J., (2011), "Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures", J. Hazard. Mater., 192, 605–613.

Ishiga Y., Ishiga T., Uppalapati S. R., Mysore K. S., (2011), "Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions", Plant Methods, 7, 32.

Johnson G. R., Jain R. K., Spain J. C., (2002), "Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway", J. of Bacteriol., 184, 4219–4232.

Kahlon R. S., (2016), "Pseudomonas: Molecular and Applied Biology".

Kim J., Yu Y-K., Yen F., Bang J., You T., Lee S-S., (2012), "A New Strain of Bacteria Degrading TNT and 2,4/2,6-DNT From Explosives - Contaminated Soil", Atlas J. Biol., 2, 116–124.

Kayıhan D., Kayıhan C., Şah I., Yetiş G., Çelik A., Çiftçi Y. Ö., (2015), "*In vitro* phytoremediation of nitroaromatic pollutants with transgenic plants", 4th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, p. 17, Ankara, Turkey, 27-29 November.

Kloepper J., Schroth M. N., (1981), "Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces", Phytopathology, 71, 590-592.

Kloepper J. W., Gutiérrez-Estrada A., McInroy J. A., (2007) "Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria", Can. J. Microbiol., 53, 159–167.

Koornneef M., Meinke D., (2010), "The development of Arabidopsis as a model plant", *Plant J.*, 61, 909–921.

Küce P., Coral G., Kantar Ç., (2015), "Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene (DNT) by *Arthrobacter sp.* K1 isolated from a crude oil contaminated soil", *Ann. Microbiol.*, 65, 467–476.

Kundu D., Hazra C., Chaudhari A., (2015), "Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene with *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Characteristics, kinetic modeling, physiological responses and metabolic pathway", *RSC Adv.*, 5, 38818–38829.

Lambrecht M, Okon Y., Broek A. V., Vanderleyden J., (2000), "Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions", *Trends In Microbiology*, 8(7), 298-300.

de las Heras A., Chavarría M., de Lorenzo V., (2011), "Association of dnt genes of *Burkholderia sp.* DNT with the substrate-blind regulator DntR draws the evolutionary itinerary of 2,4-dinitrotoluene biodegradation", *Mol. Microbiol.*, 82, 287–299.

Lichtenthaler H. K., Buschmann C., (2001), "Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy", *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, F4.3.1-F4., 1–8.

Lifshitz R., Kloepper J. W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E. M., Zaleska I., (2010) "Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions", *Can. J. Microbiol.*, 33, 390–395.

Lugtenberg B. J. J., Dekkers L., Bloemberg G. V., (2001), "Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization By *Pseudomonas*", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 461–490.

Macek T., Mackova M., Kas J., (2000), "Exploitation of plants for the removal of organics in environmental", *Biology Advances*, 18, 23–34.

Matilla M. A., Ramos J. L., Bakker P. A. H. M., Doornbos R., Badri D. V., Vivanco J. M., Ramos-González M. I., (2010), "*Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation", *Environ. Microbiol. Rep.* 2(3), 381–388.

McSteen P., (2010), "Auxin and monocot development", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–18.

Meliani A., Bensoltane A., Benidire L., Oufdou K., (2017), "Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*", *J. Bot. Sci.*, 6(2), 16–24.

Mohamed Iqbal M. C., Iqbal S. S., (2019), "Remediation of Potentially Toxic Elements Through Transgenic Plants: *In Vitro* Studies and the Way Forward". In: Prasad M. N. V., (2019), "Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids".

- Monti M. R., Smania A. M., Fabro G., Alvarez M. E., Argaraña C. E., (2005), "Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene", Appl. Environ. Microbiol., 71(12), 8864–8872.
- Moon H. S., Nifong J. M., Nicholson J. S., Heineman A., Lion K., van der Hoeven R., Hayes A. J., Lewis R. S., (2009), "Microsatellite-based Analysis of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Genetic Resources", Crop Sci., 49, 2149–2159.
- Nishino S. F., Paoli G. C., (2000), "Aerobic Degradation of Dinitrotoluenes and Pathway for Bacterial Degradation of 2,6-Dinitrotoluene", Applied and Environmental Microbiology, 66, 2139–2147.
- Nishino S. F., Spain J. C., Lenke H., Knackmuss H. J., (1999), "Mineralization of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene in soil slurries", Environ. Sci. Technol., 33, 1060–1064.
- Nowak J., (1998a), "Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants", In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 34, 122-130.
- Nowak J., Asiedu S. K., Bensalim S., Richards J., Stewart A., Smith C., Stevens D., Sturz A. V., (1998b), "From Laboratory to Applications: Challenges and Progress with *in vitro* Dual Cultures of Potato and Beneficial Bacteria", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, 97-103.
- Patten C. L., Glick B.R., (1996), "Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid", Can. J. Microbiol. 42, 207–220.
- Patten C. L., Glick B. R., (2002), "Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system", Appl. and Environ. Microbiol., 68(8), 3795-3801.
- Pilon-Smits E. A. H., Freeman J.L., (2006), "Environmental cleanup using plants: Biotechnological advances and ecological considerations", Front. Ecol. Environ., 4, 203–210.
- Pizarro-Tobias P., Udaondo Z., Roca A. and Ramos J. L., (2015), "Events in Root Colonization by *Pseudomonas putida*". In: Ramos J. L., Goldberg J. B., Filloux A., (2015), "Pseudomonas", Volume 7, New Aspects of Pseudomonas Biology.
- Podlipná R., Pospíšilová B., Vaněk T., (2015), "Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by different plant species", Ecotoxicol. Environ. Saf., 112, 54–59.
- Preston G. M., (2004), "Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*", Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 359, 907–918.
- Quesada M. A., Tigier H. A., Bukovac M. J., Valpuesta V., (1990), "Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases", Physiol. Plant., 79, 623–628.

Radić S., Radić-Stojković M., Pevalek-Kozlina B., (2006), "Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots", J. Plant Physiol., 163, 1284–1292.

Remans T., Thijs S., Truyens S., Weyens N., Schellingen K., Keunen E., Gielen H., Cuypers A., Vangronsveld J., (2012), "Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth", Ann. Bot., 110, 239–252.

Rocheleau S., Kuperman R. G., Simini M., Hawari J., Checkai R. T., Thiboutot S., Ampleman G., Sunahara G. I., (2010), "Toxicity of 2,4-dinitrotoluene to terrestrial plants in natural soils", Sci. Total Environ., 408, 3193–3199.

Rodríguez-Navarro D. N., Dardanelli M. S., Ruíz-Saínz J. E., (2007) "Attachment of bacteria to the roots of higher plants" FEMS Microbiol. Lett., 272, 127–136.

Salice C. J., Johnson M. S., Ilg H. L., Midgeley L. P., McFarland C.A., (2011), "Wildlife Toxicity Assessment for 2,4 & 2,6-Dinitrotoluenes", USAPHC.

Schnoor J. L., Licht L. A., McCUTCHEON S. C., Wolfe N. L., Carreira L. H., (1995), "Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants", Environ. Sci. Technol., 29, 318–323.

Sekmen H. A., Türkan I., Takio S., (2007), "Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*", Physiol. Plant., 131, 399–411.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M., (2012), "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions", Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany, 1–26.

Shimp J. F., Tracy J. C., Davis L. C., Lee E., Huang W., Erikson L. E., Schnoor J. L., (1993), "Beneficial Effects of Plants in the Remediation of Soil and Groundwater Contaminated with Organic Materials", Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 23(1), 41–77.

Sierro N., Battey J. N. D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch MC., Ivanov N. V., (2014), "The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato", Nat. Commun., 5, 1–9.

Singh A., Sarma B. K., Upadhyay R. S., Singh H. B., (2013), "Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities", Microbiol. Res., 168, 33–40.

Snellinx Z., Taghavi S., Vangronsveld J., Van der Lelie D., (2003), "Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: Isolation and characterisation", Biodegradation, 14, 19–29.

Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A.. (2015), "Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses", *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 13561–13578.

Sorenson J., Jensen L. E. & Nybroe O., (2001), "Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies", *Plant and Soil*, 232, 97-108.

Spain J. C., (1995), "Biodegradation of nitroaromatic compounds", *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 523-55.

Suen W., Haigler B. E., Spain J. C., (1996), "2,4-Dinitrotoluene Dioxygenase from *Burkholderia* sp. Strain DNT: Similarity to Naphthalene Dioxygenase", *Journal of Bacteriology*, 178, 4926–4934.

Suen W. C., Spain J. C., (1993), "Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4- dinitrotoluene degradation", *J. of Bacteriol.*, 175(6), 1831–1837.

Şen A., (2012), "Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture". In: El-Missiry M. A., (2012), "Antioxidant Enzyme".

Thijs S., Weyens N., Sillen W., Gkorezis P., Carleer R., Vangronsveld J., (2014), "Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: Isolation and characterization of a military soil", *Microb. Biotechnol.*, 7, 294–306.

Tognetti V. B., Monti M. R., Valle E. M., Carrillo N., Smania A. M., (2007), "Detoxification of 2,4-dinitrotoluene by Transgenic Tobacco Plants Expressing a Bacterial Flavodoxin", 41, 4071–4076.

Valvano M. A., Keith K. E., Cardona S. T., (2005), "Survival and persistence of opportunistic *Burkholderia* species in host cells", *Curr. Opin. in Microbiol.* 8, 99–105.

Vega-Celedón P., Martínez H. C., González M., Seeger M., (2016), "Review: Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria", *Cultiv. Trop.*, 37, 33–39.

Web 1, (2017), <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>, (Erişim tarihi: 20/04/2019).

Web 2, (2018), <http://www.aspb.org/publications/other-aspb-publications/the-arabidopsis-book/>, (Erişim tarihi: 21/04/2019).

Xu J., Jing N., (2012), "Effects of 2,4-dinitrotoluene exposure on enzyme activity, energy reserves and condition factors in common carp (*Cyprinus carpio*)", *J. Hazard. Mater.*, 203–204, 299–307.

Yablonskaya M. I., Gins M. S., Molchanova M. A., (2016), "In Vitro Biotization", *Agronomy and Animal Industries*, 1, 15-20.

Yoon J. M., Oliver D. J., Shanks J. V., (2006), "Phytotransformation of 2,4-dinitrotoluene in *Arabidopsis thaliana*: Toxicity, fate, and gene expression studies in vitro", Biotechnol. Prog., 22, 1524–1531.

Zamioudis C., Mastranesti P., Dhonukshe P., Blilou I., Pieterse C. M. J., (2013), "Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria", Plant Physiol., 162, 304–318.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru ARSLAN 1987 yılında İstanbul’da doğdu. 2005 yılında başladığı Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2009 yılında üçüncülükle tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. Halen Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.