

Nikelce Zengin Topraklardan (Ezine-Çanakkale) İzole Edilen Bakterilerin Bitki Büyüme Teşvik Edici Potansiyellerinin Belirlenmesi

İlke KARAKAŞ^{1*}, Mustafa AY², Furkan ÖZTÜRK¹, Selen KAYA³, Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU⁴

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Gıda Teknolojisi Bölümü, Çanakkale

³Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kocaeli

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale

*Sorumlu Yazar: ilkekarakass@gmail.com

Geliş Tarihi: 16.02.2022 Düzeltme Geliş Tarihi: 25.03.2022 Kabul Tarihi: 28.03.2022

Öz

Bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler (Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)), bitkinin hastalıklara dirençli hale gelmesinde önemli rol oynamaları sebebiyle sürdürülebilir tarım sistemlerine katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada, Çanakkale ili Ezine ilçesinin 6 km kuzeyinde bulunan serpantin yamaçlarında yayılış gösteren *Alyssum pinifolium* (Nyar, T.R. Dudley) bitki köklerinden alınan toprak örneklerinden elde edilen bakteri izolatlarının bitki büyüme teşvik edici potansiyelleri araştırılmıştır. Elde edilen 21 izolatın 16S rDNA analizi ile yapılan tanımlamalarında *Bacillus*, *Priestia* ve *Brachy bacterium* cinslerine ait olduğu saptanmıştır. 21 izolatın PGPR olma potansiyellerini ortaya koymak için in vitro şartlarda azot fikse etme, fosfor çözme yetenekleri, indol-3-asetik asit (IAA), ve siderofor üretme kapasiteleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm izolatların fosfor çözme yeteneği olduğu saptanmıştır. İzolatların fosfor çözme oranları 2.047 µg mL⁻¹ ile 2.600 µg mL⁻¹ arasında bulunmuş olup en yüksek değer *Bacillus toyonensis* NMCC-157'ten elde edilmiştir. 21 izolat için azot fiksasyon özelliği tespit edilememiştir. IAA üretim yeteneği 51.4 µg mL⁻¹ ile 278.5 µg mL⁻¹ arasında ölçülmüş ve en yüksek IAA üretimi *Brachy bacterium nesterenkovii* NY-3 tarafından gerçekleştirilmiştir. İzolatların %47.6'sının siderofor üretim yeteneği olduğu belirlenirken en yüksek siderofor üretimi *B. toyonensis* NMCC-157'ten elde edilmiştir. Araştırma sonuçları, yüksek miktarlarda siderofor, IAA üretimi ve fosfor çözme gibi bitki büyümesini teşvik edici markör özelliklere sahip olan *Bacillus* cinslerinin ekonomik açıdan değerli kültür bitkilerinin yetiştirilmesinde biyogübre olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyogübre, IAA, rizobakteriler, siderofor üretimi.

Determination of Plant Growth Promoting of Bacteria Isolated From Nickel-Rich Soils (Ezine-Çanakkale)

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) contribute to sustainable agriculture systems because they play an important role in making the plant resistant to diseases. In this study, the plant growth promoting potential of bacterial isolates obtained from soil samples taken from plant roots of *Alyssum pinifolium* (Nyar, T.R.Dudley) spreading on serpentine slopes 6 km north of Ezine district of Çanakkale province was investigated. It was determined that 21 isolates obtained belong to *Bacillus*, *Priestia* and *Brachy bacterium* genera in the identifications made by 16S rDNA analysis. Nitrogen fixation, phosphorus dissolving abilities, indole-3-acetic acid, and siderophore production capacities of 21 isolates were determined in vitro to reveal their potential to become PGPR. It was determined that all isolates used in the study had the ability to dissolve phosphorus. Phosphorus dissolution ratios of the isolates were found between 2.047 µg mL⁻¹ - 2.600 µg mL⁻¹, and the

highest value was obtained from *Bacillus toyonensis* NMCC-157. Nitrogen fixation properties could not be determined for 21 isolates. IAA production ability was measured between $51.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $278.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the highest IAA production was achieved by *Brachy bacterium nesterenkovi* NY-3. While it was determined that 47.6% of the isolates had siderophore production ability, the highest siderophore production was obtained from *B. toyonensis* NMCC-157. The results of the research showed that *Bacillus* strains, which have plant growth promoting marker properties such as high amounts of siderophore, IAA production and phosphorus solubilization, have the potential to be used as biofertilizers in the cultivation of economically valuable crop plants.

Key words: Biofertilizer, IAA, rhizobacteria, siderophore production.

Giriş

Gün geçtikçe artan sanayileşme, maden yatakları, arıtma çamurları ve tarımda endüstriyel gübrelerin bilinçsiz kullanılması, toprak faunasının zarar görmesine, bitki hastalıklarının oluşmasına ve yeraltı sularının kirlenmesine neden olmaktadır. Tarımsal üretimin temel amacı artan nüfus için verimli, kaliteli ve sağlıklı besin maddeleri üretmektir. Bu nedenle çevre ve insan dostu üretim sistemlerini içeren, endüstriyel tarım ilaçları ve gübre kullanımını azaltan metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmaların gübre olarak kullanılması ve yeni mikrobiyal kombinasyonların oluşturulması sürdürülebilir tarım sistemlerinde önemli sonuçlar ortaya koymaktadır (Özaktan ve ark., 2015).

Bitki gelişimine katkı sağlayan (PGPR) bakterilerde ilk kez Haas ve Keel tarafından belirlenen üç temel özellik bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla i) konakçı bitkide indüklenmiş sistemik direnç oluşturma, ii) çevresel kolonizasyonda etkinlik ve rekabet gücü oluşturma, iii) patojen organizmalar ile antagonistik etki oluşturmaz. PGPR bakterileri bitkinin havadaki azotu bağlamasına yardım etmeleri, toprakta bulunan ancak bitkilerin faydalanamayacağı kimyasal yapılarda olan besin maddelerini organik asitleri aracılığıyla çözüp bitki tarafından kullanılabilir hale getirmeleri ve bitkiler için gelişimi destekleyen fitohormonları sentezleme yetenekleri nedeniyle tarımsal üretimi geliştirmek ve verimliliği arttırmak için biyogübre olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin tarımda biyogübre olarak kullanılması ile sentetik olarak üretilen kimyasal gübrelere ve ek bitki besin ürünlerine yönelim azalarak sürdürülebilir bir çevre oluşturulacağı düşünülmektedir (Haas ve Keel, 2003).

Bitkilerden elde edilen verimi maksimuma çıkarmakta önemli rol oynayan fosfor ve azot, fotosentez gibi biyokimyasal ve metabolik yolların temel elemanları olması nedeniyle bitkiler için önemli besin elementleridir. Bitkilerin ve mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynayan demiri mineral ve organik bileşiklerden ayırma işleminde çözücü özellikte olan indol-3-asetik asit (IAA) ve sideroforlar PGPR

bakterileri tarafından sentezlenmektedir (Ghavami ve ark., 2016). PGPR bakterilerin etki mekanizmaları ve özellikleri araştırıldığında *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. ve *Pseudomonas* sp. cinslerinin çeşitli tahıl, tütün, çilek, mısır ve pamuk gibi bitkilerde verime olumlu katkı sağladığı belirlenmiştir (Santi ve ark., 2013; Küçük, 2019). Bu bakterilerin salgıladıkları antibiyotikler ile özellikle tahıllarda kök hastalıklarına neden olan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* gibi patojen mikroorganizmaların üremelerini inhibe ederek bitkiye ekstra direnç sağladığı bilinmektedir (Ulloa-Ogaz ve ark., 2015).

Çalışmamızda kullandığımız toprak örneği Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin 6 km kuzeyinde bulunan serpantin kökenli kayaçların bulunduğu yamaçlarda yayılış gösteren *Alyssum pinifolium* bitki köklerinden alınmıştır. Türkiye florasındaki *A. pinifolium* taksonlarının çoğu ağır metal biriktirme yeteneğine sahip olup ekolojik değeri olan bir bitkidir (Esen, 2016). Ezine ilçesindeki incelenen toprak yapısı ve nikel içeriği bu bitkinin gelişimi için önemlidir. Ezine yolu (39.840.276 N, 26.320.107 E) lokalitesinde yapılan bazı toprak analizleri sonucunda bu bölgenin tuzluluk değeri 0.33 dS m^{-1} (tuzsuz), pH'sı 7.52 (düşük alkali), kireç oranı %0.81 (düşük), organik madde miktarı %0.85 (düşük), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), demir (Fe), bakır (Cu), mangan (Mn), çinko (Zn) ve nikel (Ni) miktarları ise sırasıyla; 3.99 kg da^{-1} (düşük), 13.95 kg da^{-1} (düşük), 810 ppm (düşük), 619 ppm (orta), 399 ppm (yüksek), 7.62 ppm (çok yüksek), 0.22 ppm (düşük), 5.44 ppm (orta), 0.17 ppm (düşük) ve 1702 mg g^{-1} (çok yüksek) olarak belirlenmiştir. Bu analizlere ek olarak *A. pinifolium* bitkisinin bulunduğu bölgelerdeki bitki örneklerinin ağır metal olan nikeli bünyelerinde biriktirdiği ve nikel miktarının $1781 \mu\text{g g}^{-1}$ olduğu saptanmıştır (Esen, 2016).

Bu çalışmada, bünyesinde nikel biriktirme yeteneğine sahip *A. pinifolium* bitkisinin köklerinden alınan toprak örneğinden elde edilen izolatların 16S rDNA ile tanımlamaları yapılmış ve *in vitro* koşullarda; i) fosfor çözme kapasiteleri, ii)

siderofor ve IAA üretme yetenekleri, iii) azot fiksasyon kapasiteleri test edilerek PGPR olma potansiyellerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteri İzolasyonu

Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin 6 km kuzeyinde (39.840.276 N, 26.320.107 E) bulunan serpantin yamaçlarında yayılış gösteren *A. pinifolium* bitki köklerinden alınan toprak örneği bakteri izolasyonu için kullanılmıştır. Toprak örneği, %0.9'luk izotonik serum fizyolojik içerisinde süspansiyon edilmiş ve seri dilüsyonlar yapılmıştır. Her bir dilüsyon örneğinden 100 µl alınıp, Nutrient Agar (NA) ve Triptik Soya Agar (TSA) besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılmış ve 30±1°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ seyreltmelerde morfolojik görünümü farklı olan teksel ve temiz görümlü koloniler belirlenerek gelişim gösterdiği besiyerlerine yeniden ekimleri yapıp izolatların saf kültürleri elde edilmiştir. İzolatların saflığının kontrol edilmesi için Gram boyamaları yapılmış ve örnekler ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen saf izolatlar çalışmada kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir (Bozkurt, 2016).

Bakterilerin Tanımlanması

Saf olarak elde edilen izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için; oksidaz, katalaz, indol, sitrat, metil red, Voges-Proskauer (VP) ve hidrojen sülfid testleri yapılmıştır (Bozkurt, 2016). Nutrient Broth (NB) ortamına inkübe edilen izolatların, DNA izolasyonu için uygun olan hücre yoğunluğu sağlandığında DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Genomik DNA izolasyonunda GeneJET Genomic DNA Purification Kiti (K0721, Thermo Scientific) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA geninin analizi için literatür taraması sonucunda en yüksek verimliliğe sahip olduğu düşünülen primer çiftinin sentezi Sentegen Primer 50 nM olacak şekilde yapılmıştır (Çizelge 1). Tür düzeyinde tanımlama için kullanılacak olan 16S rDNA gen bölgesinin çoğaltımında kullanılan PCR bileşenleri laboratuvarımızda yapılan optimizasyon çalışması sonucunda belirlenmiştir (Çizelge 2). Belirlenen bu koşullar ile tüm izolatların 16S rDNA gen bölgesinin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin varlığı, %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiş ve doğrulanması yapılmıştır.

Tür düzeyinde tanımlama yapmak için kullanılmış olan 16S rDNA geninin PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir. Tüm izolatlara ait 16S rDNA geninin ürünleri hizmet alımı yolu ile Medsantek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. firmasında DNA dizi analizleri

yaptırılmıştır. Dizileme ve Fragman Analizi Applied Biosystems marka, 8 kapilerli 3500 cihazı yardımı ile çift yönlü dizileme analizleri yaptırılmıştır. Dizi analizlerinde Sequencing Analysis Software ve Sequencing – SeqScape® Software v2.7 programları ile analizler gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi verisinin karşılaştırılması için kullanılacak olan “referans diziler” NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanları aracılığıyla elde edilmiştir. Tüm izolatların 16S rDNA gen dizi analizleri NCBI, BLASTn uygulaması ile gerçekleştirilmiş ve veri tabanlarındaki dizi benzerlik oranlarına bakılarak her izolatın genetik olarak tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

İzolatların Fosfor Çözme Kapasitelerinin Saptanması

İzolatların fosfor çözme kapasiteleri National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) besin ortamında belirlenmiştir. NBRIP sıvı besiyerinde ön zenginleştirmeye tabi tutulan izolatların, daha sonra NBRIP katı besiyerine nokta ekimleri yapılmıştır. 30±1°C'de 3 günlük inkübasyon sonunda etrafında oluşan şeffaf zonların ölçüldüğü izolatlar pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. İzolatların fosfor çözme katsayıları (Koloni çapı + Zon çapı) / Koloni çapı formülüne göre hesaplanmıştır (Perez ve ark., 2007).

İzolatların Siderofor Üretim Potansiyellerinin Saptanması

İzolatların siderofor üretim potansiyellerinin saptanması için Modifiye Chrome Azurol S agar (MCASA) kullanılmıştır. İzolatlar nokta ekim yöntemi ile MCASA besiyerine ekilmiş ve 28±1°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında izolat etrafında oluşan sarı-turuncu renk pozitif sonuç olarak kaydedilmiş ve zon çapları ölçülmüştür. Elde edilen veriler yorumlanarak bakterilerin siderofor üretme kapasiteleri değerlendirilmiştir (Perez ve ark., 2007).

İzolatların İndol Asetik Asit (IAA) Üretim Potansiyellerinin Saptanması

IAA üretme kapasitelerinin belirlenebilmesi amacıyla izolatlar, NB (%0,1 triptofanlı) ortamında 28±1°C'de 7 gün 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde muhafaza edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından 2 mL alınmıştır. Süpernatant kısmına 4 mL Salkowski ayırıcı ve 2 damla ortofosforik asit damlatılarak çalkalanmış, 20-30 dakika karanlık ortamda renk değişimi için bekletilmiştir. IAA ile hazırlanan 10, 20, 30, 40 ve 50 ppm'lik standartlar UV spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda okunmuştur. Çizilen standart eğriye göre izolatların

IAA üretim kapasiteleri belirlenmiştir (Ahmad ve ark., 2008).

İzolatların Azot Fiksasyon Yeteneklerinin Saptanması

İzolatların azot bağlama potansiyelleri Jensen besiyeri ile belirlenmiştir. Jensen besiyerine

nokta ekimi yapılan izolatlar 7 gün 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim gösteren izolatların azot fikse etme yeteneklerinin olduğu kabul edilip pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Ahmad ve ark., 2008).

Çizelge 1. 16S rDNA'ya ait primer dizileri

Gen	Primerler	Sekans (5'→3')	Referans
16S rDNA	0341f	CCTACGGGGCGCAG	Klindworth ve ark., 2013
	0785r	GACTACGGGTATCTAATCC	

Çizelge 2. 16S rDNA'ya ait PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	µl/Tüp	Son Konsantrasyon
Steril bidistile H ₂ O	17.0	-
10 X Buffer	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2.0	2 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer 341F (10 pmol µl ⁻¹)	0.5	10 pmol 25µl ⁻¹
Primer 785R (10 pmol µl ⁻¹)	0.5	10 pmol 25µl ⁻¹
Taq polimeraz (5U µl ⁻¹)	0.2	1 U 25µl ⁻¹
DNA (150 ng µl ⁻¹)	2.0	300 ng 25µl ⁻¹
Toplam hacim	25.0	

Bulgular ve Tartışma

Bakteri İzolasyonu ve Biyokimyasal Testler

Toprak örneğinden 21 adet Gram (+) izolat (n=18 Basil, n=2 Kok, n=1 Streptobasil) izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlarda endospor yapıları gözlemlenmiş olup 15 izolat oksidaz (+) ve 17 izolat katalaz (+) olarak belirlenmiştir. Tüm izolatların indol test sonuçları (-) olurken; 1 izolat sitrat (+), 18 izolat metil red (+) ve 14 izolat VP (+) olarak saptanmıştır. Ek olarak izolatların hiçbirinde H₂S üretimi kaydedilmemiştir.

İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanımlanması

İzolatların biyoinformatik olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş olup elde edilen tür düzeyindeki tanımlamalar Çizelge 3'te verilmiştir.

Bakterilerin Fosfor Çözme, Azot Fiksasyon, Siderofor ve IAA Üretme Potansiyellerinin Saptanması

İzolatların fosfor çözme, azot fiksasyonu, siderofor ve IAA üretme potansiyellerinin belirlenebilmesi için kantitatif ve kalitatif olmak

üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4'te gösterilmiştir.

Kantitatif deney sonuçları incelendiğinde izolatların fosfor çözebilmeye potansiyellerinin 2.047 µg mL⁻¹ ile 2.600 µg mL⁻¹ aralığında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek fosfor çözme kapasitesi 2N111 (*B. toyonensis* NMCC-157) izolatından ve en düşük fosfor çözme kapasitesi 2T17 (*B. nesterenkovii* NY-3) izolatından elde edilmiştir. Kalitatif sonuçlar ise çalışmada kullanılan 21 izolatın da fosfor çözme yeteneğinin olduğunu göstermiştir. Çetinkaya Yıldız ve Aysan (2014), 39 farklı topraktan izole edilen 499 farklı bakterinin %15'inin fosfor çözme yeteneği olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan birçok farklı çalışmada da PGPR özellikte olduğu düşünülen bakterilerin fosfor çözme yeteneklerinin olduğu ortaya konulmuştur (Özaktan ve ark., 2015). Çalışma sonuçlarındaki farklılıkların izolat türlerinden ve toprakların elde edildiği yerlerin farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların siderofor üretme yetenekleri, yaşam alanlarındaki diğer

mikroorganizmalar ile rekabette önemli avantajlar sağlayan ve bitkilerle iletişimlerini kolaylaştıran önemli bir özelliktir. Siderofor üretim kapasitesi yüksek olan bir bakteri, bitki gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak rol oynamaktadır. Çalışmada kullanılan izolatların %47.6'sının siderofor üretme yeteneği olduğu belirlenmiştir. Siderofor üretim potansiyeli olan bakterilerin zon çapları 11 mm ile 21 mm arasında ölçülmüştür. Siderofor üretiminin en yüksek olduğu izolat 21 mm ile 2NB13 (*B. toyonensis* NMCC-157) olarak tespit edilmiştir.

Ahmad ve ark. (2008), siderofor üretiminin %12.77 ile *Azotobacter* cinsine, %11.11 ile *Pseudomonas* cinsine ve %10 ile *Bacillus* cinsine ait olduğunu bildirmişlerdir. Upadhyay ve ark. (2009) ve Li ve ark. (2017) elde ettikleri izolatların sırası ile 3.5-5.2 mm ve 0.3 mm zon çapı oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamız diğer çalışmalarla kıyaslandığında (Ahmad ve ark., 2008; Upadhyay ve ark., 2009) izolatlarımızın daha yüksek siderofor üretim yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3. Topraktan elde edilen izolatların biyoinformatik analiz sonuçları

İzolat Kodu	En Yakın Eşleşme	Benzerlik Oranı (%)
2N11	<i>Priestia megaterium</i> DY805	99.76
2N110	<i>Bacillus cereus</i> L14	99.29
2N111	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100
2N112	<i>Bacillus cereus</i> L14	99.29
2N12	<i>Bacillus cereus</i> ERI009-FG3-IND	95.53
2N12-2	<i>Bacillus subtilis</i> IMG04	99.29
2N16	<i>Bacillus anthracis</i> APBSWPTB132	99.29
2N17	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100
2N18	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100
2N19	<i>Bacillus cereus</i> L14	99.29
2NB12	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100
2NB13	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100
2NB14	<i>Bacillus pseudomycooides</i> KK16B1_10	99.53
2NB15	<i>Bacillus cereus</i> L14	99.53
2T14	<i>Bacillus pseudomycooides</i> KK16B1_10	99.53
2T17	<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> NY-3	99.05
2TB11	<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> NY-3	99.05
2TB111	<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> NY-3	99.05
2TB112	<i>Bacillus thuringiensis</i> LU3	97.39
2TB12	<i>Bacillus cereus</i> A22	99.76
2TB13	<i>Bacillus toyonensis</i> NMCC-157	100

Oksin grubu hormonlar arasında bulunan IAA, bitkinin kök gelişimini ve besin elementi alımını kolaylaştırmaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin bitki gelişiminde önemli rol oynayan IAA, sitokinin ve diğer hormonları üretebildiği bilinmektedir. Çalışmamızda bütün izolatların IAA üretim yeteneğinin olduğu belirlenirken, en yüksek IAA üretimi 278.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ile 2TB111 (*B. nesterenkovi* NY-3) bakterisinden elde edilmiştir.

Malik ve Sindhu (2011), çalışmalarında elde ettikleri 40 bakteri izolatının IAA üretim yeteneği olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada izolatlar 2 ve 4 gün inkübasyona bırakılarak IAA değerleri ölçülmüş, inkübasyon süresi ile IAA üretim potansiyeli arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir. Özdal ve ark. (2017) ise izole edilen 8 izolat arasından en yüksek IAA değerinin 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda IAA

sonuçlarının diğer çalışmalara kıyasla daha yüksek bulunmasının nedeninin 7 günlük inkübasyon süresi ve değişiklik gösteren bakteri sayısal yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenebilmesi için Jensen besiyerine ekilen 21 izolatın tamamında koloni gelişimi gözlemlenmiştir. Ancak izolatların ekili olduğu besiyerlerinde mavi renge dönüşüm gözlemlenememiştir. Buna ek olarak birkaç izolatın besiyerinde yeşil rengin sarıya döndüğü tespit edilmiştir. Bu durumun nedeni olarak da izolatların besiyerinde pH değişikliğine neden olduğu ancak azot fiksasyon yeteneğinin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Azot fiksasyon yeteneğinin belirlenebilmesi için koloni gelişiminin tek başına yeterli olmadığı bilindiğinden çalışmada

kullanılan 21 izolatın azot fiksasyon yeteneğine sahip olmadığına karar verilmiştir. Shen ve ark. (2016), *Actinidia chinensis* bitkisinin yapraklarından elde ettikleri 17 izolattan en yüksek azot fikse etme potansiyeli olan izolatın *Bacillus amyloliquefaciens* olduğunu belirlemişlerdir. Kaya Özdoğan (2020), ise bitki rizosferlerinden izole edilen ve azot fiksasyon yetenekleri araştırılan 56 izolattan sadece *Paenibacillus polymxa*'nın azot fikse edebildiğini bildirmiştir. Tüm bu literatür bilgileri ile sonuçlarımız değerlendirildiğinde toprak izolatlarının azot fiksasyon yönteminin belirlenmesi için farklı parametreler kullanıldığı görülmüştür. Bu durum PGPR tanısı için olumsuz bir sonuç teşkil etmemekle birlikte daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini göz önüne çıkarmıştır.

Çizelge 4. İzolatların fosfor çözme, azot fiksasyon, siderofor ve IAA üretme potansiyelleri

İzolat Kodu	Fosfor Çözme Potansiyeli	Fosfor Çözme Kapasitesi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Siderofor Zon Çapı (mm)	IAA Miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Azot Fiksasyon Yeteneği
2N11	+	2.128	19	58.5	-
2N110	+	2.133	16	51.4	-
2N111	+	2.600	-	148.2	-
2N112	+	2.300	12	159.8	-
2N12	+	2.137	-	89.9	-
2N12-2	+	2.110	-	87.5	-
2N16	+	2.074	-	60.1	-
2N17	+	2.068	14	59.1	-
2N18	+	2.130	-	53.4	-
2N19	+	2.145	-	108.6	-
2NB12	+	2.315	12	116.0	-
2NB13	+	2.150	21	144.3	-
2NB14	+	2.263	13	69.4	-
2NB15	+	2.230	-	74.9	-
2T14	+	2.194	-	82.3	-
2T17	+	2.047	13	80.1	-
2TB11	+	2.186	11	72.3	-
2TB111	+	2.200	-	278.5	-
2TB112	+	2.080	-	54.8	-
2TB12	+	2.125	-	89.6	-
2TB13	+	2.206	14	118.5	-

Sonuç ve Öneriler

Günümüzde mikroorganizmalardan elde edilen biyogübreler, diğer kimyasal gübrelere kıyasla bitki verimliliğini arttıran ve sürdürülebilir tarıma katkı sağlayan tarımsal bileşenlerdir. PGPR bakterileri doğrudan ve dolaylı olmak üzere çok farklı mekanizmalar ile bitki gelişimini desteklemektedirler. Bu duruma ek olarak bitkinin bulunduğu çevre koşulları, iklim, toprak florası vb. etmenler gelişimi etkileyen faktörlerdir. Bu nedenle bölgeye özgü mikrobiyal floranın ve bu floranın tarım üzerindeki faydalarını belirlemek açısından çalışmamızın öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Çalışmada nikelce zengin *A. pinifolium* bitki türünün yayılış gösterdiği toprak örneğinden potansiyel PGPR olduğu düşünülen toplam 21 bakteri izolati elde edilmiştir. Tanımlanan 21 izolatin %80.9'u *Bacillus* cinsine, %14.3'ü *Brachy bacterium* cinsine ve %4.8'i *Priestia* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin PGPR özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla fosfor çözebilme, azot fiksasyonu, IAA ve siderofor üretebilme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek fosfor çözme kapasitesinin 2.600 µg mL⁻¹ ile 2N111 kodlu *B. toyonensis* NMCC-157'ye, en yüksek siderofor üretim kapasitesinin 21 mm ile 2NB13 kodlu *B. toyonensis* NMCC-157'ye ve en yüksek IAA üretim kapasitesinin ise 278.5 µg mL⁻¹ ile 2TB111 kodlu *B. nesterenkovii* NY-3'e ait olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında elde edilen izolatların bitki gelişimine ve sürdürülebilir tarıma katkı sağlama potansiyellerinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan moleküler tanımlamalar ile mevcut literatür sonuçlarını kıyasladığımızda bu kanımız güçlenmiştir. Özellikle *Bacillus* cinsine ait bakterilerin PGPR markör özellikleri açısından pozitif sonuçlar elde edilmesi nedeniyle bitki gelişimine katkı sunabileceği düşünülmektedir. Bu bakteriler ile yapılacak olan *in vivo* denemelerinin izolatların mikrobiyal biyogübre olarak kullanılabilirliği net olarak göz önüne konulması düşünülmektedir.

Teşekkür: Tübitak 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı'na teşekkür ederim. Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FHD-2020-3449.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Ahmad, F., Ahmad, I. ve Khan, M. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163: 173–181.
- Bozkurt, D. 2016. Bor içeren ortamlarda prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi (Basılmış).
- Çetinkaya Yıldız, R. ve Aysan, Y. 2014. Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bitki büyüme düzenleyici kök bakterileri ile biyolojik mücadelesi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 5: 9-22.
- Esen, O. 2016. Endemik *Alyssum pinifolium* (Nyar) Dudley ve Dianthus ingoldbyi Turritil üzerine koruma biyolojisi çalışmaları. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Ghavami, N., Alikhani, H.A., Pourbabaei, A.A. ve Besharati, H. 2017. Mısır ve kanola bitkilerinin büyümesi ve demir içeriğine iki yeni siderofor üreten kök bakterilerinin etkileri. *Toprak Bilimi ve Bitki Beslenme Dergisi*, 40(5): 736-746.
- Haas, D. ve Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 117–153.
- Kaya Özdoğan, D. 2020. Ankara ili topraklarından bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C. ve Horn, M. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Researches*, doi: 10.1093/nar/gks808.
- Küçük, Ç. 2019. Bitki probiyotik bakteriler: Bitkiler üzerindeki rolleri ve uygulamalar. *Int J. Life Sci. Biotechnol.*, 2(1): 1-15.
- Li, H.B., Singh, R.K., Singh, P., Song, Q., Xing, Y., Yang, L. ve Li, Y. 2017. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Front. Microbiol.*, 8: 1268.

- Malik, D.K. ve Sindhu, S.S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp. effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol Mol Biol Plants*, 17(1): 25–32.
- Özaktan, H., Gül, A., Çakir, B., Yolageldi, L. ve Akköprü, A. 2015. Bakteriyel endofitlerin hıyar yetiştiriciliğinde biyogübre ve biyopestisit olarak kullanılma olanakları. Tubitak-COST 111O505 no'lu Proje kesin raporu.
- Özdal, M., Özdal, O.G., Sezen, A., Algur, O.F. ve Kurbanoglu, E.B. 2017. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. 3. *Biotech*, 7: 23.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M. ve Yarzabal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 2905–2914.
- Santi, C., Bogusz, D. ve Franche, C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.*, 111(5): 743-767.
- Shen, H., He, X., Liu, Y., Chen, Y., Tang, J. ve Guo, T. 2016. A complex inoculant of N₂-fixing, P- and K-solubilizing bacteria from a purple soil improves the growth of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) plantlets. *Front. Microbiol.*, 7: 841.
- Ulloa-Ogaz, A.L., Muñoz-Castellanos, L.N. ve Nevárez-Moorillón, G.V. 2015. Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. The battle against microbial pathogens: basic science, *Technological advances and educational programs*, s. 305-309.
- Upadhyay, S.K., Singh, D.P. ve Saikia, R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr. Microbiol.*, 59(5): 489-496.