

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Noccaea birolmutlui* VE *Bornmuellera kiyakii* ENDEMİK BİTKİLERİNE AİT
BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN TANIMLANMASI**

Yasemin GAYA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKİM 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Noccaea birolmutlui* VE *Bornmuellera kiyakii* ENDEMİK BİTKİLERİNE AİT
BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN TANIMLANMASI**

Yasemin GAYA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKİM 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Noccaea birolmutlui VE *Bornmuellera kiyakii* ENDEMİK BİTKİLERİNE AİT
BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Yasemin GAYA

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez kısmi olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
(TÜBİTAK) 222Z249 numaralı proje ile desteklenmiştir

EKİM 2023

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Noccaea birolmutlui* VE *Bornmuellera kiyakii* ENDEMİK BİTKİLERİNE AİT
BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN TANIMLANMASI**

Yasemin GAYA

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 11/10/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK (Danışman)
Prof. Dr. Ahmet AKSOY
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

ÖZET

***Noccaea birolmutlui* VE *Bornmuellera kiyakii* ENDEMİK BİTKİLERİNE AİT BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN TANIMLANMASI**

Yasemin GAYA

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Ekim 2023; 62 sayfa

Özellikle son yıllarda tarımda kimyasal gübrelerin yoğun kullanımı, nüfus artışı, kuraklık veya verimsiz toprak şartları bitkilerde büyüme ve gelişmeyi giderek zorlaştırmaktadır. Ancak bazı bitki türleri elverişsiz koşullarda da gelişim gösterme yeteneğine sahiptir. Yetersiz besin ve yüksek oranda krom, nikel, alüminyum gibi ağır metalleri içeren serpantin (ultramafik) topraklarda, zorlu ortam koşullarına karşı gelişim gösteren hiperakümülatör bitkiler bunlara örnektir. Hiperakümülatör bitkiler hayatta kalmak için ağır metalleri toprak üstü organlarda biriktirmek de dahil olmak üzere çok çeşitli yöntemler geliştirmiştir.

Bitkinin kök, gövde ve yaprak dokularının içlerinde yer alan ve Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler (PGPB) olarak tanımlanan bakteriler, bitkilerle simbiyotik bir ilişki içinde bulunarak bitkinin gelişimini destekleyen ve ağır metallerin fitotoksik etkilerini azaltan mekanizmalar içermektedir. PGPB antibiyotik üretimi, azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğünün artırılması, siderofor üretimi, indol-3asetik asit (IAA) hormonu ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz üretimi gibi özellikleriyle elverişsiz durumlarda bitkinin gelişimini destekleyen pek çok işleve sahiptir. Bu işlevler sayesinde PGPB'nin tarımda kullanımının, bitkilerin verim ve kalitesini artırmak için geleneksel yaklaşıma göre daha iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

PGPB'nin izole edilip kullanılması artan gıda ihtiyacına karşı üretkenliği, verimi ve gıda kalitesini destekleyen çevreci bir yaklaşımdır. Bu tez çalışmasında serpantin endemiği *Noccaea birolmutlui* Özgişi & Özüdoğru ve *Bornmuellera kiyakii* Aytaç & Aksoy hiperakümülatör bitkilerinden bitki gelişimini olumlu yönde destekleyen endofitik bakterilerin ve rizobakterilerin izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen bakterilerin ACC deaminaz üretimi, siderofor üretimi, fosfat çözme kapasiteleri ve IAA aktiviteleri belirlenerek PGPB özellikleri araştırılmıştır. Bu bakterilerin kurşun, çinko, bakır, nikel, alüminyum, krom ağır metallerine karşı direnç gösterdiği, ayrıca bu bakterilerin çoğunun tetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin ve imipenem antibiyotiklerine karşı zon gelişimlerinin olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda tüm testler birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiş ve kendi içlerinde en iyi PGPB aktivitesi gösteren 38 bakteri suşu moleküler tanımlama yapılmak için seçilmiştir. Bakterilerin moleküler tanımlamaları için hedef gen bölgesi olarak bakteri sistematigi açısından önemli olan 16S rRNA gen bölgesi seçilmiştir. Gerçekleştirilen tanımlamalar sonucunda bakterilerin *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* ve *Priestia* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: ACC deaminaz, *Bornmuellera kiyakii*, Fosfat özünürlüğü, Hiperakümülatör, İndol üretimi, *Noccaea birolmutlui*, PGPB

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ



ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA OF *Noccaea birolmutlui* AND *Bornmuellera kiyakii* ENDEMIC PLANTS

Yasemin GAYA

Master Thesis, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

October 2023; 62 pages

Chemical fertilisers, population growth, water requirements and stressful soil conditions make it increasingly difficult to increase crop yields. Some plant species can thrive under stressful conditions. For example, in serpentine (ultramafic) soils with inadequate nutrients and high levels of heavy metals such as chromium, nickel and aluminium, hyperaccumulator plants thrive and cope well with harsh environmental conditions. Hyperaccumulator plants have the ability to survive by accumulating heavy metals in above-ground organs.

Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), found in the rhizosphere of plants and as endophytes, have mechanisms that promote plant growth and reduce the phytotoxic effects of heavy metals by forming a symbiotic relationship with plants. PGPB have many functions that support plant development, such as production of antibiotics against soil-borne diseases, nitrogen fixation, phosphate dissolution, production of siderophores, production of hormones such as indole acetic acid (IAA), and production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, and reduction of the amount of ethylene that increases under stress conditions. Thanks to these functions, the use of PGPB in agriculture is considered a better alternative to the conventional approach to increase crop yield and quality.

The isolation and use of PGPB is an environmentally friendly approach that promotes productivity, efficiency and food quality in the face of increasing food demand. In this study, endophytes and rhizobacteria that promote plant growth were isolated from endemic hyperaccumulator plants *Noccaea birolmutlui* Özgüşi & Özüdoğru and *Bornmuellera kiyakii* Aytaç & Aksoy. The production of ACC deaminase and siderophores, phosphate solubility and indole acetic acid (IAA) activity, and heavy metal and antibiotic resistance of PGPB properties of the isolated bacteria were investigated. These bacteria were found to be resistant to heavy metals such as lead, zinc, copper, nickel, aluminium and chromium, and most of these bacteria developed inhibition zones against the antibiotics tetracycline, chloramphenicol, kanamycin and imipenem. As a result of the studies, all tests were evaluated independently and 38 bacterial strains with the best PGPB activity were selected. The 16S rRNA gene region, which is important for bacterial systematics, was chosen as the target gene region for their molecular identification. As a result of the identification, the bacteria were found to belong to the genera *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Priestia*.

KEYWORDS: ACC deaminase, *Bornmuellera kiyakii*, Hyperaccumulator, Indole production, *Noccaea birolmutlui*, PGPB, Phosphate solubility

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Asst. Prof. Dr. Tuğba ÖZAKTAŞ



ÖNSÖZ

Küresel ısınma ve iklim değişikliği sürekli artan nüfusla birlikte tarımsal verimin düşmesine neden olmaktadır. Tarımsal verimliliğin artırılabilmesi amacıyla kullanılan kimyasallardaki artış, yenilenemeyen kaynakların kirlenmesine ve dolayısıyla ekosistem üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır. PGPB'ler geliştirmiş oldukları çeşitli mekanizmalarıyla bitkilerin birçok ihtiyacını karşılayarak bitki gelişimine katkı sağlamaktadır. Bu bakterilerin sahip olduğu mekanizmalar sayesinde tarımda kullanılmaları, daha çevreci bir yaklaşım olması açısından, tarımın ayrılmaz bir parçası haline gelmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışma izole edilen ve PGPB aktiviteleri incelenen bakterilerin tarımda biyogübre ve ağır metallerle kirlenmiş arazilerin eski haline getirilmesi için biyoremediasyon çalışmalarında kullanımı için zemin hazırlamaktadır.

Çalışmamın her aşamasında yönlendirici fikirleri ile yardımlarını esirgemeyerek, fikirleri ve düşünceleri ile daima bana yol gösteren sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK'e, (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tezimin temelini oluşturan bitkisel materyalleri temin eden sayın Prof. Dr. Ahmet AKSOY ve Arş. Gör. Uğurcan BARAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), bana her alanda daima destek veren sayın hocam Hasan AKGÜL'e (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve tezime olan katkılarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ'a (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aynı yolda yürüdüğümüz ve benden yardımlarını esirgemeyen, her soruma cevap veren laboratuvar arkadaşlarım Uzman Biyolog Eda DELİK ve Uzman Biyolog Berfin EROĞLU'na, ortak çalışmalarımızda titizlik ve özveri ile destek olan ve bana her zaman yardım eden arkadaşım Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı yüksek lisans öğrencisi Fikriye Mehtap ŞEN'e ve Akdeniz Üniversitesi sayesinde kazanmış olduğum dostluklardan Ayşe ACAR'a teşekkür ederim.

Gerçekleştirdiğimiz bazı deneylerin optimizasyon basamaklarında tecrübelerini bizimle paylaşmaktan çekinmeyen Öğr. Gör. İlke KARAKAŞ'a (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu), ayrıca bu çalışmayı maddi olarak kısmen destekleyen TÜBİTAK-KBAG'a (proje kodu: 222Z249) teşekkürlerimi sunarım.

Beni sürekli motive ederek yanımda olan Süleyman GÖKÇE ve Emre Cem ERASLAN'a ve hayatın birçok yerinde destekçim olan Umutcan UÇ ve her zorlukta yürümemi sağlayan Cemile HERGÜL'e özellikle teşekkür ederim. Hayatın her alanında bana sonsuz destek olan ve bugüne gelmemi sağlayan, bu tez çalışması boyunca her zorlukta bir arada beni motive ederek ilerleyen sevgili annem Zeliha GAYA ve babam Bünyamin GAYA'ya ve bana hep ışık tutan tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler (PGPB)	3
2.2. PGPB'nin Etki Mekanizmaları	3
2.2.1. PGPB'nin doğrudan etki mekanizmaları	4
2.2.2. Dolaylı etki mekanizması	8
2.3. Hiperakümülatör Bitkiler	10
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkiler.....	12
3.2. Bakteri İzolasyonu.....	12
3.2.1. Rizobakteri izolasyonu.....	12
3.2.2. Endofitik bakteri izolasyonu	12
3.3. İndol Asetik Asit (IAA) Testi.....	12
3.4. ACC Deaminaz Aktivitesi.....	13
3.5. Siderofor Üretimi	13
3.6. Fosfat Çözünürlüğü	14
3.7. Ağır Metal Direncinin Belirlenmesi.....	14
3.8. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi	14
3.9. PGPB Aktivitesi Yüksek Bakterilerin Seçimi.....	15
3.10. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu	15
3.11. İzolatların Moleküler Tanımlanması	16
4. BULGULAR	18

4.1. Bitki Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	18
4.2. İndol Asetik Asit Testi	18
4.3. ACC Deaminaz Aktivitesi.....	22
4.4. Siderofor Üretimi	22
4.5. Fosfat Çözünürlüğü	23
4.6. Ağır Metal Direncinin Belirlenmesi.....	24
4.7. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi	28
4.8. PGPB Aktivitesi Yüksek Bakterilerin Seçimi.....	31
4.9. Seçilen İzolatların Moleküler Tanımlanması	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR	43
7. KAYNAKLAR	46
8. EKLER.....	60
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “*Noccaea birolmutlui* ve *Bornmuellera kiyakii* Endemik Bitkilerine Ait Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakterilerin Tanımlanması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/10/2023

Yasemin GAYA



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Al: Alüminyum

As: Arsenik

Ca: Kalsiyum

Cd: Kadmiyum

Cr: Krom

CK: Sitokin

Cu: Bakır

ET: Etilen

Fe: Demir

GB: Giberellin

$H_2PO_4^-$: Fosforik Asit

HPO_4^{2-} : Hidrojen Fosfat

HCN: Hidrojen Siyanür

N: Azot

NH_3 : Amonyak

Ni: Nikel

Pb: Kurşun

Zn: Çinko

Kısaltmalar

A. courvalinii: *Acinetobacter courvalinii*

ABA: Absisik Asit

ACC: 1-aminosiklopropan-1-karboksilat

B. kiyakii: *Bornmuellera kiyakii*

ETS: Elektron Taşıma Sistemi

IAA: İndol-3-asetik asit

JA: Jasmonik Asit

LPS: Lipopolisakarit

NA: Nutrient Agar

N. birolmutlui: *Noccaea birolmutlui*

PAMP: Patojenle İlişkili Moleküler Modeller

PGPB: Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler

PGPE: Bitki Gelişimini Teşvik Eden Endofitik Bakteriler

PGPR: Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteriler

PSM: Çözündüren Mikroorganizmalar

P. agglomerans: *Pantoea agglomerans*

P. canavaninivorans: *Pseudomonas canavaninivorans*

P. glycinis: *Pseudomonas glycinis*

P. koreensis: *Pseudomonas koreensis*

P. thivervalensis: *Pseudomonas thivervalensis*

M. hydrocarbonoxydans: *Microbacterium hydrocarbonoxydans*

SA: Salisilik Asit

UV: Ultraviyole

VOC: Uçucu organik bileşikler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PGPB'nin bitki büyüme ve gelişmesini teşvik eden doğrudan ve dolaylı etki mekanizmaları	4
Şekil 2.2. Bitkilerde nodül oluşumu ve N fiksasyonu	5
Şekil 2.3. Artan etilen miktarının PGPB tarafından indirgenmesi	7
Şekil 2.4. PGPB'nin biyolojik kontrol mekanizmaları	9
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan bitkiler a) <i>Bornmuellera kiyakii</i> b) <i>Noccaea birolmutlui</i>	18
Şekil 4.2. Bitkilerden izole bakterilerin NA besiyerine ekilmesi	18
Şekil 4.3. İzole edilen endofitik bakterilerin IAA üretimlerine bağlı olarak renk değişimleri a) <i>B. kiyakii</i> ; b) <i>N. birolmutlui</i>	19
Şekil 4.4. MCASA besiyerinde PGPB'lerin siderofor üretimine bağlı olarak turuncu zon oluşturmaları	23
Şekil 4.5. NBRIP besiyerinde bakterilerin fosfat çözmesine bağlı olarak oluşan şeffaf zonlar.....	23
Şekil 4.6. <i>N. birolmutlui</i> bakterilerinin PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA Merdiveni)	34
Şekil 4.7. <i>B. kiyakii</i> bakterilerinin PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA Merdiveni)	34
Şekil 4.8. NBR8 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı bitki türlerinde PGPB'ler tarafından üretilen hormonlar	6
Çizelge 2.2. Patojenlere karşı PGPB'ler tarafından üretilen antimikrobiyal ajanlar	10
Çizelge 3.1. 16S rRNA gen gölgesi için tasarlanan primerler	16
Çizelge 3.2. PZR Reaksiyonu karışımı ve PZR koşulları	16
Çizelge 4.1. <i>N. birolmutlui</i> rizobakterilerinin PGPB aktivitesi	19
Çizelge 4.2. <i>N. birolmutlui</i> endofitik bakterilerinin PGPB aktivitesi	20
Çizelge 4.3. <i>B. kiyakii</i> endofitik bakterilerinin PGPB aktivitesi	21
Çizelge 4.4. <i>B. kiyakii</i> rizobakterilerinin PGPB aktivitesi	22
Çizelge 4.5. <i>N. birolmutlui</i> bitkisinden izole edilen rizobakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)	24
Çizelge 4.6. <i>N. birolmutlui</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)	25
Çizelge 4.7. <i>B. kiyakii</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)	26
Çizelge 4.8. <i>B. kiyakii</i> bitkisinden izole edilen rizobakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)	27
Çizelge 4.9. <i>N. birolmutlui</i> bitkisinden izole edilen rizobakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)	28
Çizelge 4.10. <i>N. birolmutlui</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)	29
Çizelge 4.11. <i>B. kiyakii</i> bitkisinden izole edilen rizobakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)	30
Çizelge 4.12. <i>B. kiyakii</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)	31
Çizelge 4.13. <i>B. kiyakii</i> bitkisinden izole edilen rizobakterilerin PGPB puanlaması	32
Çizelge 4.14. <i>N. birolmutlui</i> bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin PGPB puanlaması	33

Çizelge 4.15. <i>N. birolmutlui</i> endofitik bakterilerinin kimlik tanımlaması.....	35
Çizelge 4.16. <i>N. birolmutlui</i> rizobakterilerinin kimlik tanımlaması.....	35
Çizelge 4.17. <i>B. kiyakii</i> endofitik bakterilerinin kimlik tanımlaması	36
Çizelge 4.18. <i>B. kiyakii</i> rizobakterilerinin kimlik tanımlaması	36



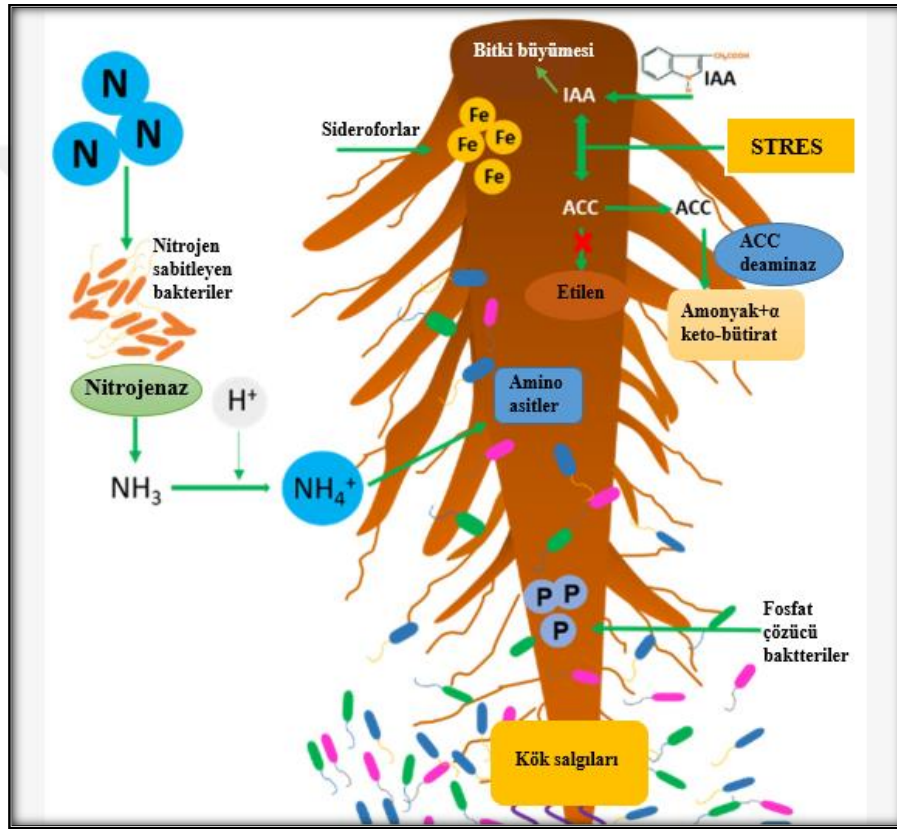
1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artmasıyla doğru orantılı olarak gıda talebi de sürekli artmaktadır; bu durum da tarımda sürekliliğin önemini vurgulamaktadır (Glick 2012; Borrelli vd. 2017). Tarımda üretimin devamlılığı bitki sağlığı, ağır metaller, tuzluluk, radyasyon, besin eksiklikleri, aşırı pH ve patojenler gibi stres faktörlerine doğrudan bağlıdır. Bu streslerle birlikte iklim değişikliği, sel olayları, kuraklık ve sıcaklığın artması abiyotik streslerin daha da yoğun hissedilmesine sebep olarak, mahsullerin kalitesinde ve veriminde azalmaya neden olmaktadır (Sönmez vd. 2008). Zamanla meydana gelen yüksek gıda talebinin giderilmesi için bitkilerin ihtiyacı olan demir (Fe), fosfor (P) ve azot (N) gibi besinlerin sağlanması ve çeşitli patojenlerin geliştirdiği hasarların önlenmesi gerekmektedir (Urano vd. 2010). Mahsul verimliliğini arttırmak için kullanılan gübreler, böcek ilaçları ve çeşitli kimyasallar çevre sağlığı için büyük bir tehdit haline gelmiştir. Özellikle patojenlere karşı kullanılan pestisitlerin az bir kısmının hedef organizmaya ulaşırken geri kalanının büyük oranda çevreye salındığı bilinmektedir (Hartmann vd. 2008). Benzer şekilde bitkinin gelişimini destekleyen kimyasal gübrelerin kullanımı da toprakta özellikle ağır metallerin birikimine ve dolayısıyla da çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Hiltner 1904; Hartmann vd. 2008). Tarım uygulamalarının yanı sıra sanayileşme ve madencilik faaliyetleri sonucunda krom (Cr), nikel (Ni), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), alüminyum (Al) ve bakır (Cu) gibi ağır metaller de bitki bünyesinde birikerek tüm canlı grupları üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır (Ahemad ve Malik 2011; Wang vd. 2017). Bu nedenlerden dolayı daha çevreci yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Çevreci yaklaşımlardan birisi de toprakta bulunan yüksek konsantrasyonlardaki ağır metalleri bünyesinde biriktirerek gelişim gösteren hiperakümülatör bitkilerin kullanımıdır (Rascio vd. 2011; Pollard vd. 2014). Hiperakümülatör bitkiler ağır metal toksisitesini azaltmak için alg, mantar, protozoa ve bakteri gibi çeşitli mikroorganizma grupları ile sürekli etkileşim halindedir. Bitki bünyesinde bulunan bakteriler bitkinin büyüme ve gelişimini destekleyen, bitkinin patojenlere karşı daha dirençli olmasını sağlayan mikroorganizma gruplarıdır (Charlotte vd. 2022; Swoboda vd. 2022). Bitki ile etkileşim halinde olan bu mikroorganizmalar 1978 yılında “Bitki Büyümesini Teşvik Eden Bakteriler” (Plant Growth Promoting Bacteria-PGPB) olarak tanımlanmıştır (Kloepper 1978; Lugtenberg ve Kamilova 2009).

PGPB, bitki ile sürekli etkileşim halinde olarak ilgili bitkinin gelişimine destek olmaktadır. Bitkiler tarafından salınan aldehit, keton, ester gibi uçucu organik bileşikler (VOC) aracılığı ile bitki ve bakteri arasında önemli bir iletişim ağı kurulmakta ve bu iletişim ağı sayesinde bakteriler rizosfer çevresine toplanarak bu bölgelerde kolonize olmaktadır (Saraçlı 2006; Danhorn vd. 2007). Bitki gelişimini destekleyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* ve *Azotobacter* gibi bakteri cinslerine ait çeşitli türler bitkide bulundukları yere göre rizobakteri ve endofitik bakteri olarak tanımlanmaktadır (Paul 2014; Pathan vd. 2020). Rizosfer çevresinde bulunan bakteriler “Bitki Gelişimini Destekleyen Rizobakteriler” (Plant Growth Promoting Rhizobacteria-PGPR) olarak tanımlanırken, bitki köklerinde oluşan çatlaklardan kök, gövde ve yaprak gibi doku içlerine girerek burada faaliyet göstermeye başlayan bakteri grupları ise “Bitki Gelişimini Destekleyen Endofitik Bakteriler” (Plant Growth Promoting Bacterial Endophytes-PGPE) olarak tanımlanmaktadır (Lugtenberg ve Kamilova 2009; Santyo vd. 2016). PGPE’nin dış ortamdaki streslere daha az maruz kaldıkları için bitki gelişimini

desteklemede diğerlerine göre daha etkili bakteri grupları olduğu bilinmektedir (Kloepper 1978; Lugtenberg ve Kamilova 2009).

PGPB, doğrudan ve dolaylı mekanizmalar ile bitki gelişimine destek olmaktadır. Bu etkiler genel olarak bitki hormon seviyelerinin dengelenmesi, N fiksasyonu, siderofor ve organik asit üretimi ile Fe alımını artırma, 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz üretimi ile strese karşı tolerans, İndol-3-asetik asit (IAA) üretme ve fosfat çözme kapasitesi olarak sıralanabilir (Berg vd. 2013; Domka vd. 2020; Hazotte vd. 2020). Ayrıca PGPB sadece besin ihtiyaçlarının karşılanmasıyla kalmayıp, patojenlere karşı antimikrobiyal ajanların üretimi ile de patojen bakterilerle savaşarak bitki gelişimini desteklemektedir (Şekil 1.1) (Visioli vd. 2015).



Şekil 1.1. PGPB'nin biyokimyasal aktiviteleri ve rizosferle etkileşimleri (Vocciante vd. 2022'den uyarlanmıştır)

Bu çalışmada hiperakümülatör ve endemik *Nocceae birolmutlui* Özgişi & Özüdoğru (Kızıldağ-Şarkikaraağaç, Isparta) ve *Bornmuellera kiyakii* Aytaç & Aksoy (Kızıldağ-Derebucak, Konya) bitki türlerinden bitki büyümesini teşvik eden endofitlerin ve rizobakterilerin saf kültürleri elde edilerek; bu bakterilerin bitki büyüme ve gelişiminde rol alan siderofor, ACC deaminaz, fosfat çözme kapasitesi ve IAA üretimi gibi biyokimyasal aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatların tümünün ağır metal ve antibiyotik direnç profilleri belirlenmiş, izolatlar arasından en iyi PGPB aktivitesi gösterenler seçilmiştir ve seçilen bakterilerin tanımlanmaları 16S rRNA gen bölgeleri kullanılarak yapılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler (PGPB)

Toprak çeşitli makro ve mikroorganizmaları içeren zengin bir ekosistemdir. Bu canlı grupları bitkilerle sürekli etkileşim halinde olduklarından bitkiler için yararlı veya patojenik olabilmektedir (Pathan vd. 2020). Bitki bünyesinde bulunan bazı bakteriler olumsuz şartlara karşı N fiksasyonu, hormon üretimi, Fe ve P gibi besin elementlerinin bitki tarafından alımını kolaylaştırarak bitki büyümesine destek olmaktadır. Bu bakteri grupları için “Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler” (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria) ifadesi kullanılmaktadır. PGPB olarak tanımlanan bakteriler bitkide bulundukları yere göre endofitik ve rizobakteri olarak iki gruba ayrılmaktadır (Kloepper 1978; Lugtenberg ve Kamilova 2009).

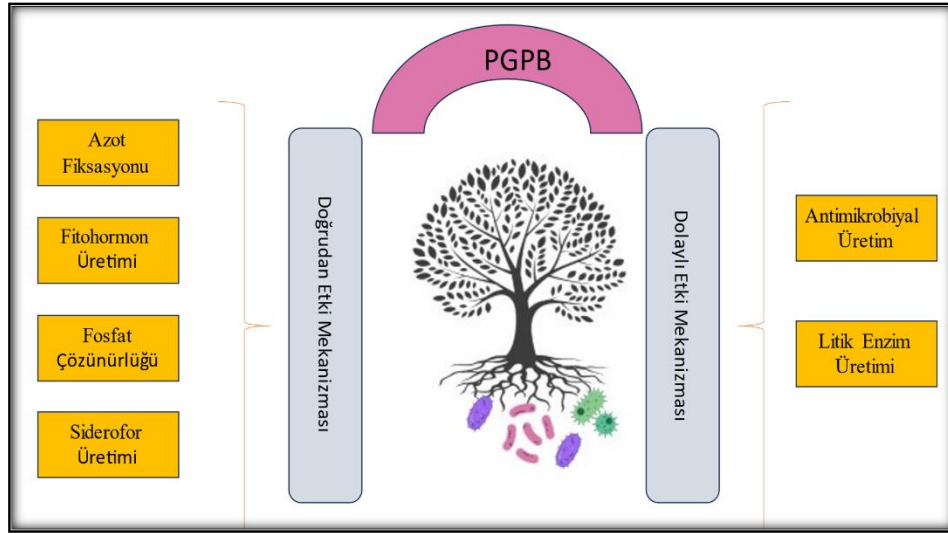
Rizosferler kök salgılarına bağlı olarak mikrobiyal aktivitenin ve çeşitliliğin bol olduğu bir ortamdır. Organik asitler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli kök salgıları rizobakteriler için sinyal olarak algılanır ve bakteriler kemotaktik hareketlerle rizosferlerde kolonize olarak popülasyonlarını arttırmaktadır (Hiltner 1904; Hartmann vd. 2008). Bitki büyümesini destekleyen, kök bölgesinde başarılı bir şekilde kolonize olan, yüksek adaptasyon ve rekabet yeteneğine sahip bu bakteriler bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak isimlendirilmektedir (Kloepper 1978; Hayat vd. 2010; Masciarelli vd. 2014).

Rizosferde belirli bir popülasyon oluşturduktan sonra bitki hücrelerinin içlerine yerleşen bakteriler ise “Bitki Büyümesini Teşvik Eden Endofitik Bakteriler (PGPE)” olarak adlandırılmaktadır. Endofitik bakteriler yüzeyi sterilize edilmiş kök, gövde, yaprak ve meyve dokularının içlerinden izole edilmektedir (Santyo vd. 2016). PGPE’nin doku içlerine yerleşmesi pasif ve aktif olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. (Hardoim vd. 2008). PGPE bitkilerin kök uçları veya patojenler tarafından bitki bünyesinde oluşturulan çatlaklardan pasif penetrasyon ile bitki dokularında kolonize olabilirken, aktif penetrasyonla da tip IV pili, çevreyi algılama sistemi (Quorum Sensing) ve bitki hücre duvarını parçalayan çeşitli enzimlerin salgılanması ile bitki dokularına yerleşebilmektedirler (Duijff vd. 1997; Dörr vd. 1998).

PGPB konakçı bitkide hastalık belirtileri göstermeden fitohormon üretimi, fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz ve siderofor üretimi, patojenlere karşı litik enzim ve antimikrobiyal üretim yaparak bitkinin büyüme ve gelişmesini destekleyen mekanizmalar içermekte ve bu mekanizmalar ile konakçıları için rekabet ve değişen koşullara karşı daha stabil bir ortam sunmaktadırlar (Welbaum vd. 2004; Eid vd. 2019).

2.2. PGPB'nin Etki Mekanizmaları

PGPB doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki etki mekanizması ile bitki büyümesini teşvik etmektedir (Şekil 2.1). Doğrudan etki mekanizması fitohormon üretimi, azot fiksasyonu, siderofor üretimi gibi bakteriyel özellikler kullanılarak bitkinin büyümesini doğrudan destekleyen mekanizmalardır. Dolaylı etki mekanizması ise bitki patojenlerinin gelişimlerini engelleyen etki mekanizmalarıdır (Aioub vd. 2022).

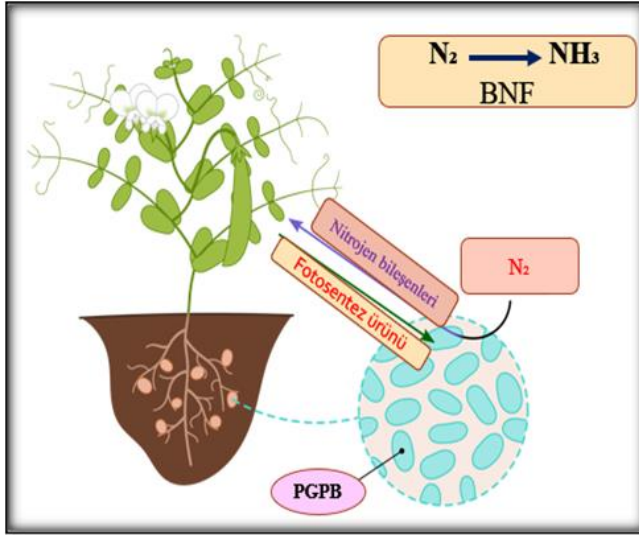


Şekil 2.1. PGPB’nin bitki büyüme ve gelişmesini teşvik eden doğrudan ve dolaylı etki mekanizmaları (Aioub vd. 2022’den uyarlanmıştır)

2.2.1. PGPB’nin doğrudan etki mekanizmaları

2.2.1.1. Azot (N) fiksasyonu

N atmosferde en çok bulunan bileşenlerden biridir. Nükleotit ve peptid gibi yapılarda rol alan tüm canlı grupları için önemli bir makro besindir. N atmosferde fazlasıyla bulunmasına rağmen özellikle bitkiler için doğrudan kullanımı söz konusu değildir (Baas vd. 2014). Azotu kullanılabilir bir hale dönüştürmek için ortamdaki gaz formunu (N_2) nitrojenaz enzimi ile amonyağa (NH_3) kadar indirgenmesi şarttır (Xu vd. 2012). İndirgenme sürecinde serbest ve simbiyotik olarak N sabitleyen mikroorganizmalar görev almaktadır. Bitki köklerinde simbiyotik olarak yaşayan bakterilerin oluşturduğu nodüller sayesinde N indirgenmektedir ve bu olaya “biyolojik nitrojen fiksasyonu” adı verilmektedir (Şekil 2.2) (Sulieman vd. 2022). Özellikle nodül oluşumunun gerçekleştiği baklagiller, N bağlama kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı tuzlu ve verimsiz topraklarda, bu toprakların geri kazanılması amacı ile kullanılmaktadır (Maikhuri vd. 2016; Abdelrahman vd. 2017).



Şekil 2.2. Bitkilerde nodül oluşumu ve N fiksasyonu (Baas vd. 2014'ten uyarlanmıştır)

2.1.1.2. Fitohormon üretimi

Fitohormonlar bitki büyüme ve gelişimini doğrudan etkileyen organik bileşiklerdir. Oksin, giberellin (GB), sitokin (CK), etilen (ET), absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) gibi hormonlar bitkiler ve bakteriler tarafından üretilen sinyal molekülleridir. Bu moleküller sayesinde doku gelişimi, kök oluşumu, meyve olgunlaşması, fototropizm ve strese tolerans sağlanmaktadır (Ramprasad vd. 2014; Khan vd. 2023).

Bitkinin maruz kaldığı stresler sonucunda bitki büyüme ve üretkenliğinde önemli düşüşler meydana gelebilmektedir (Khan vd. 2023). Örneğin, tuz stresi sonucunda hücrenin iyonik ve ozmotik dengesi değişerek bitkide su eksikliği görülürken; Pb ve Cd gibi ağır metal toksisitesi de bitkinin verimini engelleyen önemli faktörlerden biridir. Bitkiler ürettikleri hormonlar aracılığıyla bu değişen ortam şartlarına karşı tolerans gösterebilmekte ve PGPB tarafından üretilen ya da üretilmesi engellenen hormonlarla da bitkilerin strese toleransları önemli ölçüde artmaktadır (Khan vd. 2023). Çizelge 2.1'de de belirtildiği gibi bitki ve PGPB tarafından salgılanan hormonlar, bitkide çeşitli uyaranlara karşı hücrel düzenlemeleri yapan haberciler olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Farklı bitki türlerinde PGPB’ler tarafından üretilen hormonlar (Ramprasad vd. 2014)

PGPB	Üretilen fitohormon	Bitki	Kaynak
<i>Azospirillum lipoferum</i>	GB	Buğday	Marulanda vd. (2009)
<i>Micrococcus luteus</i>	CK	Mısır	Raza ve Faisal (2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	SA	Mısır	Islam vd. (2016)
<i>Serratia sp.</i>	IAA	Buğday	Zaheer vd. (2006)

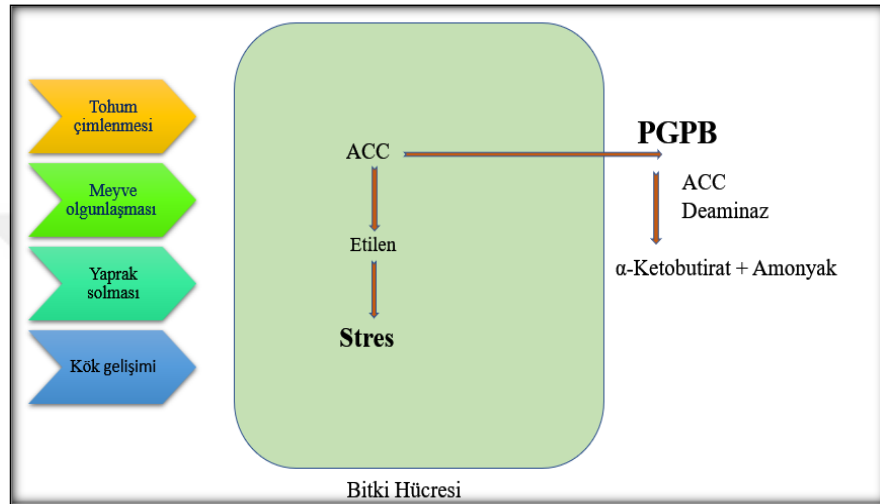
2.1.1.3. Oksin Üretimi

Oksin, bitki gelişimi için önemli bir fitohormondur. Bitkide çimlenme, yaprak oluşumu, kök gelişimi, hücre bölünmesi ve fototropizm, biyotik ve abiyotik strese karşı direncin artmasında etkilidir (Demeneulenaere ve Beckman 2014). Literatürde farklı oksin formları mevcuttur; fakat oksin grubunun en önemlisi olarak kabul edilen IAA bitki büyüme maddesi olarak bitkilerde embriyogenezden yaşlılığa kadar gelişimin her evresinde etkilidir (Glick 2012). Bu hormonun üretimi için bir indol halkası taşıyan L-triptofan amino asidine ihtiyaç vardır. Fakat triptofan üretimi için yüksek enerjiye ihtiyaç duyulduğundan bitki hücreleri tarafından oksin üretimi triptofan dışarıdan sağlandığında gerçekleşebilmektedir (Rose 1968). Birçok PGPB suşunda, IAA’nın biyosentezini kodlayan çok sayıda yolak vardır. Bakteriyel IAA biyosentezi, triptofana bağımlı veya triptofandan bağımsız olabilmektedir. Triptofandan bağımsız yolak henüz tam anlaşılmamıştır ve bu konu ile ilgili bilgiler kısıtlıdır (Patten ve Glick 1966; Duca vd. 2014). Bitkilerle etkileşime giren bakterilerin çoğu, IAA üretme yeteneğine sahiptir ve muhtemelen IAA üretiminin bu bakterilere bazı çevresel avantajlar sağladığı düşünülmektedir (Kim vd. 2011). Örneğin bakterilerde IAA’nın spor oluşumunu, ilaç direncini, biyofilm ve virülans kapasitelerini etkilemesi dolayısıyla mikrobiyal topluluklarda önemli hücreler arası bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Ghosh vd. 2015). Bu sayede IAA üreten bakterilerin pH, sıcaklık, ultraviyole (UV) gibi çeşitli streslere karşı kendilerini koruma ve rekabet avantajı kazandıkları gözlemlenmiştir (Imperlini vd. 2009).

2.1.1.4. 1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat (ACC) Deaminaz Üretimi

Etilen (ET) meyve olgunlaşması, çimlenme, kök ve sürgün gelişimi gibi etkileri nedeniyle bitkilerin gelişimi için elzem bir hormondur (Saikia vd. 2018). Ancak bu etkiler konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir (Ali ve Kim 2018). Bir ET öncüsü olan ACC, bitkinin ağır metal, yüksek sıcaklık, tuzluluk, UV ve patojen hasarı gibi streslere maruz kaldığı durumlarda etilen konsantrasyonunu arttırmaktadır (Etesami ve Maheshwari 2018; Goswami ve Deka 2020). Bu artışa bağlı olarak bitkide yaşlanma, yaprak dökülmesi, kloroz ve kök oluşumunun engellenmesi gibi süreçlerle bitki büyümesi engellenmektedir (Yim vd. 2013). Artan ET miktarına karşı PGPB’ye ait ACC deaminaz enzimlerinin ACC’yi α -ketobütirat ve amonyağa indirgemesi sonucunda ortamdaki ACC konsantrasyonunun ve dolayısıyla ET miktarının azalması sağlanmaktadır (Şekil 2.3) (Toklikishvili vd. 2010; Glick 2014). Artan ET konsantrasyonunun azalmasıyla

birlikte bitkinin içinde bulunduğu stres durumu da ortadan kalkmaktadır. *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Achromobacter* cinslerine ait türlerin ACC deaminaz enzimi ürettiği bilinmektedir (Paul 2014). Yapılan çalışmalarda sarımsaktan izole edilen *Paenibacillus* sp. ve *Phaseolus vulgaris* bakterilerinin ACC deaminaz üretimi ile tuzluluk stresini azalttığı rapor edilmiştir (Gupta ve Pandey 2019). Aynı şekilde tuz stresine maruz kalan pirinç bitkilerinin *B. pumilus* J1Z13 suşu ile aşılmasından sonra fide gelişiminin, aşılınmayanlara kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir (Wang ve Zhang 2023). Bu da ACC deaminaz aktivitesi bulunan PGPB'nin kullanımının tarım için umut vaat edici bir yaklaşım olduğunun altını çizmektedir (Gupta ve Pandey 2019).



Şekil 2.3. Artan etilen miktarının PGPB tarafından indirgenmesi (Olanrewaju vd. 2017'den uyarlanmıştır)

2.2.1.5. Siderofor Üretimi

Demir (Fe) birçok organizma için oksijen metabolizması ve DNA-RNA sentezi gibi temel hücresel süreçlerde rol alan ve yeryüzünde yüksek oranda bulunan elementlerden biridir (Briat vd. 1995; Adhikari vd. 2006). Fakat tıpkı N gibi doğrudan kullanımı zordur (Petrik vd. 2017). Toprakta Fe, oksitlenmiş Fe (III) formundadır ve hücrelerin kullanabilmesi için Fe (II)'ye indirgenmesi gerekmektedir (Grobelak ve Hiller 2017). Bu yüzden bitkiler ve çeşitli mikroorganizma grupları Fe ihtiyaçlarını karşılamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Neilands 1995; Bellenger vd. 2008). PGPB'nin ürettiği siderofor adı verilen organik bileşikler ile ortamdaki Fe (III) indirgenir ve böylelikle bitkilerin Fe ihtiyacı da karşılanmış olur (Grobelak ve Hiller, 2017). Siderofor molekülleri yalnızca Fe ile sınırlı kalmayıp Zn, Cu, Ni gibi hücre hasarına neden olan ağır metalleri de bağlayarak bitki köklerinden uzaklaştırmaktadır (Perry vd. 2015). Siderofor molekülleri hücrelerde büyümeyi desteklerken aynı zamanda diğer organizmalarla Fe rekabetine girerek bitki köklerindeki patojenlerin biyokontrolünde de görev almaktadır (Das vd. 2007).

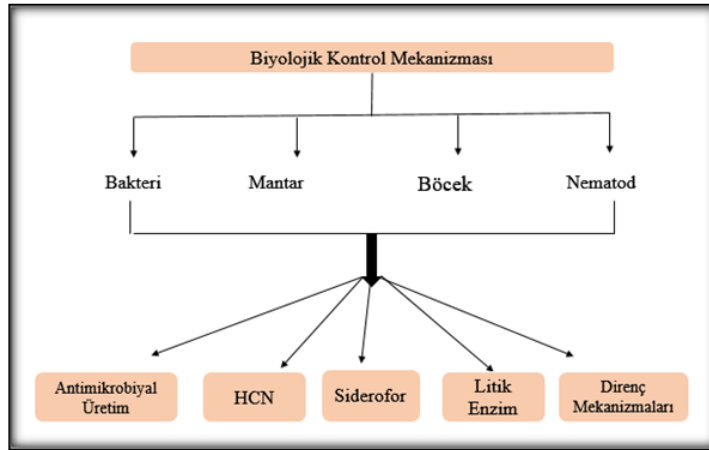
2.1.1.6. Fosfat Çözünürlüğü

Fosfat nükleik asit, ATP ve fosfolipit gibi önemli moleküllerin yapı taşı ve hücrel faaliyetlerden sorumlu bir makro besindir. Bitki hücrelerinde de kök, tohum oluşumu, çiçeklenme gibi bitki büyüme ve gelişmesinden sorumlu sınırlayıcı bir bileşendir (Oelkers ve Valsami, 2008). Bitkiler ihtiyacı olan fosfatı ana kayanın ayrışması ile elde edilen inorganik fosfat ve çürümüş bitki, hayvan veya mikroorganizmalardan elde edilen organik fosfat olarak topraktan almaktadır.

Toprakta hidrojen fosfat (HPO_4^{2-}) ya da fosforik asit (H_3PO_4) formunda bulunan fosfat grupları bitkiler tarafından alınabilmektedir. Ancak fosfatın %80'den fazlasının Al, Ca ve Fe gibi katyonlarla bağlanması fosfatı bitkiler tarafından kullanılamayan, çözünmesi zor bir form haline getirmektedir (Mohamed vd. 2019). PGPB tarafından üretilen oksalik asit, glukonik asit, laktik asit, formik asit, malik asit, süksinik asit gibi çeşitli organik asitler toprak pH'sının dengelenmesini sağlamakta ve bitkilerin ihtiyacı olan fosfatı Al, Ca ve Fe gibi katyonlardan çözerek kullanılabilir hale dönüştürmektedir (Tandon vd. 2020; Bedine vd. 2022). Böylelikle birçok metabolik süreçte kullanılan fosfat ihtiyacı karşılanmış olmaktadır. *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Enterobacter* türleri tarafından üretilen oksalik, malik, formik ve sitrik asitin topraktaki inorganik fosfatın çözünmesini sağlayarak bitki gelişimini desteklediği bilinmektedir (Chen vd. 2006; Trivedi vd. 2008). Aynı zamanda *Bacillus* sp.'lerin %80'i, *Pseudomonas* sp.'lerin %55,56'sı ve *Azotobacter* sp.'lerin %74,47'sinin fosfat çözme yetenekleri ile bitki gelişimini teşvik ettikleri gösterilmiştir (Ahmad vd. 2008).

2.2.2. Dolaylı etki mekanizması

Bitki hastalıkları, böcek istilası, yabancı otlar ve abiyotik stres koşulları tarımda verimi kısıtlayan en önemli sorunlar arasında yer almaktadır. Bu stres etmenlerine karşı mahsul kaybını engellemek için zirai ilaçlar sıklıkla tercih edilmekte bu da beraberinde gıdalarda pestisit kalıntısı ile toprak ve yer altı sularında kirliliği getirmektedir (Pathan vd. 2020). Ek olarak pestisitlerin sürekli kullanılması patojenik mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanmasına neden olarak bir başka önemli toplumsal tehdidi de güçlendirmektedir (Welbaum vd. 2004; Eid vd. 2019). Bitki patojene maruz kaldığında bitkinin direnç mekanizmasının aktif hale gelmesi ile PGPB uyarılmaktadır. Bu uyarılma sonucunda PGPB tarafından hidrojen siyanür (HCN), litik enzim, siderofor ve antimikrobiyal ajanların üretimi ile bitki patojenlerinin gelişimi engellenmektedir (Şekil 2.4) (Geiger vd. 2010; Sehwat vd. 2022).



Şekil 2.4. PGPB'nin biyolojik kontrol mekanizmaları (Sehrawat vd. 2022'den uyarlanmıştır)

2.2.2.1. Antimikrobiyal Ajan ve Litik Enzim Üretimi

Rizosferde bulunan besin kaynakları çeşitli mikroorganizma grupları tarafından rekabetin odak noktası haline gelmektedir. Mikroorganizmalar kendilerini korumak, rekabet ettikleri mikroorganizmaları yok etmek ve farklı yaşam alanlarında canlılığını devam ettirebilmek için diğer mikroorganizmaların hücre duvarının, hücre zarının, protein ve nükleik asit sentezinin bozulmasını sağlayacak antimikrobiyal ajanlar üretmektedir (Whipps 2001; Zhang vd. 2020; Zhuang vd. 2021). Yapılan çalışmalarda *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsi PGPB'lerin fitopatojenlere karşı 2,4 diasetilfloroglusinol asit, fenazin-1-karboksilik asit, fenazin-1-karboksamid, piroluteorin, pirolnitrin ve oomisin gibi birçok antimikrobiyal ajan ürettiği tespit edilmiştir (Çizelge 2.2) (Compnat vd. 2015).

PGPB'ler ürettikleri antimikrobiyal ajanlar sayesinde geniş bir biyokontrol aktivitesine sahiptir fakat her zaman belirli bir patojen türünün farklı genotiplerini inhibe edemeyebilir (Xue vd. 2013). PGPB'lerin sağladıkları biyokontrolün başarısı rizosferdeki diğer bakterilerle rekabetine, konağı olduğu bitkinin yaşı ve türüne, nem, sıcaklık ve pH gibi ortam şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Van der Putten vd. 2006).

Toprak kaynaklı patojenleri kontrol etmenin bir diğer yolu ise litik enzim üretimidir. PGPB'ler kitinaz, selüloz, β -1,3 glukanaz, lipaz ve proteaz gibi enzimler sayesinde mikroorganizmaların hücre duvarını parçalayarak hücre bütünlüğünü bozabilmektedir (Husson vd. 2017; Vaddepali vd. 2017). Birçok PGPB'nin bu enzimlerden birkaçını aynı anda üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Litik enzimlerin üretimi, mikroorganizmaların hücre duvarının parçalanmasının yanı sıra bakterilerin bitki endofitlerine yerleşmesine de yardımcı olmaktadır. Örneğin, tohum içerisinde bulunan PGPB'lerin nişastayı kullanabilmek ve tohumların içinde uzun süre hayatta kalabilmek amacıyla amilaz aktivitesini kullandığı görülmektedir. Ayrıca litik enzimlerin bakteriyel biyofilmlerin oluşumuna da yardımcı olduğu bilinmektedir (Khalaf ve Raiza 2016). Ek olarak PGPB'ler ürettikleri enzimler sayesinde bitki dokularında daha iyi kolonize olmakta ve böylece bitkiyi biyotik ve abiyotik streslere karşı daha iyi korumaktadır (Vaddepali vd. 2017). Örneğin, *B. subtilis*'lerin ürettikleri β -1,3 glukanaz

enzimlerinin bitkilerde nohut solgunluğu hastalığına neden olan *Trichoderma harzianum*'a karşı etki gösterdiği bilinmektedir (Moradi vd. 2012). Ayrıca antimikrobiyal ajanlarla birlikte VOC'lerin de fitopatogenik büyümeyi baskıladığı ve bitki gelişimini destekleyerek bitkinin klorofil içeriğinde artış sağladığı rapor edilmiştir (Cappellari vd. 2020).

Litik enzimler ve antimikrobiyal ajanlar bakterilerin yanı sıra farklı canlıları da etkileyebilmektedir. Yapılan çalışmalar PGPB'lerin bitkilerde kurşuni küf ve gövde çürüklüğü gibi hastalıklara neden olan mantarlar *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı antimikrobiyal ajan ve litik enzim ürettiğini göstermiştir (Whipps 2001; Kim vd. 2008). Benzer şekilde bazı *Bacillus* cinsine ait türlerin sahip olduğu proteazların nematodlar için toksik olduğu bildirilmiştir (Khalaf ve Raiza 2016).

Çizelge 2.2. Patojenlere karşı PGPB'ler tarafından üretilen antimikrobiyal ajanlar

PGPB	Antimikrobiyal Üretim	Hedef Organizma	Kaynak
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fenazin-1-karboksilik asit	Patojenik mantarlar	Weller (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Fenazin-1-karboksamid	Patojenik mantarlar	Hernandez vd. (2004)
<i>Burkholderia</i> , <i>Cepacia</i>	Pirrolnitrin	Patojenik mantar	Sayyed vd. (2013)
<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Stenotrophomonas</i> sp.	Oligomisin A, Kanosamin Zwittermisin A, ksontabasin	Patojenik mantarlar	Compact vd. (2005)

2.3. Hiperakümülatör Bitkiler

Dünya genelinde, gübre ve böcek ilacı endüstrisi, enerji ve yakıt üretimi, madencilik, tarımsal ve askeri faaliyetler sonucunda yüksek miktarda toksik Ni, Pb, Cu, Zn, Cd ve Cr gibi ağır metaller çevreye salınmaktadır (Ahmad ve Malik 2011; Wang vd. 2017). Bu ağır metaller doğada genellikle parçalanamaz, uzun süre kalarak birikir ve belirli konsantrasyonlarda oldukça toksiktir (Sarwar 2017). Toksik etkilere sahip olan ağır metaller hücresel faaliyetleri inhibe ederek bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemekle birlikte besin zincirine katılarak tüm canlılara zarar vermektedir (Diep 2018; Zhang vd. 2022). Yüksek ağır metal konsantrasyonu varlığında gelişim gösteren ve ağır metalleri bünyesinde barındıran bitkilere “hiperakümülatör bitkiler” denmektedir. Hiperakümülatör bitkiler ağır metalleri kökleri ile alarak toprak üstü organlarında biriktirebilmektedir. Hiperakümülatör bitkiler normal bitkilere göre 100 kat daha fazla ağır metalleri bünyelerinde barındırma yeteneğine sahiptir. Ağır metallerin toksisitesine göre ağır metal oranları değişmektedir. Bu oran Ni, Cu, Al ve Pb için %0,1' iken Cd için bu oran %0,01' den yüksek olmalıdır. Söz konusu bu miktar birçok tür için toksiktir (Rascio vd. 2011). Hiperakümülatör bitkilerin %85-90'ı özellikle Cr, Ni, Cu, Zn, Cd gibi yüksek konsantrasyonlarda ağır metal içeren serpantin topraklar üzerinde bulunan endemik türlerdir (Pollard vd. 2014). Serpantin topraklar düşük Ca, Mg, P ve K konsantrasyonuna sahip topraklardır, besin yetersizliği ve düşük su tutma kapasitesi ile

bitki gelişimi için elverişsiz bir ortam oluşturmaktadır. Bu yüzden birçok bitki serpantin topraklarda büyümemektedir. Ülkemizde şu ana kadar rapor edilen 55 serpantin alan bulunmaktadır. Bu alanlarda bulunan 60 bitki türünün Ni hiperakümülatörü, 43 türün de serpantin endemiği olduğu rapor edilmiştir (Reeves ve Adıgüzel 2004; Reeves vd. 2009; Aksoy vd. 2015).

Yetersiz besin ve su içeren serpantin topraklarda bulunan bitkiler ve bakteriler bulundukları ortamlardaki olumsuzluklara karşı çeşitli adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Charlotte vd. 2022; Swoboda vd. 2022). Ağır metalleri bünyelerinde biriktiren hiperakümülatör bitkiler sadece biriktirecekleri metallere spesifik gösterirler yani ortamdaki tüm ağır metalleri biriktirmezler. Kök çevresinde bulunan ağır metaller kök salgıları ile kolayca çözünebilir ve emilen iyonlar endodermise oradan da bitki özsuğu ile toprak üstü dokulara dağıtılır. Böylece ağır metaller vakuollerde ve hücre duvarında depo edilerek bunların hücrenin hayati fonksiyonlarını engellemesi önlenir (Rafique vd. 2019; Saha vd. 2022). Ayrıca hiperakümülatör yalnızca bitki ile sınırlı kalmayıp bitki bünyesinde bulunan mikroorganizmalar aracılığı ile de olmaktadır (Ayangbenro 2017). Bitki bünyesinde bulunan PGPR toprak pH'sını değiştirerek organik asit, siderofor molekülleri ve hücre dışı polimerik maddelerin salınımı ile ortamdaki metal iyonlarının iyon dengesini değiştirerek daha az toksik bir forma çevirme ve uzaklaştırma yeteneğine sahiptir (Rajkumar vd. 2012; Visioli vd. 2015). Son yıllarda yüksek verimli ve streslere karşı dirençli bitkilerin eldesi için PGPB'lerin biyoasılmalı olarak kullanımı etkili bir teknik olarak kabul edilmektedir (Adams vd. 2015; Nakbanpote vd. 2016). Bu teknik sayesinde kontamine topraklardaki toksik bileşenleri ortadan kaldırmak için PGPB'lerin ve hiperakümülatör bitkilerin kullanımı fitoremediasyon teknolojileri için iyi bir alternatif haline gelmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında Brassicaceae familyasına ait, endemik ve Ni hiperakümülatörü olduğu bilinen *N. birolmutlui* ve *B. kiyakii* bitkileri kullanılmıştır (Özgişi vd. 2018; Aytac ve Aksoy 2000; Reeves vd. 2009). Literatürdeki bilgiler incelendiğinde bu bitkiler ile yapılmış PGPB çalışması bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmada, bahsedilen iki bitkinin kök, gövde, yaprak ve rizosferinden izole edilen bakterilerin PGPB özellikleri tespit edilmiş, ağır metal ve antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Yüksek PGPB aktivitesi gösteren bakteriler seçilerek 16S rRNA gen bölgeleri kullanılarak tanımlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkiler

Bu tez çalışmasında kullanılan bitkilerden *Noccaea birolmutlui* Özgişi & Özüdoğru Kızıldağ-Şarkikaraağaç, Isparta Mayıs 2021’de toplanmıştır. *Bornmuellera kiyakii* Aytaç & Aksoy bitkisi ise Kızıldağ-Derebucak, Konya’dan Mayıs 2021’de toplanmıştır. Bitkiler bulundukları yerlerden alınan topraklarla birlikte hızlıca laboratuvara getirilmiş ve en kısa sürede rizobakteri ve endofitik bakteri izolasyonları yapılmıştır.

3.2. Bakteri İzolasyonu

3.2.1. Rizobakteri izolasyonu

Bitkilerden rizobakteri izolasyonları Çelikten vd. (2018) belirttiği yöneme göre yapılmıştır. Buna göre, bitki kökleri ve kök etrafında bulunan topraktan toplam 1 g olacak şekilde tartılmış ve örnekler 5 mL %0,85’lik NaCl (Sigma Aldrich, ABD) içerisinde 1 sa çalkalamalı inkübatörde çalkalanmış, ardından karışımın çökmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışımın üst kısmından 1 mL alınarak 9 mL %0,85 NaCl içeren tüplere aktarılıp seri seyreltmeleri yapılmıştır. Seyreltilen bu karışımlardan 100 µL alınıp NA (Nutrient agar) (Sigma Aldrich, ABD) besiyerine ekimleri yapılmış ve bakteriler 5 gün boyunca 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından gelişme gösteren kolonilerin saf kültürleri elde edilmiş, gliserol stokları yapıldıktan sonra -80 °C’de saklanmıştır (Govarathanan vd. 2016).

3.2.2. Endofitik bakteri izolasyonu

Bitkilerden endofitik bakteri izolasyonları Govarathanan vd. (2016) belirttiği yöneme göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöneme göre laboratuvara getirilen bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi farklı organları distile su (dH₂O) ile yıkanarak temizlenmiştir. Bu örneklerden 1 g tartılmış ve %95’lik etil alkol (C₂H₆O) (Tekkim, Türkiye) ve %3 sodyum hipoklorit (NaOCl) (Merk, Almanya) içerisinde 3 dak bekletilerek sterilizasyonları yapılmıştır. Numuneler 3 kez steril dH₂O ile durulanmıştır. Ardından tüm numuneler 5 mL %0,85 NaCl eklenerek havanda ezilmiştir. Elde edilmiş ekstraktlardan 1 mL alınarak 9 mL %0,85 NaCl içerisinde seyreltilmiştir. Bitki özütlerinden 100 µL alınıp NA besiyerlerine yayma tekniği ile ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından gelişme gösteren kolonilerin saf kültürleri elde edilmiş, gliserol stokları yapıldıktan sonra -80 °C’de saklanmıştır (Govarathanan vd. 2016).

3.3. İndol Asetik Asit (IAA) Testi

IAA testleri Akbari vd. (2007) ve Akköprü’nün (2012) belirttiği yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre, saf kültürleri elde edilen bakteriler NA besiyerinde 28 °C’de 24 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından bakteriler steril olarak hazırlanmış Nutrient Broth (NB) (Sigma Aldrich, ABD) besiyerlerine eklenerek konsantrasyonları OD₆₀₀ = 0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril olarak hazırlanan triptofan çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD) son konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde NB besiyeri içerisine eklenerek NBT sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Konsantrasyonu

ayarlanan bakterilerden NBT ortamına 100 µL bakteri eklenmiş ve hazırlanan kültürler 30 °C’de 150 rpm’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından sıvı kültür 3400 g’de 10 dak santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatantlar Whatman 110 mm filtre kağıdından (Schleicher-Schüll, Almanya) geçirilerek filtre edilmiştir.

Filtre edilen solüsyonun 1,5 mL’sine 3 mL Salkowski ayracı (2 ml 0.5 M FeCl₃ ve 98 ml %35’lik perklorik asit) eklenerek 30 dak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından spektrofotometrede 4 tekrarlı olacak şekilde 535 nm’de ölçüm yapılarak örneklerin absorbans değerleri belirlenmiş böylece izolatların IAA üretme kapasitesine bağlı olarak renk değişimleri gözlenmiştir (Babier ve Akköprü 2020). Elde edilen absorbans sonuçlarının µg/mL cinsinden ifade edilebilmesi için standart eğri oluşturulmuştur. Bu amaçla 1’den 50’ ye kadar farklı ppm değerlerinde IAA süspansiyonları hazırlanıp ölçümleri yapılarak standart eğri oluşturulmuştur. Oluşturulan standart eğriye göre izolatların IAA üretimleri hesaplanmıştır (Akbari vd. 2007; Akköprü 2012). Pozitif kontrol olarak *Salmonella enterica* (LT2) suşu içeren NBT besiyeri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen NBT sıvı besiyeri kullanılmıştır (Angen vd. 1999).

3.4. ACC Deaminaz Aktivitesi

Saflaştırılan bakterilerin ACC deaminaz aktivitelerinin belirlenebilmesi için Dworkin ve Foster (1958) ve Penrose ve Glick (2003)’in belirttiği yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yönteme göre NA besiyerinde büyütülen bakteriler azotu uzaklaştırmak için daha sonra Dworkin- Foster (DF) broth (EK-1) içerisinde 28 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir ve besiyerinde gelişen bakteriler santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Elde edilen pelletler üzerine 2 ml 0,1 M Tris-HCl ilave edilerek yıkanmıştır ve ardından DF broth içerisinde çözündürülerek N kaynağı olarak yalnızca 3 mM ACC içeren DF besiyerlerine çizgi ekim metodu ile ekilmiştir. Deneyler sırasında ACC aktivitesinin kontrolü için, pozitif kontrol olarak bakterilerin daima büyüdüğü N kaynağı olarak yalnızca NH₄ içeren DF besiyeri, negatif kontrol olarak ise bakterilerin büyüemediği, azot kaynağı içermeyen DF besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan kültürler 28 °C’de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından ACC ortamında gelişim gösteren bakterilerin ACC deaminaz aktivitesinin olduğu kabul edilmiştir. ACC deneyi için pozitif kontrol olarak ACC deaminaz aktivitesine sahip *Pseudomonas canavaninivorans* içeren DF besiyeri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen DF besiyeri kullanılmıştır.

3.5. Siderofor Üretimi

Bakterilerin siderofor üretimini inceleyebilmek için Schwyn ve Neilands (1987)’in yöntemine göre Modifiye Chrome Azurol S Agar (MCASA) besiyeri hazırlanmıştır (EK-2). İzole edilen bakterilerin taze kültürlerin kullanılması için izolatlar öncelikle NA besiyerine ekilerek 24 sa 30 °C’de inkübe edilmiştir. Test edilecek izolatlar önceden hazırlanmış MCASA besiyerine eşit uzaklıkta nokta ekim yöntemi ile ekilerek 28 °C’de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan turuncu-sarı zonlar siderofor üretiminin pozitif olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Siderofor deneyi için pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* (ATCC 27853) içeren MCASA besiyeri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen MCASA besiyeri kullanılmıştır.

3.6. Fosfat Çözünürlüğü

İzole edilen bakteriler için fosfat çözme kapasitesi National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) besin ortamında belirlenmiştir (Perez vd. 2007) (EK-3). NBRIP sıvı besiyerinde ön zenginleştirmeye tabi tutulan izolatlar 30 °C 180 rpm'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından NBRIP sıvı besiyerinden 10 µL bakteri alınarak NBRIP katı besiyerine bu bakterilerin nokta ekimleri yapılmış ve 30 °C'de 14 gün inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* (ATCC 27853) içeren NBRIP besiyeri, negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen NBRIP besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda gelişen kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir ve koloni çevresinde oluşan şeffaf zon varlığı fosfat çözünürlüğü aktivitesi olarak değerlendirilerek oluşan zon çapları kaydedilmiştir. İzolatların fosfat çözme kapasiteleri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\frac{\text{Koloni çapı} + \text{Zon çapı}}{2}$$

$$\text{Koloni çapı}$$

3.7. Ağır Metal Direncinin Belirlenmesi

İzolasyonları gerçekleştirilen bakterilerin ağır metal dirençlerinin belirlenmesi Mergeay vd. (1987) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. İzolatların alüminyum (AlCl_3), bakır ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), krom ($\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), çinko [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$], kurşun [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$], krom ($\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), nikel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve kadmiyum [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Merck Millipore, Almanya) ağır metallerine karşı direnç profilleri araştırılmıştır. Öncelikle ağır metal tuzlarının 1 M'lık ana stokları hazırlanarak 0,45 µm çaplı şırınga ucu filtreden geçirilip sterilize edilmiştir. Ardından 1, 5 ve 10 mM'lık ara stokları hazırlanmıştır. Taze bakteri kültürlerinin konsantrasyonu 0,5 McFarland'a ayarlanarak ağır metal emdirilmiş petrilere ekimleri yapılmıştır. Ardından hazırlanan petriler 4 gün 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 4 gün sonunda ağır metal içeren petrilere gelişim gösteren bakteriler dirençli olarak kabul edilmiştir.

3.8. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

İzolatların antibiyotik direncini belirlenmek için, disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Bauer ve Kirby 1966). Taze bakteri kültürlerinin konsantrasyonları %0,85'lik NaCl solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland'a ayarlanarak NA ortamına yayma metodu ile ekimleri yapılmıştır. Ardından petrilerin üzerine ticari olarak satın alınan antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirilmiştir. Antibiyotik direncinin incelenmesi için kullanılan diskler; ampisilin (10 µg/ml), kanamisin (30 µg/ml), kloramfenikol (30 µg/ml), tetrasiklin (30 µg/ml) ve imipenem (30 µg/ml)'dir. Bu antibiyotik konsantrasyonları CLSI standartlarına (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) göre seçilmiştir. Antimikrobiyal direncin incelenebilmesi için hazırlanan petriler 30 °C'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülerek kaydedilmiştir. *Escherichia coli* (ATCC 35218) suşu referans suş olarak kullanılmıştır.

3.9. PGPB Aktivitesi Yüksek Bakterilerin Seçimi

İzole edilen bakteriler birbirinden bağımsız olacak şekilde fosfat çözme kapasiteleri, IAA, siderofor ve ACC deaminaz üretimleri açısından değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda izolatlar, en iyi PGPB özelliği göstermeleri açısından sıralanmıştır. Ayrıca ilgili testler için ortalamalar alınarak ortalama değerlerin üstünde değere sahip olan izolatlara +1 puan, ortalama değerlerin altında değere sahip olan izolatlara ise 0 puan verilerek puanlamalar yapılmıştır. Ardından her izolatın toplam puanı hesaplanmış ve “Toplam PGPB Puanı” belirlenmiştir.

3.10. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

Seçilen bakterilerin DNA izolasyonları DNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle NA besiyerinde büyütülen taze bakteri kültürlerinin konsantrasyonları %0,85 NaCl içerisinde 1 McFarland’a ayarlanmıştır. Ardından lizis tüplerine aktarılan 500 µL bakteri kültürünün üzerine 750 µL lizis solüsyonu eklenerek tüpler alt üst edilip en az 10 dak karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 5 dak 8.500 g’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant Zymo-Spin III-F filtresine aktararak 1 dak 8.500 g’de santrifüjlenmiştir. Filtreden kolona geçen solüsyonun üzerine 1200 µL Binding Buffer (bağlama tamponu) eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım IC filtresine alınarak 1 dak 8.500 g’de santrifüjlenmiş, kolona geçen sıvı atılmıştır. Ardından filtreye 400 µL Wash Buffer-1 (yıkama tamponu) eklenip 1 dak maksimum hızda santrifüjlenmiş, kolona geçen sıvı tekrar atılmıştır. Daha sonra filtreye öncelikle 700 µL Wash Buffer-2 aktararak 2 dak 8.500 g’de santrifüjlenmiş, ardından tekrar 200 µL Wash Buffer- 2 eklenerek 1 dak 8.500 g’de santrifüjlenip kolona geçen sıvı atılmıştır. Son olarak filtreye 30 µL DNaz-RNaz içermeyen su aktararak 5 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 3 dak 12.000 g’de santrifüjlenmiştir. Son olarak elde edilen DNA solüsyonları yeni bir santrifüj tüpüne aktararak +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Kit ile izole edilemeyen DNA’lar aynı zamanda Syn ve Swarup (2000) belirttiği manuel yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre taze olarak hazırlanan 3 ml bakteri kültürü %0,85’lik NaCl ile iki kez 12.000 g’de 5 dak santrifüjlenerek yıkanmıştır. Ardından hücre pelleti 750 µL TES (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, %2 SDS) solüsyonu içinde yeniden süspanse edilerek 75 °C’de 10 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre lizatlarına 750 µL fenol:kloroform çözeltisi (3:1, v/v) eklenerek hafifçe vortekslenmiş ve 12.000 g’de 10 dak santrifüjlenmiştir. Oluşan faz ayrımına göre üstteki berrak faz ayrı bir santrifüj tüpüne dikkatlice alınmıştır ve 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$) (pH 5,2) ve 1 hacim izopropanol (oda sıcaklığı) eklenerek tüpler birkaç kez hafifçe ters çevrilerek karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra görünür hale gelebilen DNA iplikçikleri 5 dak santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Ardından DNA pelleti %95’lik soğuk etanol ile yıkanıp kurutulmuş ve 50 µL TE (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

İzolasyonları gerçekleştirilen DNA’ların trizma base (Sigma Aldrich, ABD), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma Aldrich, ABD), ve glasiyel asetik asit (Merck Millipore, Almanya) ile hazırlanan TAE tamponu ile %1’lik agaroz (Sigma Aldrich, ABD) jel elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez sonunda ise etidyum bromür

(EtBr) (Sigma Aldrich, ABD) ile jel boyaması yapılmıştır ve ardından DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, İsrail) ile DNA'lar görüntülenmiştir.

3.11. İzolatların Moleküler Tanımlanması

En yüksek PGPB özelliği gösteren bakterilerin moleküler tanımlamalarında kullanılmak için 16S rRNA gen bölgesi hedef gen bölgesi olarak seçilmiştir. Bu bölgenin PZR ile çoğaltılması için Çizelge 3.1'de belirtilen evrensel primerler (ileri primer 8F, geri primer 1492R) kullanılmıştır (Sentebiolab, Türkiye) ve Çizelge 3.2'deki koşullarla Biorad T100 Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazında PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. 16S rRNA gen bölgesi için tasarlanan primerler

Primerler	Oligonükleotit Dizilimi (5'-3')	Kaynak
8F İleri	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3	Icgen ve Yılmaz (2014); Eden vd. (1991)
1492R Geri	5'-GGTGTGTTGATTGTTACGACTT-3'	

Çizelge 3.2. PZR Reaksiyonu karışımı ve PZR koşulları

Karışım Reaktifi	Miktar		Sıcaklık	Süre
Taq Tampon Solüsyonu (10X)	2,5 µl	İlk denatürasyon	95 °C	10 dak
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl	Denatürasyon	95 °C	1 dak
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl	Primer yapışması	47 °C	1 dak
Geri Primer (10 µM)	0,5 µl	Uzama	72 °C	1 dak
dNTP karışımı	0,5 µl	Son Uzama	72 °C	10 dak
Genomik DNA	0,5 µl			
Taq polimeraz enzimi	0,5 µl			
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	17,5µl			
Toplam	25 µl			

Çizelge 3.2'de belirtilen koşullara göre hazırlanan PZR ürünleri yükleme boyası (Bioline, ABD) ile karıştırılarak %1,5'lük agaroz jelde 75 dak 90 V olacak şekilde elektroforez sisteminde yürütülmüştür. Belirtilen süre sonunda jel, EtBr ile boyanmış ve DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, İsrail) ile görüntülenmiştir. Hedef bantlar jel ekstraksiyon kiti (Zymo Research, ABD) ile üreticinin protokolüne göre saflaştırılmış ve saflaştırılan ürünler çift yönlü DNA sekans analizleri hizmet alımı ile (BM Laboratuvar Sistemleri, Türkiye) yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen sekans sonuçları Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information-NCBI) veri tabanında incelenerek izolatların tanımlamaları

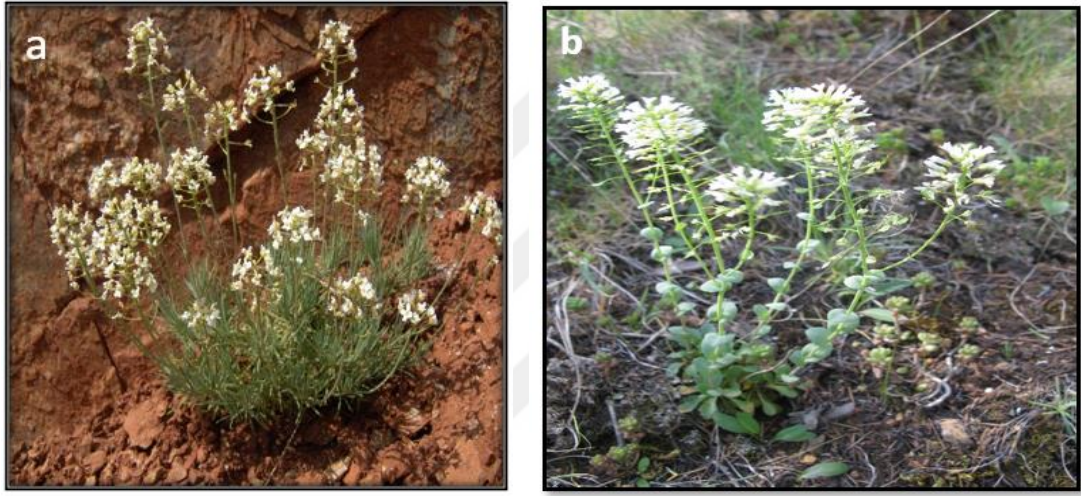
yapılmıştır. Ek olarak bakterilere ait çift yönlü sekans dizileri Clustal Omega programı kullanılarak hizalanmıştır (Larkin vd. 2007). Bu inceleme sonucunda elde edilen veriler NCBI tabanında yeniden blastlanarak bakteri tanımlamaları yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Bitki Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

N. birolmutlui, Kızıldağ-Şarkikaraağaç, Isparta'dan toplanarak laboratuvara getirilmiştir (Şekil 4.1b). Bu bitkiden 12 adet rizobakteri ve 28 adet endofitik bakteri izole edilmiştir. Kızıldağ-Derebucak, Konya'dan toplanan *B. kiyakii* bitkisinden ise 42 adet endofitik bakteri ve 23 adet rizobakteri izole edilmiştir (Şekil 4.1a, Şekil 4.2). Örnekler izole edildikleri bitkilerin baş harfleri ve bitkiden elde edildikleri yere göre koloni numaraları ile kısaltmalar kullanılarak adlandırılmıştır. Örneğin; *N. birolmutlui* endofitik 1. koloni: NBE1, *N. birolmutlui* rizobakteri 2. koloni: NBR2, *B. kiyakii* endofitik 1. koloni: BKE1, *B. kiyakii* rizobakteri 2. koloni: BKR2 şeklinde koloni isimlendirilmeleri yapılmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan bitkiler a) *Bornmuellera kiyakii* b) *Noccaea birolmutlui*

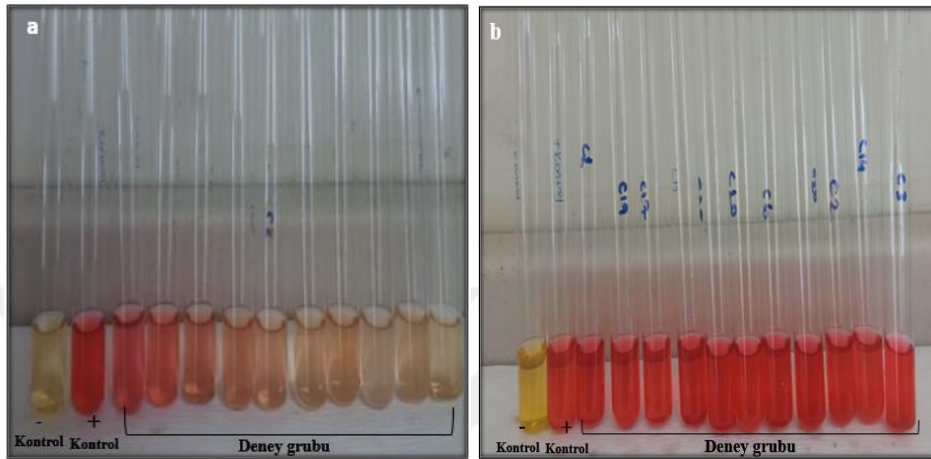


Şekil 4.2. Bitkilerden izole bakterilerin NA besiyerine ekilmesi

4.2. İndol Asetik Asit Testi

Bakterilerin IAA üretme kapasiteleri incelendiğinde, *N. birolmutlui* bakterilerinin tamamının IAA ürettiği görülmüştür. Bu bitkiden izole edilen bakterilerde en yüksek miktardaki IAA'nın endofitik bakterilerde NBE1 kolonisi tarafından (102,9 ppm),

rizobakterilerde ise NBR9 kolonisi tarafından (24,37 ppm) üretildiği görülmüştür. *B. kiyakii*' den izole edilen BKE45 kolonisi dışındaki tüm endofitik bakterilerin IAA ürettiği ve en yüksek IAA üretiminin BKE32 kolonisinde (22,20 ppm) olduğu görülmüştür. Bu bitkinin rizobakterilerinin tamamının IAA üretebildiği ve en yüksek üretimin 38,63 ppm ile BKR11 kolonisi tarafından gerçekleştiği bulunmuştur (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. enterica*'nın da IAA üretimine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3a, Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. İzole edilen endofitik bakterilerin IAA üretimlerine bağlı olarak renk değişimleri a) *B. kiyakii*; b) *N. birolmutlui*

Çizelge 4.1. *N. birolmutlui* rizobakterilerinin PGPB aktivitesi

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Üretme (mm)	ACC Deaminaz Üretimi
NBR 1	8,83±0,13	26±0,58	18±1,15	-
NBR 2	24,37±0,40	26±0,31	0±0	-
NBR 3	5,38±0,14	25±1,15	19±0,58	-
NBR 4	11,88±0,09	28±0	17±0	-
NBR 5	8,14±0,02	26±0,58	19±1,15	-
NBR 6	14,20±0,09	25±0,32	24±3,46	-
NBR 8	6,35±0,02	24±1,45	0±0	-
NBR 9	24,19±0,17	40±0,58	17±0,58	+
NBR 10	9,95±0,11	24±0,96	28±1,73	-
NBR 12	10,44±0,24	30±0	27±0,58	-
NBR 13	6,85±0,06	28±0,13	30±0	-
NBR 14	11,89±0,26	26±0,56	30±0	+

Çizelgede ACC aktivitesine ait + simgesi aktivitenin varlığını, - simgesi ise aktivitenin yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2. *N. birolmutlui* endofitik bakterilerinin PGPB aktivitesi

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Üretme (mm)	ACC Deaminaz Üretimi
NBE 1	102,9±6,20	40±0,58	12±0,58	+
NBE 2	30,2±0,23	29±1,11	7±0,58	+
NBE 3	46,7±0,81	39±0,58	7±0,58	-
NBE 4	28,2±0,16	37±2,89	7±0,58	-
NBE 6	51,1±0,70	25±0	7±1	-
NBE 7	87,5±9,02	35±2,03	7±0,58	-
NBE 8	66,5±1,17	25±0,26	4±1	+
NBE 9	67,3±2,32	25±0,26	8±1	-
NBE 10	45,0±0,61	21±0,73	8±1	-
NBE 11	49,4±0,05	30±0,82	8±0,58	-
NBE 12	30,9±0,44	25±1,78	11±1	-
NBE 13	66,5±0,53	24±1,07	4±1,15	-
NBE 14	30,9±0,38	25±0,32	4±1	-
NBE 15	26,0±0,18	35±0,58	7±0,53	-
NBE 16	36,6±0,60	22±0,58	7±0,58	-
NBE 17	84,4±6,97	27±0,67	7±1	-
NBE 18	42,0±0,41	27±1,53	10±0,58	-
NBE 19	84,0±2,99	25±0,45	4±0,58	-
NBE 20	54,7±0,86	30±0	4±1	-
NBE 21	46,8±0,35	30±0,82	12±0,58	-
NBE 22	27,9±0,48	24±0,54	6±0,58	-
NBE 23	19,4±0,21	31±1,45	4±0,58	-
NBE 24	30,8±0,40	24±0,31	7±1	-
NBE 27	23,6±0,15	27±4,62	7±0,58	-
NBE 28	53,8±0,64	28±0,25	8±1,53	-
NBE 29	28,4±0,11	29±1,22	8±0,58	-
NBE 30	53,3±0,57	23±0,89	7±0,58	-
NBE 31	49,6±0,34	34±0,58	9±1	-

Çizelgede ACC aktivitesine ait + simgesi aktivitenin varlığını, - simgesi ise aktivitenin yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3. *B. kiyakii* endofitik bakterilerinin PGPB aktivitesi

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Üretme (mm)	ACC Deaminaz Üretimi
BKE 1	5,55±0,16	37±0,19	30±0	+
BKE 2	4,35±0,05	0±0	0±0	-
BKE 3	3,36±0,29	29±3,38	0±0	-
BKE 4	7,85±0,07	28±0,51	32±0,47	-
BKE 5	9,08±0,06	25±1,13	14±0,47	-
BKE 6	6,38±0,17	0±0	0±0	-
BKE 8	66,75±0,98	0±0	0±0	+
BKE 9	8,11±0,08	25±0,32	0±0	-
BKE 10	8,19±0,040	0±0	0±0	-
BKE 11	18,25±0,24	25±1,74	0±0	-
BKE 12	8,07±0,08	0±0	0±0	-
BKE 13	6,96±0,28	22±1,18	16±2,94	-
BKE 14	7,02±0,06	0±0	0±0	-
BKE 15	11,77±0,05	0±0	0±0	-
BKE 16	5,19±0,11	0±0	0±0	-
BKE 17	6,75±0,48	28±0,58	11±0,94	-
BKE 18	8,12±0,36	0±0	0±0	-
BKE 19	6,42±0,31	0±0	0±0	-
BKE 20	5,63±0,09	0±0	15±0	+
BKE 21	10,66±0,59	0±0	13±0,47	-
BKE 22	7,96±0,12	0±0	0±0	-
BKE 23	6,38±0,17	0±0	0±0	-
BKE 24	6,90±0,03	0±0	15±0,82	-
BKE 25	10,02±0,31	0±0	0±0	-
BKE 26	5,20±0,07	0±0	0±0	-
BKE 27	10,64±0,02	0±0	0±0	-
BKE 28	5,19±0,15	0±0	22±0	+
BKE 29	8,07±0,06	0±0	0±0	+
BKE 30	6,06±0,05	34±1,07	0±0	-
BKE 31	3,93±1,03	0±0	14±0,94	+
BKE 32	22,20±0,30	0±0	0±0	-
BKE 33	3,65±0,25	0±0	0±0	-
BKE 34	10,89±0,11	27±0,71	30±0	+
BKE 35	17,75±0,19	32±2,89	0±0	+
BKE 37	6,06±0,36	0±0	0±0	-
BKE 38	4,60±0,12	0±0	0±0	-
BKE 39	12,55±0,69	0±0	14±0	-
BKE 40	18,82±0,56	0±0	24±0	-
BKE 41	11,01±0,14	37±2,65	20±0	-
BKE 43	10,76±0,22	0±0	10±0	+
BKE 44	8,70±0,12	29±2,31	0±0	-
BKE 45	0,07±0,78	0±0	0±0	-

Çizelgede ACC aktivitesine ait + simgesi aktivitenin varlığını, - simgesi ise aktivitenin yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.4. *B. kiyakii* rizobakterilerinin PGPB aktivitesi

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Aktivitesi (mm)	ACC Deaminaz Üretimi
BKR 1	11,56±0,11	0±0	8±0	-
BKR 5	14,34±0,62	47±1,73	14±1,15	-
BKR 8	21,95±0,25	25±1,23	14±1,53	-
BKR 9	4,07±0,09	38±0,33	25±0	-
BKR10	36,46±0,26	39±1,15	17±1,15	-
BKR 11	38,63±0,35	25±2,36	22±0	-
BKR 15	11,05±0,12	32±0,29	0±0	-
BKR 16	14,34±0,11	33±3,61	0±0	+
BKR 22	8,28±0,15	26±1,15	0±0	+
BKR 23	5,25±0,58	0±0	0±0	-
BKR 24	36,44±1,37	0±0	26±0,58	+
BKR 25	15,53±0,04	0±0	22±0,58	+
BKR 26	10,61±0,10	0±0	0±0	-
BKR 27	9,88±0,41	39±1	22±0,58	-
BKR 29	1,16±0	35±5,54	7±0	-
BKR 30	14,36±0,23	38±1,53	21±0,58	-
BKR 32	12,30±0,16	29±3,16	8±0	-
BKR 33	10,05±0,30	38±1,67	22±0,58	-
BKR 34	11,34±0,14	37±1,53	20±2,31	+
BKR 36	14,55±0,22	26±1,07	0±0	-
BKR 38	8,96±0,11	0±0	10±0	-
BKR 41	2,02±0,13	0±0	9±0	-
BKR 43	8,90±0,83	0±0	0±0	-

Çizelgede ACC aktivitesini ait + simgesi aktivitenin varlığını, - simgesi ise aktivitenin yokluğunu göstermektedir. Veriler üç tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması olarak ifade edilmiştir.

4.3. ACC Deaminaz Aktivitesi

Bakterilerin ACC deaminaz aktiviteleri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 gösterilmiştir. Deney sonucunda 105 bakteri içerisinde 19 adet bakterinin ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas canavaninivorans*'ın da ACC içeren DF besiyerinde gelişim gösterdiği, ACC pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

4.4. Siderofor Üretimi

Bakterilerin siderofor üretim yetenekleri karşılaştırıldığında *N. birolmutlui* endofitik bakterilerinin tamamının siderofor üretebildiği görülmüştür (Şekil 4.4). Benzer şekilde *N. birolmutlui*'ye ait rizobakterilerden NBR2 ve NBR8 izolatları dışındakilerin tamamının siderofor üretmekte olduğu belirlenmiştir. *B. kiyakii* bitkisinde endofitik bakterilerin %26'sının rizobakterilerin ise %69'unun siderofor üretebildiği gözlemlenmiştir. Deney sonucunda izole edilen tüm bakterilerin siderofor üretme yetenekleri incelendiğinde BKE1, BKE34, BKR13, BKR14, NBE1 ve NB321 izolatlarının en yüksek siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca

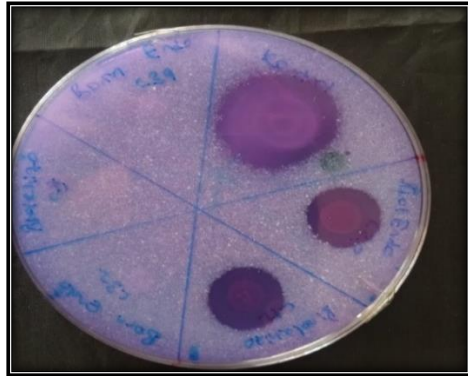
pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* 'nın da siderofor zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. MCASA besiyerinde PGPB'lerin siderofor üretimine bağlı olarak turuncu zon oluşturmaları

4.5. Fosfat Çözünürlüğü

Bakteri izolatlarının fosfat çözme yetenekleri NBRIP besiyeri kullanılarak belirlenmiş (Şekil 4.5) ve bakterilerin fosfat çözme kapasiteleri Çizelge 4.1-4.4' te gösterilmiştir. Buna göre *N. birolmutlui*'ye ait rizobakterilerin ve endofitik bakterilerinin tamamının fosfatı çözebildiği ve bu izolatlardan NBE1 ve NBE3 bakterilerinin en iyi fosfat çözme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *B. kiyakii*'ye ait endofitik bakterilerin %32'si fosfat çözme yeteneğine sahipken rizobakterilerin ise %66'sının fosfat çözme yeteneği olduğu gözlemlenmiştir. *B. kiyakii*'ye ait BKR5 izolatının en büyük zon çapına (47 mm) sahip olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* 'nın da fosfat çözme kapasitesi olduğu incelenmiştir.



Şekil 4.5. NBRIP besiyerinde bakterilerin fosfat çözmesine bağlı olarak oluşan şeffaf zonlar

4.6. Ağır Metal Direncinin Belirlenmesi

İzole edilen tüm bakteriler çeşitli konsantrasyonlarda Ni, Cu, Al, Zn, Pb, Cd, Cr (1 mM, 5 mM ve 10 mM) ağır metallerini içeren NA besiyerinde 4 gün boyunca 30 °C’de büyütülmüştür. 4 gün sonunda ağır metallerini içeren NA besiyerinde gelişim gösteren bakteriler dirençli olarak kabul edilmiştir. Bakterilerin ağır metale karşı göstermiş oldukları dirençler Çizelge 4.5-4.8’de belirtilmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde bakteriler genel olarak 1 mM Ni, Al, Cu, Pb ve Cr metallerine karşı dirençli bulunmuştur. Yalnızca *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen endofitlerin 10 mM Ni direnci olduğu gözlemlenmiştir. Bitkilerden elde edilen hiçbir bakteri izolatu Cd içeren ortamda büyüyememiştir.

Çizelge 4.5. *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen rizobakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)

Koloniler	Ni	Cu	Al	Zn	Pb	Cd	Cr
NBR 1	1	1	1	0	1	0	1
NBR 2	5	1	1	0	1	0	1
NBR 3	1	0	1	0	1	0	1
NBR 4	1	1	1	0	1	0	1
NBR 5	1	0	1	0	1	0	1
NBR 6	1	0	1	0	1	0	1
NBR 8	5	1	1	0	1	0	1
NBR 9	1	1	1	0	1	0	1
NBR 10	1	1	1	0	1	0	1
NBR 12	1	0	1	0	1	0	1
NBR 13	1	0	1	0	1	0	1
NBR 14	1	1	1	0	1	0	1

Tabloda verilen değerler mM cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 4.6. *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)

Koloniler	Ni	Cu	Al	Zn	Pb	Cd	Cr
NBE 1	5	1	1	0	1	0	1
NBE 2	5	1	1	0	1	0	1
NBE 3	10	1	1	0	1	0	1
NBE 4	5	1	1	0	1	0	1
NBE 6	10	1	1	0	1	0	1
NBE 7	5	1	1	0	1	0	1
NBE 8	10	1	1	0	1	0	1
NBE 9	10	1	1	0	1	0	1
NBE 10	5	1	1	0	1	0	1
NBE 11	5	1	1	0	1	0	1
NBE 12	10	1	1	0	1	0	1
NBE 13	5	1	1	0	1	0	1
NBE 14	5	1	1	0	1	0	1
NBE 15	5	1	1	0	1	0	1
NBE 16	10	1	1	0	1	0	1
NBE 17	10	1	1	0	1	0	1
NBE 18	5	1	1	0	1	0	1
NBE 19	5	1	1	0	1	0	1
NBE 20	5	1	1	0	1	0	1
NBE 21	5	1	1	0	1	0	1
NBE 22	5	1	1	0	1	0	1
NBE 23	5	1	1	0	1	0	1
NBE 24	10	1	1	0	1	0	1
NBE 27	5	1	1	0	1	0	1
NBE 28	5	1	1	0	1	0	1
NBE 29	5	1	1	0	1	0	1
NBE 30	5	1	1	0	1	0	1
NBE 31	5	1	5	0	1	0	1

Tabloda verilen değerler mM cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 4.7. *B. kiyakii* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)

Koloniler	Ni	Cu	Al	Zn	Pb	Cd	Cr
BKE 1	1	0	5	0	1	0	0
BKE 2	1	1	1	0	1	0	1
BKE 3	5	1	5	0	1	0	1
BKE 4	5	1	5	0	1	0	1
BKE 5	1	0	1	0	1	0	1
BKE 6	5	1	1	0	1	0	1
BKE 8	1	1	1	0	1	0	1
BKE 9	1	1	1	0	1	0	0
BKE 10	1	1	1	0	1	0	1
BKE 11	1	1	1	0	1	0	0
BKE 12	1	1	1	0	1	0	1
BKE 13	5	0	0	0	1	0	0
BKE 14	1	1	1	0	1	0	1
BKE 15	5	1	1	0	1	0	1
BKE 16	1	0	1	1	1	0	0
BKE 17	5	1	1	0	1	0	1
BKE 18	5	1	5	0	1	0	1
BKE 19	5	1	1	0	1	0	1
BKE 20	5	1	1	0	1	0	1
BKE 21	1	1	1	0	1	0	1
BKE 22	1	1	1	0	1	0	1
BKE 23	1	1	1	0	1	0	0
BKE 24	5	1	1	0	1	0	1
BKE 25	1	1	1	0	1	0	1
BKE 26	5	1	1	0	1	0	0
BKE 27	1	1	1	0	1	0	1
BKE 28	5	1	1	0	1	0	1
BKE 29	5	1	1	0	1	0	0
BKE 30	1	1	1	0	1	0	0
BKE 31	1	0	1	0	1	0	0
BKE 32	5	1	1	0	1	0	0
BKE 33	5	1	1	0	1	0	0
BKE 34	5	0	5	0	1	0	1
BKE 35	1	1	1	0	1	0	1
BKE 36	5	1	1	0	1	0	1
BKE 37	1	1	1	0	1	0	1
BKE 38	1	1	1	0	1	0	1
BKE 39	1	1	1	0	1	0	1
BKE 40	1	1	1	0	1	0	1
BKE 41	1	1	1	0	1	0	1
BKE 43	1	0	1	0	1	0	1
BKE 44	5	1	1	0	1	0	1
BKE 45	5	1	1	0	1	0	1

Tabloda verilen değerler mM cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 4.8. *B. kiyakii* bitkisinden izole edile rizobakterilerin ağır metal direnç profilleri (mM)

Koloniler	Ni	Cu	Al	Zn	Pb	Cd	Cr
BKR 1	1	0	1	0	1	0	1
BKR 5	1	1	1	0	1	0	0
BKR 8	1	1	1	0	1	0	0
BKR 9	1	1	1	0	1	0	0
BKR10	1	1	1	0	1	0	0
BKR 11	1	1	1	0	1	0	0
BKR 15	1	1	1	1	1	0	0
BKR 16	1	1	1	1	1	0	1
BKR 22	1	1	1	0	1	0	1
BKR 23	1	0	1	0	1	0	1
BKR 24	1	0	1	0	1	0	1
BKR 25	1	0	1	0	1	0	1
BKR 26	1	1	1	1	1	0	1
BKR 27	1	1	1	0	1	0	0
BKR 29	1	0	1	0	1	0	1
BKR 30	1	0	1	0	1	0	1
BKR 32	1	1	1	0	1	0	1
BKR 33	1	1	1	0	1	0	0
BKR 34	1	0	1	0	1	0	1
BKR 36	1	1	1	0	1	0	0
BKR 38	1	1	1	0	1	0	0
BKR 41	1	1	1	0	1	0	1
BKR 43	1	1	1	0	1	0	1

Tabloda verilen değerler mM cinsinden ifade edilmiştir.

4.7. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

N. birolmutlui ve *B. kiyakii* bitkilerinden izole edilen rizobakteriler ve endofitik bakteriler NB besiyerinde büyütüldükten sonra bakterilerin yoğunluğu %0,85'lik NaCl solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland'a ayarlanarak NA besiyerine yayma metodu ile ekilmiştir. Ekim yapılan petriyelerin üzerine ampisilin (10 µg/ml), kanamisin (30 µg/ml), kloramfenikol (30 µg/ml), tetrasiklin (30 µg/ml) ve imipenem (30 µg/ml) antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından duyarlılık testi sonucunda elde edilen zon çapları kaydedilmiştir (Çizelge 4.9-4.12). Her iki bitkiden de izole edilen bakterilerin tamamı imipeneme duyarlıdır. *N. birolmutlui*'den izole edilen rizobakterilerin 8 tanesinin ampisiline dirençli, endofitik bakterilerin ise tamamının ampisiline duyarlı olduğu görülmüştür. *B. kiyakii*'den izole edilen rizobakterilerin 15 tanesinin, endofitik bakterilerin ise 37 tanesinin ampisiline dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca tüm isolatların tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotikleri ile oluşturdukları zon çaplarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen rizobakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)

Koloniler	Kanamisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin	İmipenem	Ampisilin
NBR 1	22,3±0,58	34,7±0,58	34,3±0,47	50±0	25±0
NBR 2	22,3±0,58	30±0	27,7±0,58	44,7±0,58	6 ± 0
NBR 3	28,3±2,89	40±0	35,0±1,73	54,3±1,15	30,0±0,0
NBR 4	23,7±1,53	30±0	26,7±4,16	45,3±0,58	12,7±2,52
NBR 5	35,3±4,51	12±0	39,3±1,15	47,7±3,06	6 ± 0
NBR 6	28,3±0,58	14±0	25±0	40,3±0,58	6 ± 0
NBR 8	22,7±0,58	23±1	34,3±1,15	50±0	26,3±0,58
NBR 9	30±0	12±0	30,3±0,58	40,3±0,58	6 ± 0
NBR 10	29±1	14,7±0,58	21,7±1,53	48,3±0,58	6 ± 0
NBR 12	30±0	13±0	25,7±0,58	44±1	6 ± 0
NBR 13	32,3±2,08	13±0	28±1	44±1	6 ± 0
NBR 14	35±1	14,3±0,58	28±2	47,7±1,53	6 ± 0
Kontrol	15,7±0,58	30±0,2	24,2±0,58	38±0,58	6 ± 0

Antibiyotik direncinin belirlenmesi için kullanılan disklerin çapı 6 mm olduğu için zon oluşturmayan örneklerin inhibisyon zonu 6 mm olarak belirtilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.10. *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)

Koloniler	Kanamisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin	İmipenem	Ampisilin
NBE 1	20±0	31,7±1,53	29,7±0,58	44,7±0,58	20,0±0
NBE 2	24±1,52	33,3±1,52	34,7±0,58	50,0±0	23,3±1,53
NBE 3	20,3±0,58	30,0±0	29,0±1	41,7±0,58	20,0±0
NBE 4	21,7±0,58	35,7±0,58	32,0±0	45,0±0	15,0±0
NBE 6	20,3±0,58	12,0±0	30,0±0	36,0±1	10,0±0
NBE 7	20,7±0,47	30,7±0,94	29,3±0,47	41,0±1,41	18,0±0
NBE 8	19,0±01	30,0±0	41,0±1,73	49,7±0,58	19,0±1
NBE 9	19,7±0,58	30±2	29,7±0,58	43,0±0	19,0±0
NBE 10	20,3±0,58	33,0±2	31,3±1,15	47,0±0	14,3±1,53
NBE 11	26,3±0,38	34±0,16	35±0	47,3±0,18	17±0
NBE 12	20±0	11±0	25,6±0,05	33,3±0,16	10±0
NBE 13	23,0±2	34,0±1	30,3±0,58	47,3±2,52	20,0±0
NBE 14	22,7±2,52	32,7±2,52	35,0±0	50,0±0	20,0±0
NBE 15	20,0±0	25,0±0	33,7±0,58	42,7±0,58	14,7±0,58
NBE 16	25,0±1	21,0±1	34,3±1,15	50,0±1	21,3±1,15
NBE 17	20,0±0	30,3±0,58	30,0±0	47,3±0,58	20,3±0,58
NBE 18	20,3±0,58	30,0±0	30,0±0	44,3±0,58	10,0±0
NBE 19	19,3±1,15	30,3±0,58	28,3±0,58	42,7±0,58	19,3±0,58
NBE 20	20,3±0,58	35,7±0,58	35,0±0	44,3±0,58	16,0±1
NBE 21	20,3±0,58	35,0±0	32,7±0,58	45,0±0	13,0±0
NBE 22	25,0±0	36,0±1	33,3±1,53	50,0±0	21,0±1,73
NBE 27	23,7±1,53	34,3±1,15	34,3±0,58	50,3±0,58	21,0±1
NBE 28	20,0±0	30,0±0	29,3±0,58	42,0±1	19,0±0
NBE 29	25,0±0	46,7±2,88	35,7±3,05	52,3±2,52	21,0±1
NBE 30	19,7±0,58	31,0±1	29,7±0,58	42,7±0,58	10,7±0,58
NBE 31	23,0±2	31,0±1	30,0±0	49,7±0,58	12,7±2,52
Kontrol	15,7±0,58	30±0,2	24,2±0,58	38±0,58	6 ± 0

Antibiyotik direncinin belirlenmesi için kullanılan disklerin çapı 6 mm olduğu için zon oluşturmayan örneklerin inhibisyon zonu 6 mm olarak belirtilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.11. *B. kiyakii* bitkisinden izole edilen rizobakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)

Koloniler	Kanamisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin	İmipenem	Ampisilin
BKR 1	14,0±3,60	14±1	22,7±2,52	48±2	15,3±0,7
BKR 5	21,3±0,58	7±0	21±0	33,3±0,57	6 ± 0
BKR 8	25,3±0,57	12,3±2,08	23,3±1,52	40±0,0	6 ± 0
BKR 9	20,3±0,57	7,7±0,57	21±1	31,7±1,53	6 ± 0
BKR10	27,7±0,58	13,7±1,53	28±2	46,3±1,53	6 ± 0
BKR 11	19,7±0,58	13±1,73	25,7±2,31	41,7±1,53	6 ± 0
BKR 15	17,7±0,58	68± 0	24±2	35,3±0,57	6 ± 0
BKR 16	21±1	11±1	26,5±4,5	42,5±0,5	13,5±1,5
BKR 22	21±0	9,7±0,58	21,7±0,58	47,7±1,53	6 ± 0
BKR 23	15±0	13,3±1,53	28±2	43,0±1	19± 1
BKR 24	23±1	10,7±0,58	20,7±0,58	40±0	6 ± 0
BKR 25	25±0	15±0	30,3±0,58	38,7±1,53	6 ± 0
BKR 26	23,5±2,04	10±0	30±0	44±0	21,5±0,41
BKR 27	35,3±0,58	15±0	31±1	49,3±0,58	6 ± 0
BKR 29	21±0	10±0	29±1	39,7±2,52	6 ± 0
BKR 30	20,3±0,58	8,3±0,58	20±0	35±0	6 ± 0
BKR 32	15,3±0,58	16,0±1,73	30,3±0,58	55±0	25±5
BKR 33	19,3±1,15	11,7±2,52	26,7±0,58	34,3±0,58	6 ± 0
BKR 34	25±0	19,3±0,58	28,3±0,58	39±1	6 ± 0
BKR 36	11,7±0,58	15,7±0,58	28±2	46,3±1,53	40±0
BKR 38	20±0	13,7±1,53	30±0	37,3±2,52	10±0
BKR 41	24±1	35,0±0	45±0	26,7±1,52	6 ± 0
BKR 43	28,7±0,58	13,7±1,53	30±0	37,3±2,52	10±0
Kontrol	15,7±0,58	30±0,2	24,2±0,58	38±0,58	6 ± 0

Antibiyotik direncinin belirlenmesi için kullanılan disklerin çapı 6 mm olduğu için zon oluşturmayan örneklerin inhibisyon zonu 6 mm olarak belirtilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.12. *B. kiyakii* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin antibiyotik direnç profilleri (mm)

Koloniler	Kanamisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin	İmipenem	Ampisilin
BKE 1	21,7±0,153	8,7±0,58	22,3±0,58	46±1	6 ± 0
BKE 2	21,6±0,12	8,8±0,01	23,3±0,01	46±0,01	6 ± 0
BKE 3	26,3±1,15	13,7±1,53	42±2	45,7±1,15	6 ± 0
BKE 4	26,7±1,53	12±0	30±0	49±1	6 ± 0
BKE 5	22,3±0,58	20±0	26,7±1,53	40±2	6 ± 0
BKE 6	29±1	14,7±0,58	41,7±1,53	50±0	6 ± 0
BKE 8	30,3±0,58	13,3±3	44,3±1,15	56±1	6 ± 0
BKE 9	27±0	11,7±1,53	40±0	49,7±0,58	6 ± 0
BKE 10	28,3±1,53	10±0	35±0	50±0	6 ± 0
BKE 11	24±1	18,7±1,15	30,3±0,57	40,7±0,57	11,3±0,57
BKE 12	25±0	10±0	19,3±3,05	43,3±3,05	6 ± 0
BKE 13	27,7±2,52	13,3±2,08	34,3±2,08	52,7±2,53	6 ± 0
BKE 14	23,3±0,57	11,7±1,53	36,3±2,52	43,3±3,05	6 ± 0
BKE 15	25,3±0,58	22,7±0	12,7±2,52	33,0±0	6 ± 0
BKE 16	22,7±2,52	12,7±0,58	33±2,64	40,7±1,15	14,0±1,73
BKE 17	23±0	9± 0	32±2	41,0±1	6 ± 0
BKE 18	23±1	10±0	34±0	41,3±3,21	6 ± 0
BKE 19	30,1±2	25,2±0	45±2,1	50±0	19±0
BKE 20	28,3±0,58	11±1	35±3	51±1	6 ± 0
BKE 21	20±0	33,3±0,57	32,3±1,15	50±0	22,7±2,52
BKE 22	24±2,10	32,6±2,01	35±4	44,6±3,1	14,3±1
BKE 23	23,3±1,53	10±0	34,7±2,52	49±1	6 ± 0
BKE 24	19,3±0,58	9±1	26±1	39,3±0,58	8,3±0,58
BKE 25	22,7±0,58	16,7±3,05	29,7±0,57	41±1	12,7±2,52
BKE 26	25,3±0,58	11,7±1,53	37,0 ±1	50,3±0,058	6 ± 0
BKE 27	21,3±0,58	11,3±0,05	40±0	48,3±1,15	25,0±0
BKE 28	21,7±4,04	10,7±1,15	34,7±0,58	41,7±1,53	11,0±1
BKE 29	27,7±4	12,7±1,15	40±0	46,3±1,15	6 ± 0
BKE 30	20,3±0,57	16±0	22,7±2,52	44±1,73	6 ± 0
BKE 31	22±0	20,3±1,53	31±1	40±1	6 ± 0
BKE 32	30±0	15±0	40±0,1	25,3±0,58	6 ± 0
BKE 33	30±0	13,7±0,58	45±0	55±0	6 ± 0
BKE 34	23±0	18±1	26,0±1	45±0	6 ± 0
BKE 35	22±1	18±1	23,0±2,65	45±0	6 ± 0
BKE 37	29±1	12±1	44±1	51,3±0,58	6 ± 0
BKE 38	26,7±1,25	9,7±0,47	31,7±0,47	45±0	6 ± 0
BKE 39	20±0	36±1	35±0	40±1	6 ± 0
BKE 40	25,7±0,58	21±1	30±0	40,3±0,58	6 ± 0
BKE 41	26,3±0,58	10,7±0,58	40±0	34,3±0,58	6 ± 0
BKE 43	27±1	9,3±0,58	30±0	48,0±1	6 ± 0
BKE 45	29±1	10±0	38±2	52,6±2,52	6 ± 0
Kontrol	15,7±0,58	30±0,2	24,2±0,58	38±0,58	6 ± 0

Antibiyotik direncinin belirlenmesi için kullanılan disklerin çapı 6 mm olduğu için zon oluşturmayan örneklerin inhibisyon zonu 6 mm olarak belirtilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama ± standart sapması olarak ifade edilmiştir.

4.8. PGPB Aktivitesi Yüksek Bakterilerin Seçimi

Çalışma kapsamında izole edilen tüm bakterilerin tüm deneyler birbirinden bağımsız olacak şekilde fosfat çözebilme kapasiteleri, IAA, siderofor ve ACC üretimleri bakımından değerlendirilmiş ve tüm bu testlerde en yüksek skoru veren bakteriler seçilmiştir. Toplam PGPB puanları baz alınarak 38 bakteri moleküler olarak tanımlanmak için seçilmiştir (Çizelge 4.13, Çizelge 4.14).

Çizelge 4.13. *B. kiyakii* bitkisinden izole edilen rizobakterilerin PGPB puanlaması

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Aktivitesi (mm)	ACC Deaminaz Üretimi	Toplam PGPB Puanı
BKR 5	14,34±0	47±0,37	14±0	-	3
BKR10	36,46±0,3	39±0,15	17±0,12	-	3
BKR 11	38,63±0	25±0,24	22±0,5	-	3
BKR 24	36,44±0	0±0	26±0,06	+	3
BKR 25	15,53±0	0±0	22±0,06	+	3
BKR 30	14,36±0,01	38±0,15	21±0,06	-	3
BKR 34	11,34±0,23	37±0,12	20±0,23	+	3
BKR 8	21,95±0,01	25±0,12	14±0,12	-	2
BKR 9	4,07±0	38±0,03	25±0,15	-	2
BKR 16	14,34±0,1	33±0,60	0±0	+	2
BKR 27	9,88±0,4	39±0,1	22±0	-	2
BKR 33	10,05±0	38±0,26	22±0,06	-	2
BKR 36	14,55±0	26±0,11	0±0	-	2
BKR 15	11,05±0,1	32±0,03	0±0	-	1
BKR 22	8,28±0	26±0,016	0±0	+	1
BKR 29	1,16±0	35±0,6	7±0,1	-	1
BKR 32	12,30±0	29±0,32	8±0	-	1
BKR 43	8,90±0,01	0±0	0±0	-	1
BKR 1	11,56±0	0±0	8±0,06	-	0
BKR 23	5,25±0,1	0±0	0±0	-	0
BKR 26	10,61±0	0±0	0±0	-	0
BKR 38	8,96±0	0±0	10±0	-	0
BKR 41	2,02±0	0±0	9±0	-	0
Ortalama	14,36	23,56	11,86		

Çizelge 4.14. *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen endofitik bakterilerin PGPB puanlaması

Koloniler	İndol Üretimi (PPM)	Fosfat Çözme Kapasitesi (mm)	Siderofor Aktivitesi (mm)	ACC Deaminaz Üretimi	Toplam PGPB Puanı
NBE 1	102,9±0,17	40±0,23	12±0,06	+	4
NBE 9	67,3±0,06	25±0,03	8±0,06	-	3
NBE 7	87,5±0,25	35±0,20	7±0,06	-	2
NBE 8	66,5±0,03	25±0,03	4±0,06	+	2
NBE 20	54,7±0,02	30±0	4±0,06	-	2
NBE 21	46,8±0,01	30±0,08	12±0,52	-	2
NBE 28	53,8±0,01	28±0,03	8±0,06	-	2
NBE 29	28,4±0,02	29±0,12	8±0,06	-	2
NBE 31	49,6±0	34±0,06	9±0,06	-	2
NBE 2	30,2±0,01	29±0,11	7±0,06	+	1
NBE 3	46,7±0,02	39±0,06	7±0,06	-	1
NBE 4	28,2±0	37±0,29	7±0,06	-	1
NBE 10	45,0±0,02	21±0,07	8±0,06	-	1
NBE 11	49,4±0	30±0,08	8±0,06	-	1
NBE 12	30,9±0,01	25±0,18	11±0,06	-	1
NBE 13	66,5±0,01	24±0,11	4±0,06	-	1
NBE 15	26,0±0	35±0,06	7±0,06	-	1
NBE 16	36,6±0,02	22±0,06	7±0,06	-	1
NBE 17	84,4±0,19	27±0,07	7±0,10	-	1
NBE 18	42,0±0,01	27±0,15	10±0,06	-	1
NBE 19	84,0±0,08	25±0,05	4±0,06	-	1
NBE 22	27,9±0,01	24±0,05	6±0,06	-	1
NBE 23	19,4±0,01	31±0,14	4±0,06	-	1
NBE 30	53,3±0	23±0,09	7±0,06	-	1
NBE 6	51,1±0,02	25±0	7±0	-	0
NBE 14	30,9±0,01	25±0,03	4±0,06	-	0
NBE 24	30,8±0,01	24±0,03	7±0,06	-	0
NBE 27	23,6±0,01	27±0,46	7±0,06	-	0
Ortalama	52	29	8		

4.9. Seçilen İzolatların Moleküler Tanımlanması

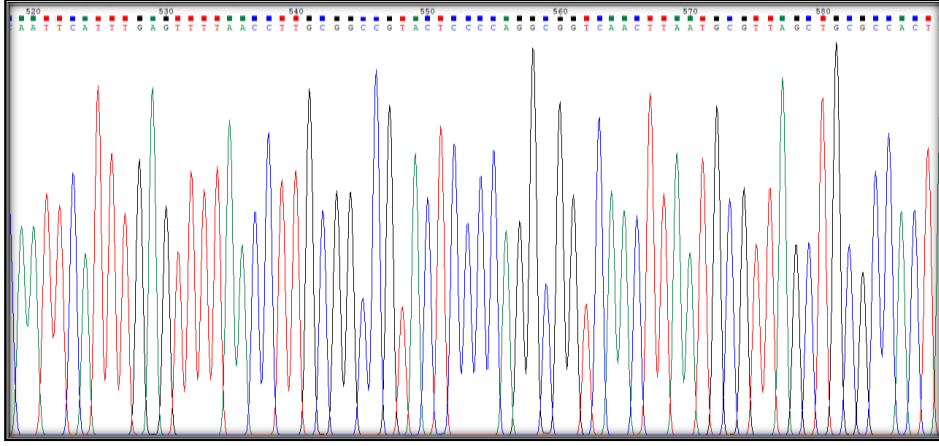
Seçilen bakterilerin genomik DNA izolasyonları yapılmış ve ardından elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Elde edilen genomik DNA örneklerinin 16S rRNA gen bölgeleri PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Reaksiyon sonunda PZR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş ve görüntüleme sonucunda bakteriler için sekans analizi yapılmıştır (Şekil 4.6-4.8). Sekans analizleri sonucunda elde edilen sonuçlar NCBI veri tabanında taranarak tanımlanan bakteriler Çizelge 4.15-4.18' de verilmiştir.



Şekil 4.6. *N. birolmutlui* bakterilerinin PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA Merdiveni)



Şekil 4.7. *B. kiyakii* bakterilerinin PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA Merdiveni)



Şekil 4.8. NBR8 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü

Çizelge 4.15. *N. birolmutlui* endofitik bakterilerinin kimlik tanımlaması

Örnek	Bakterinin adı	Giriş numaraları
NBE1	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1
NBE9	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1
NBE10	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1
NBE13	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1
NBE17	<i>Pantoea</i> sp.	NR_041978.1
NBE21	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1
NBE31	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1

Çizelge 4.16. *N. birolmutlui* rizobakterilerinin kimlik tanımlaması

Örnek	Bakterinin adı	Giriş numaraları
NBR1	<i>Priestia aryabhatai</i>	NR_115953.1
NBR2	<i>Pantoea</i> sp.	NR_116247.1
NBR3	<i>Priestia aryabhatai</i>	NR_115953.1
NBR4	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	NR_024951.1
NBR5	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	NR_024951.1
NBR6	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_116299.1
NBR9	<i>Pseudomonas baetica</i>	NR_116899.1
NBR10	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_181810.1
NBR12	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_181810.1
NBR13	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	NR_181810.1
NBR14	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	NR_024951.1

Çizelge 4.17. *B. kiyakii* endofitik bakterilerinin kimlik tanımlaması

Örnek	Bakterinin adı	Giriş numaraları
BKE1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neoaureantiaca</i>	NR_025686.1
BKE4	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neoaureantiaca</i>	NR_025686.1
BKE8	<i>Achromobacter</i> sp.	NR_152014.1
BKE20	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	NR_152214.1
BKE31	<i>Achromobacter</i> sp.	NR_152014.1
BKE35	<i>Acinetobacter courvalinii</i>	NR_148843.1
BKE43	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	NR_181810.1

Çizelge 4.18. *B. kiyakii* rizobakterilerinin kimlik tanımlaması

Örnek	Bakterinin adı	Giriş numaraları
BKR5	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_181729.1
BKR9	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_181729.1
BKR10	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_181729.1
BKR11	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	NR_181810.1
BKR22	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	NR_181810.1
BKR24	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	NR_181729.1
BKR25	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_181729.1
BKR27	<i>Pseudomonas glycinis</i>	NR_181729.1
BKR30	<i>Acinetobacter courvalinii</i>	NR_148843.1
BKR33	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_025686.1
BKR34	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_025228.1
BKR36	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	NR_042263.1
BKR38	<i>Acinetobacter</i> sp.	NR_148843.1

5. TARTIŞMA

Serpantin topraklar sınırlı su tutma kapasitesine sahip, yüksek oranda Ni, Cr, Co gibi ağır metalleri ve düşük oranda Ca, K ve P gibi elementleri içeren metamorfik ana kayaların ayrışması sonucu elde edilen topraklardır (Van Ent vd. 2018). Bu topraklar stres koşullarına bağlı olarak, serpantin endemizmine uyum sağlayabilen ve hiperakümülyasyon yeteneğine sahip çeşitli biyotaları içermektedir (Seneviratne vd. 2017; Sianta ve Kay 2019). Ortamdaki ağır metal ve besin stresi gibi zorlu ortam koşullarına karşı bitki bünyesinde bulunan bakteriler; IAA, ACC deaminaz, fosfat çözebilme yetenekleri ve siderofor üretimi ile bitki gelişimini uyarırken, yine bu bakteriler antimikrobiyal ajanların üretimi ile de fitopatojenlerin çoğalmasını engellemektedir. (Talavera vd. 2007). Böylelikle *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Azospirillum* gibi birçok bitki gelişimini destekleyen bakteri türleri zorlu ortam koşullarına karşı bitkilerin hayatta kalmasını sağlayacak mekanizmalar içermektedir (Kang vd. 2021).

Bu çalışmada serpantin endemiği *B. kiyakii* ve *N. birolmutlui* hiperakümülatör bitkileri incelenmiştir. Bu bitkilerin bünyesinde bulunan PGPB ile ilgili literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu bitkilerden endofitik bakteriler ve rizobakteriler olmak üzere toplam 105 adet bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin IAA üretimi, fosfat çözme kapasiteleri, ACC deaminaz ve siderofor üretme potansiyelleri ile birlikte ağır metal ve antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir. İzole edilen tüm bakterilerin PGPB aktiviteleri değerlendirildiğinde neredeyse tamamının IAA ürettiği ve bu bakterilerin %18'inin ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca rizobakterilerin %74'ü, endofitik bakterilerin %61 kadarı siderofor üretmektedir. Benzer şekilde endofitik bakterilerde %60 kadarında, rizobakterilerin de %77 kadarında fosfat çözme yeteneği olduğu görülmüştür. Her ne kadar rizobakterilerde bahsedilen PGPB özelliklerine sahip koloniler daha çok gözüксе de *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen endofitik bakteri çeşitliliğinin az olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Rizobakterilerin fosfat çözme ve siderofor üretme kapasitelerinin daha yüksek olması, bunların bitki köklerinde endofitik bakterilere kıyasla demir ve fosfat bileşiklerine daha kolay ulaşabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Böylece rizosferdeki PGPR'ler bu yetenekleri ile ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilirken, bitki ile de etkileşime girerek kök bölgesinde daha rahat kolonize olabilirler (Hayat vd. 2010; Masciarelli vd. 2014). Ayrıca literatürde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde bitki rizosferlerinin besin açısından zengin olduğu ve buna bağlı olarak rizobakteri sayılarının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Hartmann vd. 2008). Ancak bu tez çalışmasında rizobakterilere kıyasla daha fazla endofitik bakteri kolonisi izole edilmiştir. Söz konusu bu durumun rizobakterilerin çevresindeki makro ve mikro canlı grupları ile sürekli iş birliği içinde olmasından ve buna bağlı olarak laboratuvar koşullarında kültüre edilememelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüm PGPB testleri değerlendirildiğinde PGPB aktivitesi bakımından en iyi aktivite gösteren 38 bakteri seçilerek bunlar cins ve tür düzeyinde tanımlanmıştır. Söz konusu her iki bitkinin endofit ve rizosferlerinden elde edilen *Pseudomonas* bakterileri *Proteobacteria* olarak adlandırılan yakın zamanda yeniden adlandırılarak *Pseudomonadota* filumuna ait, yaklaşık olarak 1-5 µm uzunluğunda, çubuk formda, hareketli ve gram negatif bakterilerdir (Weller 2007; Oren ve Garrity 2021). *Pseudomonaslar*, zorlu ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahip bakteriyel patojenleri de içeren 250'den fazla türe sahip bir bakteri grubudur. *Pseudomonas* sp.

simbiyotik ilişki içinde yaşama yeteneğine sahip, topraklarda ve bitkilerin rizosferlerinde bol miktarda bulunan bakteri cinslerindendir ve PGPB özellikleri bakımından çok çalışılan bakteri gruplarından biridir (Gross vd. 2009; Zboralski vd. 2022). Bazı patojenik suşları dışında *Pseudomonas* cinsleri bakteri ve mantar gibi bitki patojenlerinin antogonisti olarak işlev gören fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz aktiviteleri IAA ve siderofor üretimleri ile ekolojik olarak önemli bir bakteri grubu haline gelmektedir.

B. kiyakii rizosferinden izole edilen *P. glycinis* (BKR27) ilk olarak 2021 yılında Massachusetts’de bir *Vaccinium macrocarpon* bitkisinden izole edilerek tanımlanmıştır. *P. glycinis* hareketli, 1-2 µm uzunluğunda kısa çubuk şeklinde gram negatif bir bakteridir. Özellikle yeni tanımlanmış bir tür olması dolayısıyla bakteri ile ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Chouhan vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada buğdaydan izole edilen endofitik bakterilerden BHUJPV-WRO5 olarak adlandırılan suşun yapılan *in vitro* testlerde fosfat çözme yeteneğinin olduğu, bunun yanında IAA, siderofor ve amonyak üretimi yapabildiği gösterilmiştir. Bakteri moleküler düzeyde tanımlanmaya çalışıldığında ise hem *P. glycinis*’e hem de *P. koreensis*’e de benzerliğinden dolayı *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada da BKR33 izolatından elde edilen 16S rRNA gen sekansının analizi sonucunda bakterinin yüksek oranda *P. koreensis* ve *P. glycinis*’e benzerlik göstermesinden dolayı izolat *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında izole edilen *P. glycinis*’in (BKR27) fosfat çözme yeteneğinin olduğu, siderofor ve IAA ürettiği görülmüştür. (Çizelge 4.4). Antibiyotik ve ağır metal dirençleri incelendiğinde ampisilin haricindeki antibiyotiklerin tamamında zon oluşturduğu ve çeşitli ağır metallere dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.8, Çizelge 4.11). Bu sonuçlar tıpkı diğer *Pseudomonas* cinsleri gibi bu bakterinin de bitki gelişimini destekleyen iyi bir tür olduğunu düşündürmektedir (Gomes vd. 2013; Gomes vd. 2013).

B. kiyakii rizosferinden izole edilen *P. koreensis* (BKR5, BKR9, BKR10) bakterisi ilk olarak Kore’de kontamine topraklardan izole edilmiştir (Kwon vd. 2003). Çin, Japonya ve Kore’de kontamine topraklarda fitoremediasyon çalışmalarında önemli bir yere sahip olan *Miscanthus sinensis* bitkisinin iç dokularından izole edilen *P. koreensis*’in IAA, ACC deaminaz üretebilmesinin bitkinin katalaz, süper oksit dismutaz enzim aktivitelerini ve Cd, Pb, Cu, Zn ağır metallerine toleransını arttırdığı görülmüştür (Babu vd. 2015). Başka bir çalışmada ise *P. koreensis* S150 suşunun, kök gelişimi için farklı IAA sentez yollarına ve ACC deaminazı kodlayan *acdS* genine sahip olduğu böylelikle artan etilen miktarını azaltarak kök gelişimini destekleyebileceği ve patojenik enfeksiyonlara karşı bitki toleransını artırabileceği öne sürülmüştür (Glick, 2014). Bu çalışmadaki sonuçlarla benzer şekilde Chouhan vd. (2023) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *P. koreensis* bakterisinin siderofor, IAA üretimi ve fosfat çözme yeteneği ile konak bitkinin gelişimini, tohum içeriğini, bitkinin bulunduğu ortamdaki toprak verimliliğini ve kalitesini artırma potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir.

N. birolmutlui rizosferinden izole edilen *P. thivervalensis* (NBR4, NBR5, NBR13, NBR14) ile yapılan çalışmalarda ACC deaminaz aktivitesi ile bitkilerin çeşitli stresler sonrasında sürgünlerinin azot içeriğinin, fotosentez hızının ve stoma iletkenliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Long vd. 2008). Ayrıca yetersiz Fe içeren ortamlarda *P. thivervalensis*’in *histicorrugatin* ve *pyoverdine* adı verilen siderofor molekülleri ürettiği bilinmektedir. Ürettikleri siderofor molekülleri ile oksijen ve nitrojen metabolizması, elektron transferi gibi hücresel faaliyetlerde kritik önem taşıyan demiri hücre içine alarak

bitki patojenlerini demirden mahrum bırakarak gelişimini engellemektedir (Braun 1997; Lemanceau vd. 2009). Bu tez çalışmasına benzer şekilde Nascimento vd. (2021) elde ettiği verilere göre *P. thivervalensis*'in fosfat çözme, ACC deaminaz aktivitesi, siderofor ve IAA üretim yeteneklerine sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada da NBR10 ve NBR12 izolatlarından elde edilen 16S rRNA gen sekanslarının analizi sonucunda bakterilerin yüksek oranda *P. thivervalensis* ve *P. canavaninivorans* çıkması sebebiyle izolatların türleri tam olarak belirlenememiş ve *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların da diğer *Pseudomonas* türleri gibi fosfat çözme, IAA ve siderofor üretme yetenekleri ile bitki gelişimini teşvik ettiren doğal yöntemlere iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.1).

Bu çalışmada *B. kiyakii* rizosferinden izole edilen *P. canavaninivorans* (BKR11, BKR22, BKR24) 2022 yılında fasulye rizosferinden izole edilerek tanımlanan fakültatif aerob, çubuk şeklinde, gram negatif, oksidaz ve katalaz pozitif bir bakteridir (Hauth vd. 2022). *P. canavaninivorans* baklagil tohumlarında otçullara ve patojenlere karşı toksik bir kovucu olarak üretilen kanavanin aminoasidini parçalama yeteneği sayesinde, kanavanini karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahip bir mikroorganizmadır (Hauth vd. 2022; Hauth vd. 2023). *P. canavaninivorans* ile ilgili literatürde PGPB aktiviteleri hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu tez çalışması ile bu bakterinin fosfat çözme yeteneği, ACC deaminaz aktiviteleri, IAA ve siderofor üretimi ile bitki gelişimini destekleyebilecek bir aday olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.4).

B. kiyakii endofitlerinden izole edilen *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* (BKE1, BKE4) gram negatif çubuk şeklindeki, 1,0 – 1,5 µm uzunluğunda ve yaklaşık 0,3–0,8 µm çapında bir bakteridir (Achouak vd. 2000). Diğer *Pseudomonas* türleri gibi *P. brassicacearum* subsp. *neoaurantiaca* bakterisinin de IAA, siderofor üretme ve fosfat çözme yeteneğine sahip olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Morrissey vd. 2002). Örneğin Jiménez vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *Brassica napus* bitkisinden izole edilen siderofor üretme ve fosfat çözme aktivitesine sahip *P. brassicacearum* bakterisinin tarla denemelerinde bitki kuru ağırlığını ve gelişimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ek olarak Zhou vd. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda da domates rizosferlerinden izole edilen *P. brassicacearum* J12 suşunun HCN, siderofor, proteaz ürettiği ve fosfat çözme aktivitesine sahip olduğu ayrıca pek çok bitki patojenine ana etmeni olan *Ralstonia solanacearum*'a karşı ürettiği 2,4-DAPG ile patojen gelişimini önemli derecede inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca Zn ile kontamine topraklarda *Brassica* bitkisinin *P. brassicacearum* ile aşılandığında ağır metalle kontamine olmuş topraklarda iyi bir ağır metal akümülatörü olabileceği sonucuna varılmıştır. (Ebbs vd. 1998; Gomes vd. 2013; Gomes vd. 2013).

N. birolmutlui rizosferinden izole edilen *P. baetica* İspanya'daki bir su ürünleri tesisinde balık patojeni olarak izole edilen organizmalardan biridir (López vd. 2012). Tıpkı diğer *Pseudomonas*'lar gibi gram negatif, hareketli ve basil hücrelerdir. Tüm genom dizilimi incelendiğinde *P. koreensis* ve *P. floresanlar* ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek toksisiteye sahip civa (Hg) ile kontamine alanlarda yetişen *Lupinus albus* bitkisini *P. baetica* ile aşılandığında bitkideki Hg konsantrasyonunun azaldığı ve artan ROS konsantrasyonunun dengelenerek bitki gelişiminin desteklendiği görülmüştür (González vd. 2022). Bu çalışma kapsamında elde edilen *P. baetica* izolatında IAA, siderofor üretme ve ACC deaminaz aktivitesine sahip

olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Ek olarak *P. baetica* olarak tanımlanan NBR9 izolatinın *N. birolmutlui* rizobakterilerinin arasında 40 mm fosfat çözme kapasitesi ile en yüksek zonlu oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada tanımlanan tüm *Pseudomonas* türlerinin antibiyotik direnç profillerine bakıldığında en büyük inhibisyon zonunu imipenem antibiyotiği oluşturmuştur. Kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin antibiyotiklerinin oluşturduğu inhibisyon zonunun çaplarının birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12). Ek olarak *P. canananivorans*'ların ve *P. thirvervalensis* olarak tanımlanan NBR4 kolonisi dışındaki tüm *Pseudomonas* türlerinin ampisilin antibiyotiğinin inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir. *Pseudomonas* bakterilerinin ağır metal direnç profili incelendiğinde ise genellikle yalnızca *P. brassicacearum* bakterisinin Ni ve Al (5 mM) ağır metallerine karşı dirençli olduğu diğer *Pseudomonas* cinslerinin Ni, Al, Pb ve Cu (1 mM) ağır metallerine karşı dirençli olduğu ve Cd ağır metaline karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). Sonuç olarak bu çalışma kapsamında tanımlanan tüm *Pseudomonas* cinslerinin yüksek PGPB aktivitelerinin yanı sıra çoklu antibiyotik ve ağır metal dirençleri ile de konaklarını biyotik ve abiyotik streslere karşı daha iyi koruyabilecekleri ve bitki gelişimi için önemli türler olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada genellikle *N. birolmutlui* bitkisinin endofitlerinden izole edilen ve Enterobacteriaceae familyasına ait *Pantoea* cinsi bakteriler, toprak ve su dahil olmak üzere farklı alanlarda bol miktarda bulunan ve şu anda 19 farklı türü içeren gram negatif aerobik bakterilerdir (Kim vd. 2011). *Pantoea* üyelerinin bir kısmı bitki patojeni olmakla birlikte bazılarının da bitki gelişimini önemli derecede arttıran aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Quecine vd. 2012). Örneğin *P. agglomerans*'ın mısır bitkisinde sap çürüklüğü, ceviz ağaçlarında yanık, kiraz ağaçlarında meyve lekesi hastalığı gibi çeşitli bitki hastalıklarının nedeni olduğu bilinmektedir (Wang vd. 2016; Xu vd. 2017). Buna rağmen toprakta bol miktarda bulunan *P. agglomerans*, *P. alli* ve *P. vagans* türlerinin buğday ve mısır gibi çeşitli bitkilerde IAA, siderofor üretimi ve ACC deaminaz aktiviteleri ile bitki gelişimini desteklediğini gösteren bir çok çalışma mevcuttur (Morel ve diğerleri, 2011; Chen vd. 2019; Liu vd. 2019). Ayrıca bu tez çalışmasında elde edilen *Pantoea* cinslerinin Ni (5 mM-10 mM) ve Pb, Cr, Cu ve Al (1mM) ağır metallerine karşı dirençli (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6) ve antibiyotiklerin tamamının inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10). Bu çalışma sonucunda *Pantoea* cinslerinin PGPB özellikleri ve ağır metal dirençlerinden dolayı sert çevre koşullarında biyogübre olarak kullanılmasının iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada *B. kiyakii* rizosferinden elde edilen *M. Hydrocarbonoxydans* (BKR36) ilk olarak Almanya'da petrolle kirlenmiş bir topraktan izole edilen Microbacteriaceae ailesine ait zorunlu aerobik, spor oluşturmayan, gram pozitif, hareketli hücrelerdir. Hücre kolonileri yarı saydam ve sarı pigmentli olmakla birlikte 0,3–1,5 µm boyutlarında çubuk formundadır (Schippers vd. 2005). Corretto vd. (2020) tarafından yapılan bir araştırmada, ağır metal kontaminasyonu olan çeşitli konakçılardan ve alanlardan *Microbacterium* cinsine ait 20 farklı bakterinin PGPB aktiviteleri ve ağır metal direnci incelenmiştir. Çalışma sonucunda genel olarak izolatların yarısından fazlasının IAA üretme ve fosfat çözme yeteneğine sahip olduğu ve test edilen bakterilerin %41'inin CAS testinde siderofor pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Ayrıca, kontamine bölgelerden izole edilen *Microbacterium* cinslerinin, ağır metaller ve diğer streslere (örn. nitrat,

organik çözücüler ve pH) karşı direnç kazandıran gen sayısının fazla olduğu rapor edilmiştir (Hemme vd. 2010). Ayrıca *M. hydrocarbonoxydans*'ın antibiyotik dirençleri incelendiğinde antibiyotiklerin tamamının zon oluşturduğu görülmektedir (Çizelge 4.11). Ağır metal dirençleri incelendiğinde de Ni, Al, Cu ve Pb (1mM) ağır metallerine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Genel olarak elde ettiğimiz veriler ve literatürdeki bilgiler incelendiğinde yüksek PGPB aktivitesine sahip *M. hydrocarbonoxydans* bakterileri bitki gelişiminde önemli bir yere sahip olabileceği ve ağır metalleri bitkilerin hasat edilebilir kısımlarında yoğunlaştırmaları ile toprakların temizlenmesinde iyi bir avantaj sağlayabileceği sonucuna varılmaktadır (Garbisu ve Alkorta 2001; Wenzel 2009).

Bu çalışmada *B. kiyakii* rizosferinden ve endofitlerinden izole edilen *Acinetobacter* (BKR30, BKR38) sp. Gammaproteobacteria sınıfına ait su ve toprak olmak üzere çeşitli alanlardan izole edilebilen, özellikle hastane kaynaklı fırsatçı patojenleri de içeren mukoid ve gram negatif bir bakteri cinsidir (Peleg vd. 2008). Bakteriler tipik olarak logaritmik fazda çubuk şeklinde iken durağan fazda kokobasil forma geçebilmektedir. Bu nedenle morfolojik özelliklerine bakıldığı zaman yanlış tanımlanabilmektedir. Özellikle bu bakterilerin bazı türleri yüksek antibiyotik dirençleri sayesinde neden oldukları hastalıkların tedavi edilemez duruma gelmesini sağlamaktadır (Schreckenberger 2004; Peleg vd. 2008). Abbas vd. (2020) tarafından yapılan Cd stresi altında yetişen mısır bitkilerinin *Acinetobacter* sp. ile aşıl原因an bitkilerin K, Ca ve Mg içeriklerinde ve bitki biyokütlelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Böylelikle çeşitli streslere sahip bitkilerin ACC aktivitesi olan şuşlar ile aşılandığı durumlarda, strese karşı artan inhibitör ET miktarını azaltarak bitki gelişimini arttırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde *Acinetobacter* sp. şuşlarının siderofor ve IAA üretim yetenekleri ile bitki için daha iyi besin ve kök gelişimi sağladığı belirtilmiştir (Afridi vd. 2019; Belimov vd. 2019). Çalışma sonucunda *Acinetobacter* sp. olarak tanımlanan bakterilerin antibiyotik ve ağır metal direnç profilleri incelendiğinde en büyük inhibisyon zonunu imipenem antibiyotiği oluştururken, ampisilinin bir zon oluşturmadığı ve Ni, Cu, Al, Cr ve Pb (1mM) ağır metallerine karşı dirençli olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.7, Çizelge 4.11).

N. birolmutlui rizosferinden elde edilen *P. aryabhatai*, (NBR1, NBR3) Bacillaceae familyasına ait bir bakteridir. Bu bakteri eskiden *B. aryabhatai* olarak adlandırılan ve doğada yaygın olarak bulunan ve ilk kez kriyojenik tüplerden izole edilen gram pozitif bir bakteridir (Gupta vd. 2020; Shivaji vd. 2009). Bilindiği üzere bitki büyümesi üzerine en çok çalışılan ve bitki gelişimi için iyi bir potansiyele sahip olan bakteri gruplarından bir diğeri de *Bacillus* cinsi bakterilerdir (Gupta vd. 2020). Yapılan çalışmalarda *P. aryabhatai*'nin bitki büyümesini etkileme ve çevresel uyaranlardan kaynaklanan stresi önleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Bhattacharyya vd. 2017). Deng vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada mısır bitkisinden izole edilen *P. aryabhatai* şusunun IAA üretme ve fosfat çözme yeteneğine sahip olduğu ve bitki gelişimini arttırdığı incelenmiştir. Khianngam vd. (2023) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *P. aryabhatai* B8W22 MG9 şusunun IAA üretim yeteneği ile bitki gelişimini arttırdığı ve dışarıdan triptofan takviye edildiğinde yüksek IAA verimi gösterdiği tespit edilmiştir. Böylelikle bitki gelişimi için kimyasal olarak takviye edilen hormon ilaçlarının yerini alabileceği düşünülmektedir. Rungsihiranrut vd. (2023) tarafından yapılan başka bir çalışmada *P. aryabhatai* B8W22'nin petrol hidrokarbonlarını parçalama ve ağır metalleri tolere edebilme yeteneğine sahip olduğu

tespit edilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda da *P. aryabhatai* suşlarının PGPB aktiviteleri, ağır metal ve antibiyotikler dirençleri değerlendirildiğinde antibiyotiklerin tamamının inhibisyon zonu oluşturduğu ve çeşitli ağır metallere karşı direnç gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.5, Çizelge 4.9). Böylelikle *P. aryabhatai*'nin ağır metal direnci, IAA ve siderofor üretim yetenekleri ile de kontamine alanlarda tercih edilebilecek iyi bir aday olduğu düşünülmektedir.

B. kiyakii endofitlerinden izole edilen *Achromobacter* sp.'ler (BKE8, BKE31) Burkholderiales takımına ait, suda ve toprakta bulunan gram negatif basillerdir (Bergey vd. 1923). BKE8 ve BKE31 izolatlarının 16 S rRNA sekans analizi sonucunda bakterilerin birden çok *Achromobacter* türüne yüksek oranda benzemesi nedeniyle bu bakteriler çalışmada *Achromobacter* sp. olarak tanımlanmıştır. *Achromobacter* sp.'ye ait birçok PGPB çalışması vardır. Örneğin; Ma vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışma ile farklı Cu konsantrasyonları altında *Brassica juncea* bitkisinden izole edilen *A. xylosoxidans* türünün PGPB aktiviteleri incelenmiş ve ACC'yi tek azot kaynağı olarak kullandığı ve bununla birlikte fosfat çözme ve IAA üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Nascimento vd. (2021)'nin yaptığı başka bir çalışmada ise farklı *Achromobacter* cinslerinin IAA, SA üretimi ve ACC deaminaz aktiviteleri ile bitkilerde hormon regülasyonunun sağlanmasına yardımcı oldukları belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada PGPB aktivitelerine ek olarak pektinaz, kitinaz ve amilaz gibi çeşitli enzim üretme yenekleriyle patojenlere karşı da bitki gelişimini destekleyebilecekleri rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında da *Achromobacter* sp.'lerin IAA, siderofor ve ACC aktivitesine sahip olduğu gözlemlenirken kullanılan birçok antibiyotik'in inhibisyon zonu oluşturduğu ve çoklu ağır metal direncine sahip olduğu bulunmuştur.

6. SONUÇLAR

Tarımda verimi arttırmak amacı ile gübre ve pestisit gibi çeşitli kimyasalların kullanımı yer altı sularında ve toprakta birikime neden olmuş ve bu durum birçok canlı ekosistemini tehdit eder hale gelmiştir. Bu tehdide karşı hiperakümülatör bitki türleri kullanılarak metalle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu ağır metallerin topraklardan uzaklaştırılması için çevre dostu ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Khalid vd. 2004; Pareek vd. 2020). Yapılan araştırmalar metallerin topraktan alınması ve sürgünlere taşınmasında bitki bünyesinde bulunan PGPB'nin kullanımının iyi bir alternatif olduğunu göstermiştir. Bitki bünyesinde bulunan mikroorganizmalar çekirdek algılama mekanizmaları ile birbirleriyle ve VOC'ler aracılığı ile de konak bitki ile sürekli etkileşim halinde olmaktadır (Saraçlı 2006; Danhorn vd. 2007). Biyolojik mücadelede önemli bir yere sahip olan PGPB, bitki ile kurduğu iletişimler sonucunda hormon üretimi, fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz aktivitesi ve antimikrobiyal ajanların üretimini sağlayarak bitki savunma ve gelişimini destekleyebilmektedir (Kloepper 1978; Lugtenberg ve Kamilova 2009).

Yapılan bu çalışmada Brassicaceae familyasına ait serpantin endemiği *N. birolmutlui* ve *B. kiyakii* bitkileri kullanılmıştır. Söz konusu bitkilere ait endofitik bakterilerin ve rizobakterilerin saf kültürleri elde edilerek bunların PGPB aktiviteleri, ağır metal ve antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir. Uygulanan tüm testler sonucunda *N. birolmutlui*'ye ait endofitik ve rizobakterilerin tamamının fosfat çözme ve siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca IAA üretimleri tüm çalışma kapsamında değerlendirildiğinde *N. birolmutlui* bitkisinden izole edilen bakterilerin en yüksek IAA üretimine sahip olduğu görülmüştür. *B. kiyakii* bitkisinden ise endofitik bakterilerin ve rizobakterilerin yarısının fosfat çözme ve siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca *B. kiyakii*'den izole edilen bakterilerin neredeyse tamamının IAA ürettiği gözlemlenmiştir. Genellikle tüm bakterilerin çoklu ağır metal direnci (Ni, Al, Cu, Cr ve Pb) gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların antibiyotik direnç profilleri değerlendirildiğinde antibiyotiklerin çoğunun (imipenem kanamisin, kloramfenikol ve tetrasiklin) inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür.

Bulunan sonuçlara göre en iyi PGPB aktivitesi gösteren 38 bakteri seçilerek bu bakteriler moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Tanımlama sonuçlarına göre her iki bitkiden izole edilen PGPR'nin tür çeşitliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür. Endofitik bakteriler incelendiğinde ise *N. birolmutlui* bitkisinden yalnızca *Pantoea* cinsi bakteriler, *B. kiyakii* bitkisinden ise *Acinetobacter*, *Achromobacter* ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Bitkilerin gelişim gösterdiği toprak özellikleri ve iklim şartları benzer olsa da *B. kiyakii*'den izole edilen endofitik bakterilerin tür çeşitliliğinin fazla olması bu bitkinin etrafında karaçam ağaçlarının, *N. birolmutlui*'nin etrafında ise sedir ağaçlarının olmasından kaynaklanabilir. Örneğin Sawada vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada sedir ağaçlarının rizosferlerinde biriken Ca'nın topraktaki pH, karbon ve azot oranını değiştirdiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde Chodak vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada karaçam ağaçlarının bulundukları toprakların kimyasal yapısında ve besin içeriklerinde değişikliklere yol açtığı, Güneş ve Güner (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise farklı karaçam türlerinin topraktaki karbon miktarını değiştirdiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak bitkilerin benzer ortamlarda gelişim göstermelerine rağmen etrafında farklı bitki türlerinin bulunmasının bitkinin çevresi ile farklı etkileşimler kurmasına neden olacağı, böylelikle bitki rizosferinde ve endofitlerinde bulunan bakteri

çeşitliliğini etkileyebileceği düşünülmektedir. Genel olarak yüksek PGPB aktivitesi göstererek tanımlanan bakterilerin yedi büyük familyadan Proteobacteria, Microbacteriaceae, Bacillaceae, Alcaligenaceae, Enterobacteriaceae, Gammaproteobacteria ve Morexellaceae'a ait olduğu tespit edilmiştir. Sekans sonuçları incelendiğinde söz konusu her iki bitkiden izole edilen bakterilerin genellikle Proteobacteria familyasına ait *Pseudomonas* cinsi ve Enterobacteriaceae familyasına ait *Panteao* cinsi bakteri grubu olduğu görülmektedir. Bulunan sonuçlar literatür ışığı altında incelendiğinde *Pseudomonas* cinslerinin hemen hemen her türlü tarım toprağı veya bitki kökünden başarılı bir şekilde izole edilebileceği bilinmektedir (Afzal vd. 2019). *Pseudomonas* 'lar diğer bakteri türlerine kıyasla değişen çevre koşullarına karşı daha iyi uyum sağladıkları bilinmektedir. Bu nedenle *Pseudomonas* 'ların tarımsal potansiyeli bakımından geniş ilgi gören PGPB bakterilerinden biri olduğu görülmektedir (Alibrandi vd. 2020). Ayrıca yine bu cinse ait olan ve yeni tanımlanan *P. canavanivorans* ve *P. glycinis* bakteri türlerinin PGPB özellikleri ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Yapılan bu tez çalışması doğrultusunda, söz konusu her iki bakteri türünün de yüksek PGPB aktivitesine sahip olduğu ve çeşitli antibiyotik ve ağır metal dirençlerinin tespit edilmesi açısından yapılan ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Benzer şekilde *Panteao* cinsi bakterilerin ise toprak ve su ekosistemlerinde bol miktarda bulunduğu ve PGPB aktiviteleri açısından en çok çalışılan bakteri grupları arasında yer aldığı bilinmektedir (Alibrandi vd. 20021). Özellikle *N. birolmutlui*'ye ait endofitik bakterilerin sonuçları değerlendirildiğinde neredeyse tamamının *Panteao* cinsine ait olduğu görülmüştür. Rizobakterilerde ise bakteri çeşitliliğinin *Pseudomonas* ve *Panteao* cinslerine ek olarak *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* ve *Priestia* cinslerine ait olduğu görülmüştür. Bu da bitki rizosferlerinin besin açısından zengin ve çeşitli canlı gruplarını barındıran bir ortam olduğunu desteklemektedir. Ayrıca rizobakterilere kıyasla endofitik bakterilerin bitki iç dokularında ve daha stabil bir ortamda bulunmaları nedeniyle çeşitliliğinin daha az olması beklenen bir durumdur (Hardoim vd. 2008; Kandasamy 2022). İzole edilen tüm bakteri grupları değerlendirildiğinde rizobakterilerin fosfat çözme ve siderofor yeteneklerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu bu durum fosfat ve demir bileşiklerinin kök etrafında daha fazla bulunması sonucu burdaki bakterilerde bu aktivitelerin daha yüksek olmasıyla açıklanabilir. Bakterilerin IAA üretimleri değerlendirildiğinde, *N. birolmutlui* bitkisinde endofitik bakterilerin, *B. kiyakii* bitkisinde ise rizobakterilerin daha yüksek IAA üretme kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Endofitlerdeki yüksek IAA üretimi bitkinin maruz kaldığı çevresel stresler sonucunda, ürettikleri hormonların dokular arası sinyal olarak kullanılmasından kaynaklanabilirken rizobakterilerde IAA üretiminin yüksek olması ise triptofan amino asidinin kökler etrafında yoğun olmasından kaynaklanabilir (Duca vd. 2014; Cox vd. 2018). Ayrıca bu çalışmada endofitik bakterilerin rizobakterilere kıyasla daha yüksek ağır metal direncine sahip olduğu görülmüştür. Hiperakümülatör bitkiler genellikle topraktan aldıkları ağır metalleri vakuollerinde ve hücre duvarlarında depo etmektedirler. Böylece hücrelerde ve dokularda artan ağır metal konsantrasyonu burda yaşayan endofitik bakterilerin de dirençli hale gelmesine neden olabilmektedir (Rascio vd. 2011; Rafique vd. 2019). Bu da bize bakterilerin PGPB özelliklerinin bitki türü, toprak özellikleri, bakterilerin ve bitkilerin ilişkili oldukları çevre elemanları ve organizmaların maruz kaldığı stres faktörleri tarafından belirlendiğini göstermektedir.

Gelecekte iklim değişikliğinin etkileri ve bitki streslerinin giderek artmasına bağlı olarak tarımsal üretimin ciddi derecede azalması beklenmektedir. Özellikle yüksek metal konsantrasyonlarına dirençli olacak şekilde evrimleşmiş PGPB bazlı biyoaşılayıcıların formüle edilmesine daha fazla ihtiyaç duyulacağı görülmektedir. Literatürde yapılan birçok çalışma ile ağır metal dirençli PGPB ile bitkilerin aşılınması hiperakümülatör bitkilerin sağlığını, biyokütle verimini ve metal biriktirme yeteneklerini artırmak için oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında da tanımlanan tüm bakterilerin yüksek PGPB aktivitesi, ağır metal ve antibiyotik direncine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmada seçilen bakteri izolatlarının laboratuvar şartlarında gösterdikleri performansa göre tercih edilmesi, ne yazık ki doğal koşullardaki davranışlarını tahmin etmek için her zaman yeterli olmamaktadır. Bu yüzden tanımlanan bakterilerin bitki-bakteri etkileşimlerinin ve zorlu ortamlara adaptasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve bu bakterileri ticari olarak uygun ürünlere formüle etmek için bu alanda daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle çalışmayı farklı alanlarda da ilerleterek bitki-mikroorganizma iletişimini daha iyi anlamak böylelikle de incelenen PGPB'lerin fitoremediasyon ve biyoremediasyon çalışmalarında kullanılması hedeflenmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abbas, S., Javed, M. T., Shahid, M., Hussain, I., Haider, M. Z., Chaudhary, H. J. and Maqsood, A. 2020. *Acinetobacter* sp. SG-5 inoculation alleviates cadmium toxicity in differentially Cd tolerant maize cultivars as deciphered by improved physio-biochemical attributes, antioxidants and nutrient physiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155(1): 815-827.
- Abdelrahman, M., Burritt, D. J. and Tran, L.S.P. 2018. The use of metabolomic quantitative trait locus mapping and osmotic adjustment traits for the improvement of crop yields under environmental stresses. *In Seminars in Cell and Developmental Biology* pp. 86-94
- Adams, G.O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E. And Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3(1): 28-39.
- Adhikari, T., Tel-Or, E., Libal, Y. and Shenker, M. 2006. Effect of cadmium and iron on rice (*Oryza sativa* L.) plant in chelator-buffered nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 29(11): 1919-1940.
- Afridi, M. S., Mahmood, T., Salam, A., Mukhtar, T., Mehmood, S., Ali, J. and Chaudhary, H. J. 2019. Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139(1): 569-577.
- Aioub, A.A., Elesawy, A.E. and Ammar, E.E. 2022. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their role in plant-parasitic nematodes control: a fresh look at an old issue. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(6): 1305-1321.
- Aiysha, D. and Latif, Z. 2022. Assessing hydrolytic enzyme production ability of bacterial strains from bovine manure as potential biowaste conversion candidates. *Journal of Basic Microbiology*, 62(2): 116-123.
- Akbari, G. A., Arab, S. M., Alikhani, H. A., Allakdadi, I. and Arzanesh, M. H. 2007. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. *World Journal of Agricultural Sciences*, (3): 523-529.
- Akköprü, A. 2012. Hıyar Bakteriyel Köşeli Yaprak Leke Hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) Bazı kök bakterileriyle biyolojik savaşımı üzerinde araştırmalar. *Ege Üniversitesi*, 15(1): 54.
- Aksoy A, Leblebici Z, Prasad M.N.V. 2015. Metal accumulating plants from serpentine habitats of Kızıldağ, Konya province of Turkey. *Australian Journal of Botany* 63(3-4): 372-378.
- Alaylar, B. and Karadayı, M. 2021. Investigation of ACC-deaminase and indole acetic acid producing bacteria from rhizospheric soils in Ağrı province. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2): 942.
- Ali, S. and Kim, W.C. 2018. Plant growth promotion under water: decrease of waterlogging-induced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(1): 1096.

- Angen, O., Chriel, M., Olsen, J. E. and Bisgaard, M. 1999. Risk factors associated with *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in Danish broiler flocks. *Poultry Science*, 78(6): 848-854.
- Asai, N., Koizumi, Y., Yamada, A., Sakanashi, D., Watanabe, H., Kato, H. and Mikamo, H. 2019. *Pantoea dispersa* bacteremia in an immunocompetent patient: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 13(1): 1-5.
- Ayangbenro, A.S and Babalola, O.O. 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1): 94.
- Aytac Z. and Aksoy A. 2000. A new species of *Bornmuellera* Hausskn. (Brassicaceae) from south Anatolia, Turkey, *Botanical Journal Of The Linnean Society* 134(3): .485-490.
- Baas, P., Markewitz, D., Knoepp, J.D. and Mohan, J.E. 2014. Nitrogen cycling heterogeneity: An approach for plot scale assessments. *Soil Science Society of America Journal*, 78(1): 237-247.
- Babier, Y. ve Akköprü, A. 2020, Çeşitli kültür bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin karakterizasyonu ve bitki patojeni bakterilere karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 30(3): 521-534.
- Babu, A. G., Shea, P. J., Sudhakar, D., Jung, I. B. and Oh, B. T. 2015. Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*, 151(1): 160-166.
- Bedine, M.A.B., Iacomini, B., Tchameni, S.N., Sameza, M.L. and Fekam, F.B. 2022. Harnessing the phosphate-solubilizing ability of *Trichoderma* strains to improve plant growth, phosphorus uptake and photosynthetic pigment contents in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45(10): 510.
- Behera, B.C., Yadav, H., Singh, S.K., Mishra, R.R., Sethi, B.K., Dutta, S.K. and Thatoi, H.N. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha. *India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1): 169-178.
- Belimov, A. A., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., Litvinsky, V. A., Nosikov, V. V., Zavalin, A. A. and Tikhonovich, I. A. 2019. Rhizobial ACC deaminase contributes to efficient symbiosis with pea (*Pisum sativum* L.) under single and combined cadmium and water deficit stress. *Environmental and Experimental Botany*, 167(10): 3859.
- Bellenger, J.P., Wichard, T., Kustka, A.B. and Kraepiel, A.M.L. 2008. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. *Nature Geoscience*, 1(4): 243-246.
- Brady, C. L., Cleenwerck, I., Venter, S. N., Engelbeen, K., De Vos, P. and Coutinho, T. A. 2010. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrinea* sp. nov.,

- Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov. and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911). *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 60(10): 2430-2440.
- Braun, V. 1997. Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biological Chemistry*, 378(8): 779-786.
- Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 To the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10): 2430-2440.
- Briat, J.F., Fobis-Loisy, I., Grignon, N., Lobréaux, S., Pascal, N., Savino, G. and Van Wuytswinkel, O. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell*, 84(1-2): 69-81.
- Brown, C.M. and Dilworth, M.J. 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and Bacteroids, *Journal of General Microbiology*, 86(1): 39-48.
- Cappellari, L. D. R., Chiappero, J., Palermo, T. B., Giordano, W. And Banchio, E. 2020. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase the biosynthesis of secondary metabolites and improve the antioxidant status in *Mentha piperita* L. grown under salt stress. *Agronomy*, 10(8): 1090-1094.
- Charlotte, V., Laure, V. G., Naoise, N. and Claire, C. 2022. Opportunities and limits in imaging microorganisms and their activities in soil microhabitats. *Soil Biology and Biochemistry*, 174(7): 108
- Chin, A., Woeng, T. F., Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, 157(3): 503-523.
- Chodak, M., Pietrzykowski, M. and Sroka, K. 2015. Physiological profiles of microbial communities in mine soils afforested with different tree species. *Ecological Engineering*, 81(5): 462-470.
- Chouhan, G. K., Mukherjee, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Kumari, B. and Verma, J. P. Developing eco-friendly endophytic bio-inoculants for enhancing productivity and soil fertility in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy Journal*, 15(1):3-8.
- Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10): 524-531.
- Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Höfer, C., Puschenreiter, M., Widhalm, S. and Brader, G. 2020. Comparative genomics of *Microbacterium* species to reveal diversity, potential for secondary metabolites and heavy metal resistance. *Frontiers in Mmicrobiology*, 11, 1869.
- Cox, C. E., Brandl, M. T., De Moraes, M. H., Gunasekera, S. And Teplitski, M. 2018. Production of the plant hormone auxin by *Salmonella* and its role in the interactions with plants and animals. *Frontiers in Microbiology*, 8(3): 2668.
- Çelikten, M., Bozkurt, İ.A. 2018. Buğday kök bölgesinden izole edilen bakterilerin buğday gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1): 33-48.

- Danhorn T and Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61: 401-422.
- Das, A., Prasad, R., Srivastava, A., Giang, P. H., Bhatnagar, K. and Varma, A. 2007. Fungal siderophores: structure, functions and regulation. *Microbial Siderophores*, pp. 1-42.
- Demeulenaere, M. J. and Beeckman, T. 2014. The interplay between auxin and the cell cycle during plant development. *Auxin and its Role in Plant Development*, 119-141.
- Diep, P., Mahadevan, R. and Yakunin, A. F. 2018. Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(18): 157.
- Dörr, J., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular Microbiology*, 30(1): 7-17.
- Duca D, Lorv J, Patten C.L., Rose D., Glick B.R. 2014 Indole-3 acetic acid in plant-microbe interactions. Antonie van Leeuwenhoek, *International Molecular Microbiology*, 106(1): 85-125.
- Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V. and Lemanceau, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417. *The New Phytologist*, 135(2): 325-334.
- Dworkin, M. and Foster, J.W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75 (5): 592-603.
- Ebbs, S. D. And Kochian, L. V. 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science and Technology*, 32(6): 802-806.
- Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P. and Pace, N.R. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2): 324-325.
- Eid, A. M., Salim, S. S., Hassan, S.E.D., Ismail, M.A. and Fouda, A. 2019. Role of endophytes in plant health and abiotic stress management. In: *Microbiome in Plant Health and Disease* Springer, Singapore, pp. 119-144.
- Etesami, H. and Maheshwari, D. K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156(1) 225-246.
- Garbisu, C. and Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77(3): 229-236.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A. M. O. R., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K. and De Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and

- Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3): 337-345.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B. and Inchausti, P. 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11(2): 97-105.
- Ghosh, P. K., Sen, S. K. and Maiti, T. K. 2015. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (*Gammaproteobacteria*) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3): 296-303.
- Glick, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1): 30-39.
- Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 183(2):92-99.
- Gomes, M. P., Duarte, D. M., Carneiro, M. M. L. C., Barreto, L. C., Carvalho, M., Soares, A. M., and Garcia, Q. S. 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67: 1-6.
- González-Reguero, D., Robas-Mora, M., Probanza, A. and Jiménez, P. A. 2022. Evaluation of the oxidative stress alleviation in *Lupinus albus* var. Orden Dorado by the inoculation of four plant growth-promoting bacteria and their mixtures in mercury-polluted soils. *Frontiers in Microbiology*, 13(9): 7557.
- Goswami, M. and Deka, S. 2020. Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiological Research*, 240(2): 1265.
- Govarthanan, M., Mythili, R., Selvankumar, T., Kamala-Kannan, S., Rajasekar, A., Chang, Y. C. 2016. Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. *Biotechnology*, 6(2): 1-7.
- Graf, R.J. and Rowland, G.G. 1987. Effect of plant density on yield and components of yield of faba bean. *Canadian Journal Plant Science*, 67(1): 1-10.
- Gross, H. and Loper, J. E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, 26(11): 1408-1446.
- Gupta, S. and Pandey, S. 2019. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in Microbiology*, 10(5): 1506.
- Güner, Ş. T. and Güner, D. 2021. Changes in carbon stocks of soil and forest floor in black pine plantations in Turkey. *Journal of Forestry Research*, 32(4): 339-347.
- Hallmann, J., Rodriguez-Kábana, R. and Kloepper, J. W. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(4): 551-560.
- Hallmann, R. Rodriguez-Kabana, J.W. Kloepper, Jasim, B., Jimtha John, C., Shimil, V., Jyothis, M. and Radhakrishnan, E. K. 2014. Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum*

- and molecular analysis of ipdc gene. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3): 786-799.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. and Van Elsas, J. D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10): 463-471.
- Hartmann, A., Rothballer, M. and Schmid, M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1): 7-14.
- Hauth, F., Buck, H. and Hartig, J. S. 2022. *Pseudomonas canavaninivorans* sp. nov., isolated from bean rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(1): 5203.
- Hauth, F., Funck, D. and Hartig, J. S. 2023. A standalone editing protein deacylates mischarged canavanyl-tRNA Arg to prevent canavanine incorporation into proteins. *Nucleic Acids Research*, 51(5): 2001-2010
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4): 579-598.
- Hernandez, M. E., Kappler, A. and Newman, D. K. 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 921-928.
- Hiltner, L. 1904. About nevere experiences and problems in the field of soil bacteriology and with special attention to the foundation and brochure. *German Agricultural Society*, 98(2): 59-78.
- Hu, Y., Gao, G. F. and Zhu, B. 2017. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of Medicine*, 11(8): 161-168.
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C. L., Lu, G. N., Gu, R. R., Liu, H. J. and Zhang, H. 2013. Biosorption of Cd (II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 107: 11-18.
- Husson, E., Hadad, C., Huet, G., Laclef, S., Lesur, D., Lambertyn, V. and Van Nhien, A. N. 2017. The effect of room temperature ionic liquids on the selective biocatalytic hydrolysis of chitin via sequential or simultaneous strategies. *Green Chemistry*, 19(17): 4122-4131.
- Icgen, B. and Yilmaz, F. 2014. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak river isolates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(6): 735-743.
- Imperlini, E., Bianco, C., Lonardo, E., Camerini, S., Cermola, M., Moschetti, G. and Defez, R. 2009. Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(4): 727-738.
- Jha, U. C., Nayyar, H., Parida, S. K., Beena, R., Pang, J. and Siddique, K. H. 2022. Breeding and genomics approaches for improving phosphorus-use efficiency in grain legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 105-120.

- Jiménez-Gómez, A., Sai-Santamaría, Z., Kostovcik, M., Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P. F. and García-Fraile, P. 2020. Selection of the root endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as plant growth promoter for *Brassica napus* L. crops. *Agronomy*, 10(11), 1788.
- Kandel, S., Joubert, P., Doty, S. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 2017(3):5, 77.
- Kang, S. M., Adhikari, A., Lee, K. E., Park, Y. G., Shahzad, R. and Lee, I. J. 2021. Gibberellin producing rhizobacteria *Pseudomonas koreensis* enhance growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and chinese cabbage (*Brassica rapa*, chinensis). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 166-170.
- Khalaf E.M, Raizada M.N. 2016. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family, *Microbiology*, 16:1–16.
- Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z. A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3): 473-480.
- Khan, M. I. R., Kumari, S., Nazir, F., Khanna, R. R., Gupta, R. and Chhillar, H. 2023. Defensive role of plant hormones in advancing abiotic stress-resistant rice plants. *Rice Science*, 30(1):15-35.
- Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y. and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 120(4): 373-382.
- Kloepper, J. W. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. in *proc. of the 4th internet. conf. on plant pathogenic bacter, station de pathologie vegetale et phytobacteriologie*, INRA, Angers, France, 1978 (Vol. 2, pp. 879-882).
- Kumar, A., Droby, S., White, J. F., Singh, V. K., Singh, S. K., Zhimo, V. Y. and Biasi, A. 2019. Endophytes and seed priming: agricultural applications and future prospects. In *Microbial Endophytes* 12(1):107-124
- Küçük, Ç. ve Atmaca, A. 2020. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler tarafından üretilen metabolitler ve bitki gelişimine etkileri. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(1): 81-94.
- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K. and Go, S. J. (2003). *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 21-27.
- Lambers, H. 2022. Phosphorus acquisition and utilization in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(8): 11-126.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., William, H. And Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. and Briat, J. F. 2009. Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, 51(2): 491-549.

- Liu, C., Lin, H., Li, B., Dong, Y. and Menzembere, E. R. G. Y. 2021. Endophyte *Pseudomonas putida* enhanced *Trifolium repens* L. growth and heavy metal uptake: A promising in-situ non-soil cover phytoremediation method of nonferrous metallic tailing. *Chemosphere*, 272(8): 129816.
- Liu, S., Bishop, W. R. and Liu, M. 2003. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. *Drug Resistant Update*, 6(4): 183-195.
- Long, H. H., Schmidt, D. D. and Baldwin, I. T. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *Plos One*, 3(7): 2702.
- Lopez, J. R., Dieguez, A. L., Doce, A., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J. I. and Romalde, J. L. 2012. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Jjournal of Systematic and Eevolutionary Microbiology*, 62(4): 874-882.
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J. and Herrera-Estrella, L. 2014. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual Review Plant of Biology*, 65(1): 95-123.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1): 541-556.
- Lumactud, R., Fulthorpe, R., Sentchilo, V. van der Meer, J. R. 2017. Draft genome sequence of *Microbacterium foliorum* strain 122 isolated from a plant growing in a chronically hydrocarbon-contaminated site. *Genome Announcements*, 5(21): 43 17.
- Ma, Y., Rajkumar, M. and Freitas, H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management*, 90(2): 831-837.
- Maikhuri, R. K., Dangwal, D., Negi, V. S. and Rawat, L. S. 2016. Evaluation of symbiotic nitrogen fixing ability of legume crops in Central Himalaya, India. *Rhizosphere*, 1(2): 26-28.
- Martinez, J. L. 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(8): ,33-39.
- Masciarelli, O., Llanes, A. and Luna, V. 2014. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169(7-8): 609-615.
- Mergeay, M., Friedrich, B. And Schlegel, H. G. 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Journal of Bacteriology*, 169(10): 4865-4868.
- Mitran, T., Meena, R. S., Lal, R., Layek, J., Kumar, S. and Datta, R. 2018. Role of soil phosphorus on legume production. In *Legumes for soil health and sustainable management Springer*, pp. 487-510.

- Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A. and Haji-Allahverdipoor, K. 2012. Suppression of chickpea ('*Cicer arietinu*' L.) 'Fusariums' wilt by '*Bacillus subtilis*' and '*Trichoderma harzianum*'. *Plant Omics*, 5(2), 68-74.
- Naderi, K., Etesami, H., Alikhani, H. A. and Arani, A. M. 2022. Potential use of endophytic and rhizosphere bacteria from the desert plant *Stipagrostis pennata* as biostimulant against drought in wheat cultivars. *Rhizosphere*, 24(14):, 100617.
- Nakbanpote, W., Meesungnoen, O. and Prasad, M. N. V. 2016. Potential of ornamental plants for phytoremediation of heavy metals and income generation. In *Bioremediation and Bioeconomy* (pp. 179-217).
- Nascimento, F. X., Glick, B. R. and Rossi, M. J. 2021. Multiple plant hormone catabolism activities: an adaptation to a plant-associated life style by *Achromobacter* spp. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 533-553
- Neilands, J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 26723-26726.
- Oelkers, E. H. and Valsami-Jones, E. 2008. Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements*, 4(2):83-87.
- Olanrewaju, O. S., Ayangbenro, A. S., Glick, B. R. and Babalola, O. O. 2019. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3): 1155-1166.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. and Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(12):, 1-16.
- Opelt, K., Chobot, V., Hadacek, F., Schönmann, S., Eberl, L. And Berg, G. 2007. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. *Environment Microbiology*, 9 (11): 2795-2809.
- Oren, A. and Garrity, G. M. 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10): 5056
- Özgişi, K., Ocak, A., and Özüdoğru, B. 2018. *Noccaea birolmutlui*, a new Crucifer species from south west Anatolia, Turkey. *Phytotaxa*, 345(1):59-67.
- Pareek, A., Dhankher, O. P. and Foyer, C. H. 2020 Mitigating the impact of climate change on plant productivity and ecosystem sustainability. *Journal of Experimental Botany*, 71(2): 451-456.
- Pathan, S. I., Ceccherini, M. T., Sunseri, F. and Lupini, A. 2020. Rhizosphere as hotspot for plant-soil-microbe interaction. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil* pp. 17-43
- Patten CL, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Journal Microbiology* 42:207-220.
- Paul, D. and Lade, H. 2014. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4):737-752.

- Peleg, A. Y. and Seifert, H. dan Paterson DL 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Cinical Microbiology Reviews*, 21(3): 538-582.
- Penrose, D. M. and Glick, B. R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1): 10-15.
- Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M. and Yarzabal, L. A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region, *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11): 2905-2914.
- Perry, R. D., Bobrov, A. G. and Fetherston, J. D. 2015. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics*, 7(6): 965-978.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L. and Robaglia C. 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environmental* 26(9): 189–199.
- Petrik, M., Zhai, C., Haas, H. and Decristoforo, C. 2017. Siderophores for molecular imaging applications. *Clinical and Translational Imaging*, 5(1): 15-27.
- Pollard, A. J., Reeves, R. D. and Baker, A. J. 2014. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science*, 217, 8-17.
- Rafique, M., Ortas, I., Ahmed, I. A., Rizwan, M., Afridi, M. S., Sultan, T. and Chaudhary, H. J. 2019. Potential impact of biochar types and microbial inoculants on growth of onion plant in differently textured and phosphorus limited soils. *Journal of Environmental Management*, 247(1): 672-680.
- Raja, C.E., Selvam, G.S. and Omine, K. 2009. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. In International Joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia pp. 205-211.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V. and Freitas, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30(6):1562-1574.
- Ramprasad, D., Sahoo, D. and Sreedhar, B. 2014. Plant growth promoting Rhizobacteria—an overview. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2(2): 30-34.
- Reeves R.D, Adıgüzel N, Baker A.J.M. 2009. Nickel hyperaccumulation in *Bornmuellera kiyakii* Aytaç and Aksoy and associated plants of the Brassicaceae from Kızıldağ Derebucak (Konya), Turkey. *Turkish Journal of Botany* 33(2): 33-40
- Reeves R.D, Adıgüzel N. 2004. Rare plants and nickel accumulators from Turkish serpentine soils, with special reference to *Centaurea* species. *Turkish Journal of Botany*, 28: 147-153.
- Rose, W. C. 1968. II. The sequence of events leading to the establishment of the amino acid needs of man. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 58(11): 2020-2027

- Saha, J., Adhikary, S. and Pal, A. 2022. Analyses of the heavy metal resistance pattern and biosorption potential of an indigenous *Bacillus tropicus* strain isolated from arable soil. *Geomicrobiology Journal*, 39(10): 891-905.
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K. and Saikia, R. 2018. Author Correction: Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8(1): 1-1.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. and Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.
- Saraçlı M. A. 2006. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor. *Gülhane Tıp Dergisi*, 48: 244-250.
- Saranya, K., Sundaramanickam, A., Manupoori, S. And Kanth, S. V. 2022. Screening of multi-faceted phosphate-solubilising bacterium from seagrass meadow and their plant growth promotion under saline stress condition. *Microbiological Research*, 261: 127080.
- Sawada, K., Inagaki, Y., Sugihara, S., Funakawa, S., Ritz, K. and Toyota, K. 2021. Impacts of conversion from natural forest to cedar plantation on the structure and diversity of root-associated and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 167(2): 1040.
- Sayyed, R. Z., Chincholkar, S. B., Reddy, M. S., Gangurde, N. S. and Patel, P. R. 2013. Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* 3(15): pp. 449-471.
- Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C. and Schumann, P. 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2): 655-660.
- Schreckenberger, P. C. 2004. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. *Manual of Clinical Microbiology*, 17(2): 49-751.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.
- Sebastianes, F. L. S., Azevedo, J. L. D. and Lacava, P.T. 2017. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* pp. 37-56.
- Sehrawat, A., Sindhu, S. S. and Glick, B. R. 2022. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32(1): 15-38.
- Seneviratne, M., Weerasundara, L., Ok, Y. S., Rinklebe, J. and Vithanage, M. 2017. Phytotoxicity attenuation in *Vigna radiata* under heavy metal stress at the presence of biochar and N fixing bacteria. *Journal of Environmental Management*, 186(1): 293-300.

- Sharma, P. and Kumar, S. 2021. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. *Bioresource Technology*, 339(1): 125589.
- Sianta, S. A. and Kay, K. M. 2019. Adaptation and divergence in edaphic specialists and generalists: serpentine soil endemics in the California flora occur in barer serpentine habitats with lower soil calcium levels than serpentine tolerators. *American Journal of Botany*, 106(5): 690-703.
- Sönmez, İ., Kaplan, M., Sönmez, S. 2008. Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri. *Derim*, 25 (2): 24-34.
- Srivastava, S., Verma, P. C., Chaudhry, V., Singh, N., Abhilash, P. C., Kumar, K. V. and Singh, N. 2013. Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.). *Journal of Hazardous Materials*, 262: 1039-1047.
- Swoboda, P., Döring, T. F. and Hamer, M. 2022. Remineralizing soils? The agricultural usage of silicate rock powders: A review. *Science of The Total Environment*, 807: 150976.
- Syn, C. K. C. and Swarup, S. 2000. A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria. *Analytical Biochemistry*, 278(1): 86-90.
- Talavera, G. and Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4): 564-577.
- Tandon, A., Fatima, T., Shukla, D., Tripathi, P., Srivastava, S. and Singh, P. C. 2020. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 791-798.
- Tirry, N., Joutey, N. T., Sayel, H., Kouchou, A., Bahafid, W., Asri, M. and El Ghachtouli, N. 2018. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: prospects in phytoremediation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 613-619.
- Toklikishvili, N., Dandurishvili, N., Vainstein, A., Tediashvili, M., Giorgobiani, N., Lurie, S. and Chernin, L. 2010. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium vitis* *Plant Pathology*, 59(6): 1023-1030.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Klimova, S. Y., Shestakov, A. I., Botina, S. G., and Netrusov, A. I. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188(6): 655-664.
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K, 2010. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 132-138.
- Vaddepalli, P., Fulton, L., Wieland, J., Wassmer, K., Schaeffer, M., Ranf, S. and Schneitz, K. 2017. The cell wall-localized atypical β -1, 3 glucanase *zerzaust* controls tissue morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 144(12), 2259-2269.

- Van Der Ent, A., Cardace, D., Tibbett, M. and Echevarria, G. 2018. Ecological implications of pedogenesis and geochemistry of ultramafic soils in Kinabalu Park (Malaysia). *Catena*, 160: 154-169.
- Van Der Putten, W. H. Cook, R, Costa, S., Davies, K. G., Fargette, M., Freitas, H., Hol, W. G., Kerry, B. R., Maher, N., Mateille, T. and Moens, M. 2006. Nematode interactions in nature: Models for sustainable control of nematode pests of crop plants. *Advances in Agronomy*, 89: 227–260.
- Van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162.
- Verma, S. and Kuila, A. 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology and Innovation*, 14: 100369.
- Visioli, G. Degidio, S. and Sanangelantoni, A. M. 2015. The bacterial rhizobiome of hyperACCumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5: 752.
- Vocciant, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., and Franchi, E. 2022. The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3): 1231.
- Wang, G., Zhang, L., Zhang, S., Li, B., Li, J., Wang, X. and Ji, J. 2023. The combined use of a plant growth promoting *Bacillus* sp. strain and GABA promotes the growth of rice under salt stress by regulating antioxidant enzyme system, enhancing photosynthesis and improving soil enzyme activities. *Microbiological Research*, 266(9): 127225.
- Wang, W., Mai, Z., Chen, Y., Wang, J., Li, L., Su, Q. and Hong, X. 2017. A label-free fiber optic SPR biosensor for specific detection of C-reactive protein. *Scientific Reports*, 7(1): 16904.
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z. and Nowak, J. 2004. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2): 175-193.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2): 250-256.
- Weller-Stuart, T., De Maayer, P. and Coutinho, T. 2017. *Pantoea ananatis*: genomic insights into a versatile pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 18(9): 1191-1198.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(1): 487-511.
- Xu, G., Fan, X. and Miller, A. J. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1): 153-182.
- Xue, Q. Y., Ding, G. C., Li, S. M., Yang, Y., Lan, C. Z., Guo, J. H. and Smalla, K. 2013. Rhizocompetence and antagonistic activity towards genetically diverse *Ralstonia solanacearum* strains An improved strategy for selecting biocontrol agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3): 1361–1371.

- Yim, W., Seshadri, S., Kim, K., Lee, G. and Sa, T. 2013. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67(8): 95-104.
- Yin, K., Lv, M., Wang, Q., Wu, Y., Liao, C., Zhang, W. and Chen, L. 2016. Simultaneous bioremediation and biodetection of mercury ion through surface display of carboxylesterase E2 from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Water Research*, 103(2):, 383-390.
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M and Chen, L. 2019. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360(9): 1553-1563.
- Zboralski, A., Biessy, A. and Fillion, M. 2022. Bridging the gap: Type III secretion systems in plant-beneficial bacteria. *Microorganisms*, 10(1): 187.
- Zhang, L., Li, L., Sha, G., Liu, C., Wang, Z and Wang, L. 2020. Aerobic composting as an effective cow manure management strategy for reducing the dissemination of antibiotic resistance genes: an integrated meta-omics study. *Journal of Hazardous Materials*, 386, 121895.
- Zhang, Y., Zhao, S., Liu, S., Peng, J., Zhang, H., Zhao, Q. and Chen, C. 2022. Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 13(2): 132.

8. EKLER

EK-1. Dworkin- Foster (DF) Besiyeri (1958)

KH ₂ PO ₄	1,36 g/L	H ₃ BO ₃	0,003 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,13 g/L	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,007 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,004 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,7 g/L	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L	MnSO ₄ H ₂ O	0,02 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g/L	ACC	3mM
Glikoz	%1		

Hazırlanan karışımlar 121 °C'de 15 dak süre ile sterilize edilmiştir. Petrilerdeki son konsatrasyon 3 mM olacak şekilde hazırlanan ACC filtreden geçirilerek sterilizasyonu tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri uygun sıcaklığa geldikten sonra ACC solüsyonu ile karıştırılarak petrilere dökülmüştür.

EK-2. Modifiye Chrome Azurol S (CAS) Agar (Schwyn ve Neilands 1987)

Chrome azurol S (CAS) (Nacalai Tesque, Japonya)	0,06 g
Demir (III) çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD)	10 mL
Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) (Sigma Aldrich, ABD)	0,073 g
NA	18 g
dH ₂ O	990 mL

50 mL dH₂O içerisinde 0,06 g CAS çözündürülerek hazırlanmıştır. 10 mM 10 mL HCl asit içerisinde 0,0027 g FeCl₃.6H₂O çözülmüştür. 40 mL distile su içerisinde 0,073 g HDTMA çözülmüştür. Hazırlanan üç çözelti yavaşça karıştırılarak meydana gelen mavi çözelti 121 °C'de 15 dak süre ile sterilize edilmiştir. Aynı anda 900 mL 'lik NA hazırlanarak steril edilmiş ve sterilize edilen çözelti ile karıştırılarak petriler hazırlanmıştır.

EK-3. NBRIP Besiyeri (National Botanical Research Institute's Phosphate)**(Nautiyal 1999)**

Magnezyum Klorür ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Merck Millipore, Almanya)	5 g
Magneyum Sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck Millipore, Almanya)	0,25 g
Potasyum klorür (KCl) (Merck Millipore, Almanya)	0,2 g
Amonyum Sülfat [$(NH_4)_2SO_4$] (Merck Millipore, Almanya)	0,1 g
Kalsiyum Fosfat $Ca_3(PO_4)_2$ (Merck Millipore, Almanya)	5 g
Glukoz (Merck Millipore, Almanya)	10 g
Bromophenol blue (Merck Millipore, Almanya)	0,025 g
NA (Sigma Aldrich, ABD)	15 g
dH ₂ O	1000 mL

Tüm kimyasallar sırasıyla eklenip pH 6,7-7'ye ayarlandıktan sonra agar ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan besiyeri 20 dk 121 °C'de otoklavlanarak petrilere dökülmüştür (Nautiyal, 1999).

ÖZGEÇMİŞ

YASEMİN GAYA

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2021-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Antalya
Lisans 2015-2019	Uşak Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü