

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAKIR VARLIĞINDA
ZEA MAYS'IN GELİŞİMİNE ETKİSİ**

ÜLKÜ ZEYNEP ÜREYEN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU
JÜRİ ÜYELERİ
DOÇ. DR. TURAN YÜKSEK
DOÇ. DR. NESLİHAN SARUHAN GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI




RİZE-2015

Her Hakkı Saklıdır

T.C
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAKIR VARLIĞINDA *ZEA
MAYS*'İN GELİŞİMİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Ülkü Zeynep ÜREYEN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 07/07/2015 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Turan YÜKSEK	
Üye	: Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER	


Prof. Dr. Selami SAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvar'larında 2013-2015 yılları arasında yapılmıştır. Çalışmada Ovit yaylasında orkide toprağından izole edilen toplam 20 adet suşun geleneksel metodlarla tanımlanması, bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesi, bitki gelişimini teşvik eden özelliklerinin belirlenmesi ve 5 farklı ağır metale karşı toleranslarının araştırılması planlandı.

Test sonuçlarına göre en iyi özelliklere sahip olan suşların biyoremediasyonda ve bitki gelişimini teşvik eden özellikler açısından iyi olan suşların mısır bitkisinin çimlenmesine ve gelişimine olan etkinliği test edildi. Bu çalışmada bana destek veren başta danışman hocam sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na, katkılarını esirgemeyen değerli jüri üyelerim Doç. Dr. Turan YÜKSEK, Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER, bölüm başkanımız Prof. Dr. Vagıf ATAMOV, değerli hocam Doç Dr. Serdar ÜLKER'e, yüksek lisans arkadaşlarım Emel UZUNALIOĞLU, Gökhan AK, Arif BOZDEVECİ, Suzan KUNDAKÇI, annem Fatma, babam Hüseyin, kardeşlerim Yasemin Gökçe ve Ahmet ÜREYEN'e teşekkürleri bir borç bilirim.

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Toprak Kökenli *Bacillus*’ların Biyoremidant Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bakır Varlığında *Zea Mays*’ın Gelişimine Etkisi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 07/07/2015

Ülkü Zeynep ÜREYEN

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabi

ÖZET

TOPRAK KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve BAKIR VARLIĞINDA *ZEA MAYS*'İN GELİŞİMİNE ETKİSİ

Ülkü Zeynep ÜREYEN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Çalışmada Ovit yaylası orkide kök toprağından izole edilen 20 izolatin tanımlanması, bitki gelişimini teşvik eden özelliklerinin belirlenmesi, metal toleransları (Fe, Cu, Pb, Ag, Zn), bakır varlığında mısır bitkisinin çimlenmesine ve gelişmesine olan katkısının araştırılması planlandı. İzolatların tümü Gram pozitif sporlu (*Bacillus* sp) bakteri oldukları, tümünün geniş sıcaklık ile pH aralığında, %85'inin %10 tuz varlığında iyi üreyebildikleri, 3'nün amilaz, 11'nin nitrat ve güçlü lesitinaz aktiviteye sahip oldukları belirlendi. Bitki gelişimini teşvik eden özellikleri incelendiğinde 7'sinde güçlü siderofor üretimi, 6'sında fosfat çözünürlüğü, 6'sında ACC deaminaz ve çoğunda iyi düzeyde indol asetik asit aktivitesi gözlemlendi. Ağır metallerin yüksek (10 mM) konsantrasyonlarında üreme yetenekleri incelendiğinde tümün demir, 7'sinin gümüş, 9'unun bakır ve 15'inin kurşun varlığında üreyebildiği belirlendi. Tüm özellikler açısından en iyi olan 6 suşun, bakır MIC ve MBC değerlerisıraıyla 12,5-25 ile 50-100 mM aralığında belirlendi. Bakır varlığında geniş pH aralığında üreyebildikleri ancak logaritmik sürenin uzadığı gözlemlendi. Suşların bakır varlığında mısır çimlenme başarısına etkisi araştırıldı ve en iyi olarak belirlenen 5O5Y11 suşu geleneksel moleküler yöntemlerle *Bacillus* sp. olarak tanımlandı. 5O5Y11 suşunun Bakır varlığında ve yokluğunda mısır bitkisinin gelişimine olan etkinliği incelendi. Cu'nun biyoremidasyonu/absorbsiyonu Atomik Absorbsiyon analizi ile araştırıldı. 5O5Y11 nolu suşun birçok özellikleri açısından değerlendirildiğinde potansiyel biyoremidant/absorbant suş olduğu belirlendi.

2015, 151 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Bakır, Mısır gelişimi, Biyoremidasyon/Absorbsiyon

ABSTRACT

DETERMINATION of BIOREMIDANT CHARACTERISTIC of SOIL BORN *BACILLUS* and ITS EFFECT on THE DEVELOPMENT of *ZEA MAYS* IN THE PRESENCE of COPPER

Ülkü Zeynep ÜREYEN

Recep Tayyip Erdogan University
Science Institute
Department of Biology
Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

In this study it was planned to investigate the identification of the 20 isolated strains that isolated from Ovit Plateau, orchid root soil, determination of the features that promotes the growth of plants, metal tolerances (Fe, Cu, Pb, Ag, Zn), contribution to the germination and growth of corn plants in the presence of copper. It was determined that all the isolations were gram positive-forming bacteria (*Bacillus* sp.), %85 of them could breed well in the wide range of pH and temperature in the presence of %10 salt, 3 of them had amylase, 11of them had nitrate and strong lecithinase activity. When the features that promote the growth of plants were analyzed, strong siderophore production at 7 of them, phosphate solubility at 6 of them, ACC deminase at 6 of them and good level of indole asetic acid were observed at most of them. When analised the ability of breeding in the high concentrate of heavy metals(10mm), it was determined that all of them could breed in the presence of iron, 7 of them could breed in the presence of silver, 9 of them could breed in the presence of copper and 15 of them could breed in the presence of lead. For all features, the most appropriate 6 strains were defined as copper MIC and MBC respectively valued between 12.15- 25 and 50-100. It is observed that in the presence of copper they could breed in the wide pH range but the logarithmic time prolonged. The effect of the strains to corn germination success in the presence of copper was investigated and the most suitable strain was choosen as 505y11. By the traditional and moleculer methods, it was defined as *Bacillus* sp. The effectiveness of the presence and absence of copper to the growth of corn plant and the features of bioremidant absorption was investigated by Atomic Absorbson analysis. When 505Y11 strain evaluated many features were identified as potential biyoremidant/ absorbant strains.

2015, 151 page

Keywords: *Bacillus*, Copper, Development of corn, Bioremediation / Adsorption

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. <i>Bacillus</i> 'ların Genel Özellikleri ve sistematikteki yeri.....	2
1.2. <i>Bacillus</i> 'ların Antimikrobial Özellikleri.....	3
1.3. Toprak Mikroflorası	4
1.3.1. Toprak Reaksiyonu ve Mikroflora	5
1.4. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Mikroorganizmalar (PGPR).....	6
1.4.1. Biyogübrelerin Tarımda Kullanımı	7
1.5. Sideroforlar	8
1.6. Bazı Ağır Metaller ve Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri.....	8
1.6.1. Çinko	8
1.6.2. Gümüş.....	9
1.6.3. Demir	9
1.6.4. Bakır	10
1.6.5. Kurşun	11
1.7. Ağır Metalin Mikroorganizmaya Etkisi	15
1.8. Toprakta ağır metalin önemi ve bitki gelişimi üzerine etkisi	18
1.8.1. Bitkilerin Ağır Metal Toksisitesine Tolerans Mekanizmaları.....	21
1.9. Biyoremediasyon.....	22
1.9.1. Biyoremediasyonun Avantajları	24
1.9.2. Biyoremediasyonun Dezavantajları.....	25
1.10. Literatür Çalışmaları.....	25

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Materyal.....	28
2.1.1.	Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri	28
2.2.	Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı	29
2.2.1.	Müller Hinton Agar (MHA) ve Müller Hinton Broth (MHB) Besiyerleri	29
2.2.2.	Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) ve Sıvı Besiyeri (BHIB).....	29
2.2.3.	Hareket Besiyeri	29
2.2.4.	NaCl Testi.....	29
2.2.5.	Biyokimyasal Testler	30
2.2.6.	Çimlenme Deneyi Düzenegi.....	36
2.3.	Yöntem	39
2.3.1.	Örneklerin Ekimi	39
2.3.2.	İzolasyon ve İdentifikasyon.....	40
2.3.3.	Hareket Testi.....	40
2.3.4.	Oksidaz Testi	41
2.3.5.	Katalaz Testi	41
2.3.6.	Sıcaklık Testi	41
2.3.7.	NaCl Tolerans Testi.....	41
2.3.8.	pH Testi	42
2.3.9.	Biyokimyasal Testler	42
2.3.10.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi	47
2.3.11.	Bakterilerde Bakır Minimum İnhibisyon (MIC) ve Minimum Bakterisit (MBC) Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi:.....	48
2.3.12.	Bakterilerin Farklı Ortamlarda(Cu'lı ve Cu'sız MHB ile BHI besiyerinde) Üreme Eğrileri	49
2.3.13.	Bakır Spektrofotometrik Yöntemlerle belirlenmesi	50
2.3.14.	İzolatların Moleküler Tanımlanması	50
2.3.15.	Mısır Tohumlarının Cu ve Bakteri Varlığında Çimlenme Deneyi:	53
2.3.16.	<i>Bacillus</i> sp. 5O5Y11 Suşunun Metal Absorbsiyonunun Belirlenmesi.....	54
2.3.17.	Yakma Düzenegi:	55
2.3.18.	Saksı Deneyi	55
2.3.19.	Saksı Toprağına Bakteri ve Metal Uygulaması;.....	56
2.3.20.	Cu Analizi İçin Mısır Yakma Düzenegi	57
3.	BULGULAR.....	59

3.1.	Bakterilerin Geleneksel Yöntemlere Göre Tanımlanması.....	59
3.2.	Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özelliklerin Belirlenmesi.....	64
3.3.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi	67
3.4.	5O5Y11 Suşunun Bakırı Absorbsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi	76
3.5.	Bakır ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı.....	79
3.6.	Bakır Varlığında Mısır Bitkisi Gelişimi ve Atomik Absorbsiyon Analizi.....	84
3.6.1.	Bakır Varlığında Mısır Gelişimi Deneyi	84
3.7.	Mısır ve Bakteri İçeriklerinde bakır Miktarının Analiz.....	94
3.8.	Bakteri Deneyinde Bakırın Atomik Absorbsiyon Analizi Sonuçları	99
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	101
4.1.	Bakterilerin Tanımlanması	101
4.2.	Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özellikler	104
4.3.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi	107
4.4.	Bakır ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı.....	111
4.5.	Bakır Varlığında Mısır Gelişimi(Saksı deneyi) ve Atomik Absorbsiyon Analizi	116
4.5.1.	Bakır Varlığında Mısır Gelişimi Deneyi Sonuçları	116
4.5.2.	Mısır Gelişimi Deneyinde Bakırın Atomik Absorbsiyonla Belirlenmesi.....	119
4.5.3.	5O5Y11 Suşunun Sıvı Besiyerinde (BHIB) Bakır Absorbsiyonu.	121
5.	ÖNERİLER.....	123
	KAYNAKLAR.....	124
	EKLER	140
	ÖZGEÇMİŞ.....	141

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bazı izolatların makroskonik ve mikroskobik görünüşleri ve sporları.	60
Şekil 2.	Demir içeren besiyerinde siderofor üretiminin belirlenmesi.....	65
Şekil 3.	Fosfat içeren besiyerinde fosfataz varlığının tespiti.	65
Şekil 4.	Amonyum sülfat çözünürlüğü aktivitesinin belirlenmesi.	65
Şekil 5.	Bakterilerde ACC Deaminaz Aktivitesinin belirlenmesi	66
Şekil 6.	İndol asetik asit (IAA) aktivitesinin belirlenmesi.	67
Şekil 7.	Farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat, bakır sülfat, çinko klorür ve kurşun nitrat üreme.	68
Şekil 8.	Bakır içeren MHA besi ortamında kültür edilen şuşların kolonileri oda ısısında bekletildiğinde renk dönüşümleri.....	69
Şekil 9.	Agar kuyucuk diffüzyon yönteminde Cu'nun inhibisyon zon çapları.	69
Şekil 10.	Eliza plakasında bakır MIC deneyi	70
Şekil 11.	11201'nin Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği. ...	71
Şekil 12.	501 şuşunun Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği. 72	
Şekil 13.	505Y1'nin Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği. ..	73
Şekil 14.	508 şuşunun Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği. 74	
Şekil 15.	509 şuşunun Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.	75
Şekil 16.	505Y11'nin Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği. 76	
Şekil 17.	Bakırın MHB ile BHIB besiyerleri ve su ortamındaki standart ile absorbans eğrileri.	77
Şekil 18.	505Y11'in Cu'sız BHIB ortamında ve farklı pH'larda 2. ve 11. gün inkübasyon	78
Şekil 19.	505Y11'in 3 mM Cu varlığında, farklı pH'lardaki kültürlerin 2., 4., 7. ve 11.günlerde alınan adsorbs sektrum grafikleri.	79
Şekil 20.	Çimlenme deneyinin bakır varlığında ve yokluğunda saçaklanma sonuçları.81	
Şekil 21.	Mısırın çimlenme deneyinin 5. gününde bakteri (505Y11) ve bakır (1,5 mM)varlığında görünüşleri.	82
Şekil 22.	Mısırın bakteri ve bakır varlığında çimlenme deneyinin son (7.) günü görünümü.	83
Şekil 23.	Bakterilerin, Cu varlığında ve yokluğunda mısır kök ve gövde uzunluklarına etkisi.	83
Şekil 24.	Cu varlığında ve yokluğunda şuşları mısır bitkisinin kök-gövde ağırlıkları.. 84	
Şekil 25.	Saksı deneyinin 7. günlerinden görünüşleri.....	85
Şekil 26.	Saksı deneyinin 20. günlerinden görünüşleri.....	86

Şekil 27.	Mısır - Bakteri (505Y11) kontrol gruplarının hasat sonrası görünümüleri.....	89
Şekil 28.	Yukarıdan aşağıya doğru Cu50 kontrol, Cu50+Bakteri, Cu100 kontrol ve Cu100-Bakteri gruplarının hasat sonrası görünümüleri.....	90
Şekil 29.	Mısır bitkisinin bakır varlığında ve yokluğunda gelişiminin toplam veri analizine göre oluşturulan grafik.....	93
Şekil 30.	Mısır köklerindeki bakır miktarı konsantrasyon değerlendirmesi.	96
Şekil 31.	Mısır yapraklarında bakır miktarı konsantrasyon değerlendirmesi.....	98
Şekil 32.	Bakteri kültürlerinde bakır miktarlarının ölçüm değerlendirmesi.....	100

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Bacillus</i> 'ların sınıflandırılması.....	3
Tablo 2. ACC içeren bitki gelişimini teşvik edici bakteri aşılamaalarının bitkilerde etkileri.....	10
Tablo 3. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler.....	24
Tablo 4. Metal analizi için numunelerin mikrodalga fırında (Microwave Digestion) yakma programları	58
Tablo 5. Çalışmada kullanılan izolatlar ve numaraları.....	59
Tablo 6. Mikroorganizmaların makroskopik, mikroskopik ve bazı biyokimyasal özellikleri.....	61
Tablo 7. Mikroorganizmaların bazı biyokimyasal aktivite test sonuçları.....	62
Tablo 8. Mikroorganizmaların bazı fiziksel özelliklerinin belirlenmesi.....	63
Tablo 9. İzolatların geleneksel yöntemlerle yapılan tür tanımlanması (N=20).....	63
Tablo 10. İzole edilen bakterilerin tür dağılımı (N=20).....	64
Tablo 11. Mikroorganizmaların bitki gelişimini teşvik eden bazı özellikleri.....	64
Tablo 12. Mikroorganizmaların indol asetik asit (IAA) aktiviteleri.....	66
Tablo 13. Bakterilerin katı agar ortamında gümüş, demir, bakır, kurşun ve çinko varlığında üreyebilme yetenekleri.....	67
Tablo 14. <i>Bacillus</i> sp. suşlarının bakır toleranslarının agar kuyucuk dilüsyon, MIC ve MBC yöntemleriyle belirlenmesi.....	70
Tablo 15. Mısır çimlenmesi üzerine bakır (1.5 mM) etkinliğinin belirlenmesi.....	80
Tablo 16. Mısır saksı deney düzeneği.....	85
Tablo 17. Toprak nemi ve mısır kökü yaş ve kuru ağırlıkları.....	87
Tablo 18. Mısır kontrol grubunun yaprak gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.....	88
Tablo 19. Mısır-Bakteri (5O5Y11) kontrol grubunun yaprak gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.....	88
Tablo 20. Mısır- Cu50 mg kontrol grubunun yaprak gövde ile ana kök uzunlukları (cm).ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.....	89
Tablo 21. Mısır-Bakteri- Cu50 mg deney grubunun yaprak gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.....	89
Tablo 22. Mısır-Bakteri-Cu100 mg deney grubunun yaprak gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.....	91
Tablo 23. Bakır yönünden kontrol grubu ile diğer faktörler arasındaki korelasyon ilişkisi.....	92
Tablo 24. Topraktaki bakır miktarı konsantrasyonu.....	95

Tablo 25. Mısır köklerindeki bakır miktar ortalamaları ve standart sapma değerleri. ...	96
Tablo 26. Mısır yapraklarında bakır miktarı konsantrasyon değerleri.	97
Tablo 27. 5O5Y11 nolu suşun sıvı ortamda bakır bağlama/indirgeme kapasitesi ve atomik absorpsiyon ölçüm değerleri.	99

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BHIA	Brain heart infusion agar
BHIB	Brain heart infusion broth
MHA	Müller Hinton Agar
MHB	Müller Hilton Broth
EMB	Eosine Metilen Blue
IMVIC	İndol, Metil Red, Voges proskaver ve Sitrat
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
vd	Arkadaşları
g	Gram
g/L	Gram /Litre
kg	Kilogram
PGPR	Plant Growth Promoting Bacteria
ACCD	Aminosiklopropan karboksilat deaminaze
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
PPM	Parts per million
EPA	ABD çevre koruma kurumu
UV	Ultra viole
BPB	Bromo fenol blue
CAS	Chrome azurol-S
HDTMA	1-5 diphenyl carbazide hexadieyl trimethyl ammonium
PİPES	2-ethanesulfonik asit
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent analizi
TCE	Tetrakloretilen
PCE	Klorlu alifatikler
CMV	Cucumber mozaik virüs
ISR	Sistemik uyarılmış dayanıklılık

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ni	Nikel
Cr	Krom
Ca	Kalsiyum
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Na	Sadyum
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
Au	Altın
Cu	Bakır
Co	Kobalt
Cd	Kadmiyum
Zn	Çinko
Pb	Kurşun
Fe	Demir
Dk	Dakika
C	Santigrat
Atm	Atmosfer basınç birimi
TE	Tris edda
Rpm	Dakikadaki devir sayısı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bakteriler büyüklükleri türe göre değişmekle birlikte 1-3 mikronu geçmeyen, tek hücreli prokaryotik canlılardır. Bazı türleri insan ve hayvanlarda önemli hastalıklara neden olmaktadır. Yaklaşık 100 türü ise bitkilerde hastalık oluşturmaktadır (Tünger vd, 2005). Bitki patojeni bakterilerin büyük çoğunluğu hücre duvarına sahip gerçek bakteriler olarak adlandırılan proteobacteriagrubunun farklı alt sınıflarında yer alan gram negatif bakterilerdir. Önemli bitki patojenleri arasında *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Agrobacterium* cinsleri söylenebilir. Bitkinin kökünde ve yüzeyinde yaşayan yararlı bakteriler, bitkinin gelişimini direk etkilemekte ve bitki patojenlerine karşı kontrolde etkin rol oynamaktadırlar. Bu işleme sahip olduğu bilinen bakteriler; *Rhizobium*, *Bacillus* ve *Azospirillum* cinsleri olup ticari olarak kullanımları mevcuttur. Bazı *Bacillus* cinsine ait türler bitkide yumruların oluşmasına, tohum ve fide çürümmesine, buğdayda beyaz şerit oluşmasına neden olurlar. Ayrıca *Bacillus*'ların bazı türleri meyvelerde *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Clostridium* cinslerine ait türlerle birlikte yumuşak çürümeye neden olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada bölge topraklarından yadaya yetişen bitkisel ürünlerinden izole edilen mikroorganizmaların biyogübre üretiminde yararlanılabilir potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir. Gerek insandan gerekse doğal kaynaklardan köken alan kirleticiler topraktaki canlı popülasyonların tümünü direk ya da dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bu kirleticilerin en önemlisi ağır metallerdir. Besin zinciri boyunca insan gıdasına kadar ulaşan ve ciddi sağlık problemlerine neden olan ağır metallerin, flora ve faunada etkisini azaltabilmek için mikroorganizmaların kullanımı son 20 yıldan beri önem kazanmış olup bu alanda çok sayıda çalışmalar mevcuttur. Bu mikroorganizmaların temizleyici ajan olarak kullanımlarında dikkat edilmesi gereken hususlardan biri kendi alındıkları florada kullanımları ve ekosistemi değiştirmemeleridir.

Bu amaçla önemli biyoremidant ve biyoabsorbsiyon çalışmaları her ülke ve hatta her bölge için ayrı ayrı çalışılması gerekmektedir.

Çalışmamızda bölge topraklarının ekolojisini bozmadan, daha verimli ve daha sağlıklı tarımsal alanların oluşturulmasına katkı sağlamak amacıyla potansiyel biyoremidant/biyoabsorbant bitki gelişimini destekleyici suşların karakterize edilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla bölge topraklarından izole edilen 20 adet mikroorganizmanın geleneksel ve moleküler metodlarla tanımlanması, fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin, bitki gelişimini teşvik edici yeteneklerinin belirlenmesi hedeflendi. Bir dizi ağır metale (Fe, Zn, Cu, Pb ve Ag) olan toleransları incelenip metal dirençli suşların belirlenerek biyoabsorbsiyon yeteneği olanların seçilmesi hedeflendi. Tüm incelenen özellikleri iyi olan suşların mısır bitkisinin çimlenmesine ve gelişimine olan etkinliklerinin araştırılması planlandı. Araştırılan özellikler yanında iyi olan suşların, bölge topraklarının biyoremede edilmesinde ve tarımsal verimin ekosisteme zarar vermeden arttırılmasında güçlü potansiyele sahip olacağı varsayılmaktadır.

1.1.1. *Bacillus*'ların Genel Özellikleri ve Sistematikteki Yeri

Endospor oluşturan *Bacillacea* ailesi, gram pozitif, vejetatif formları çubuk şeklinde düz, düze yakın, birbirine paralel, ucu yuvarlak 0.5X1.2 µm ile 2.5X10 µm çapında hücrelerdir. Tek, tek veya uzun çizgiler şeklinde görünürler. Çoğu kötü şartlara dirençli küre, elips veya silindir şeklinde spor oluşturan aerobik (Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır) bakterilerdir. Endosporları silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olup, türlere göre santral, terminal veya subterminal konumda bulunurlar. Türe göre hareketli (flagellalı) ya da hareketsiz formlar ihtiva eden bakteri grubudur. *Bacillus* genusunun koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanır. *B. mycooides* 'in kolonileri ise rizoid şekilde agarlı besiyortamı üzerine yayılır (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Bacillus türleri çoğunlukla saprofit, doğada yaygın olarak toprakta, bitkide, havada asılı partikülde, suda, insan ve diğer tüm canlıların florasında (sindirim kanalı ve yüzeylerinde) yaygın olarak bulunurlar. *Bacillus* 'ların sistematigi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *Bacillus*'ların sınıflandırılması.

Üst Alem	Bacteria
Alem	Eubacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Bacillaceae
Cins	<i>Bacillus</i> ve <i>Clostridium</i>
Bazı türleri	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus polymxa</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus mycoides</i>

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Isıya, ışığa, dezenfektanlara dirençli sporları var ve ortam şartlarına çok dirençlidirler. *Bacillus anthracis* dışındaki türlerin insan ve hayvanlarda genellikle hastalık oluşturmadıkları bilinmektedir. Çoğunda katalaz testi pozitifdir ve asit üretirler ama şekerlerde gaz oluşturmazlar. Büyük çoğunluğu Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi genel üretim besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; azot kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Taubman, 1992).

Bazı türleri uygun şartlarda (biyokarbonatlı ve CO²'li ortamlarda) *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus megaterium* poly γ -D glutamik asit yapısında kapsül geliştirirler. Bu kapsüller metilen mavisi ile boyandığında görülebilir hale gelir.

Fizyolojik karakterlerinin sınırları geniştir. Mezofilik cinsler çoğunluğu oluştururken, zorunlu termofil, halofil cinslerde bulunmaktadır. Bu cinslerin hepsi yaşamlarını zor çevre şartlarında spor formda sürdürebilirler. Turnbell ve Kramer (1991)'in yaptıkları bir araştırmaya göre *Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki

farklılıkların tespiti için spor ve sporangiyum morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre de *Bacillus*'lar 3 grupta toplanmıştır.

1.Sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumlu olanlar; Gram pozitiflerdir. Bu gruba örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir.

2. Sporangium şişmiş, sporlar elipsoide, merkezi veya terminal konumlu olanlar; Gram boyama özelliği değişkendir. Bu grupta yer alan *Bacillus* türlerine örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir.

3. Sporangium şişmiş, sporlar yuvarlak, subterminal veya terminal olanlar; gram değişkendir. *B. sphaericus* bu gruba örnek olarak verilebilir.

1.1.1.1. *Bacillus thuringiensis*

Toprak ve gıda kökenli bakteriler olup gram pozitif fakültatif yapıda ve çubuk şeklinde spora sahiptirler. Sporlanma sırasında, birçok *Bacillus thuringiensis* suşunun δ -endotoksinleri denilen kristal proteinleri (proteinli inklüzyonlar) üreterek böcekleri öldürdüğü görülmüş bu da böcek öldürücü maddeler olarak kullanımına yol açmıştır. Birçok kristal üreten “Bt” suşu olsa da hepsinin böcek öldürücü özellikleri yoktur. Bu yüzden genellikle biyolojik pestisit olarak kullanılırlar (URL1).

1.1.1.2. *Bacillus mycoides*

Toprak kökenli bakteri grubu olan *Bacillus mycoides*'ler gram pozitif çubuk şeklinde görünüme sahiptirler. Hücreleri genellikle 3 mikrometreden daha büyüktür. Glukoz agar üzerinde üretilen hücreler yoğun miktarda depolama maddesi ürettiklerinden kolonilerinde boşluklu veya köpüksü bir görünüm sergilerler. Elipsoidal, santral, parasantral, subterminal şekillerde bulunabilen sporları şişkin değildir. Kapsül mevcut değildir. Sıklıkla basiller zincir şeklini oluştururlar. Koloni görünümleri genellikle krem beyaz veya opaktır. Fakültatif anaeropturlar. Maksimum 35-40 °C

minimum 10-15 °C'ler arasında üreme gösterirler. Nütrient agar ve broth'ta üretilebilir, % 7 NaCl ortamında değişken üreme gösterir. Genel olarak pH 5,7'de iyi üreme (6 ve 7 için değişken olduğu) gösterirler. Katalaz, kazain, eskulin, jelatin hidrolizi, voges-proskaur gibi biyokimyasal testler için pozitif sonuç verirler (Gordon vd., 1973). *B. cereus*'la benzerlik gösterir. Fakat agardaki rhizoid koloniler hareketsiz ve ayırt edici formdadır.

1.1.1.3. *Bacillus insolitus*

Toprak kökenli bir bakteri olup gram pozitif olarak boyanır. Hareketli veya kokoid çubuklar ve hareketsiz koklar halinde bulunabilirler. Bir polar ve bir supolar kamçıları vardır. Terminal konumlu, elipsoidal yadasilendirik sporlarıvar ve spor şişkin değildir. 0 °C'de sporlanma ve çimlenme gösterirler. Koloniler nutrient agar'da küçük, yumuşak, düzensiz ve kırık beyaz renkli koloniler şeklinde görülürler. Optimum 25 °C'de ürerlerken minimum 0 °C'de üreyebilirler. Aerobik koşullarda % 2 NaCl ve pH 7 ortamlarında iyi üreme gösterirler. Tuz ve üre büyümesi için gerekli değildir (Gordon, 1973).

1.1.1.4. *Bacillus licheniformis*

Toprak kökenli mezofilik bir bakteridir. Optimum iyi üreme ve enzim salgılanması için optimum 30-37 °C'de sıcaklıkları tercih etmektedir. Olumsuz şartları spor formlarında geçirir. Özellikle serçe gibi karasal kuşlar ile ördek gibi su ortamında yaşayan kanatlıların göğüs ve sırt tüylerinde bulunduğu bildirilmektedir.

1.1.1.5. *Bacillus macerans*

Bitki numunelerinden ya da gıdalardan izole edilen ve katalaz pozitif olan bakterilerdir. Fakültatif anaerobik olup yüksek sıcaklıklarda üreme gösterdikleri fakat tuz konsantrasyonunda toleransları düşüktür. Sporangium şişmiş, sporlar elipsoide olup merkezi veya terminal konumludur.

1.1.1.6. *Bacillus globisporus*

Toprak ve sudan köken alan gram pozitif bakterilerdir.

1.1.1.7. *Bacillus laterosporus*

Toprak ve sudan köken alan gram pozitif bakterilerdir. Fakültatif aneorop olup nitrat'ı nitrit'e çevirebilen bakterilerdir. Yüksek sıcaklıklarda üreyebilen bakterilerdir. Sporanjium şişmiş, sporlar elipsoide olup merkezi veya terminal konumludur.

1.2. *Bacillus*'ların Antimikrobial Özellikleri

Bazı *Bacillus* suşları sekonder metabolit olarak çeşitli maddeler (antibiyotikler, bakteriyosinler, biki gelişimini teşvik eden maddeler vb.) üretirler ve bu maddeleri farklı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör aktivitesi gösterirler. *B. megaterium*'dan elde edilen megacinler bu mikroorganizma ile ilişkide olan diğer mikroorganizmaları inhibe eder. *B. subtilis*'ten izole edilen botrycidin AJ 1316 ve alirin B - 1 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B. subtilis*'ten elde edilen subtilin ve subtilosin A gram pozitif bakterilerin çoğu suşları üzerinde inhibitör etkinliğe sahiptir. *B. licheniformis*'ten elde edilen M-4 den M-4 amoebicidal maddenin bakteri ve mantarlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Zheng ve Slavik, 1999). *B. brevis* gramisidin antibiyotiği üretir. *B. polymyxa* 'dan polymyxin antibiyotiği elde edilir (Logan, 1988).

1.3. Toprak Mikroflorası

Toprak sadece kum, silt ve kil gibi mineral parçacıklarından ve çeşitli ayrılma fazındaki organik maddelerden oluşmaz. Topraklarda hem mikroskopik hem de makroskopik boyutlarda karmaşık bir canlılar dünyası bulunmaktadır. Çok sayıda bakteri, mantar, alg, virüs, protozoa gibi organizmalarla birlikte mikroskopik boyutlarda omurgasızlardan omurgalılara kadar değişen toprak canlıları karmaşık bir etkileşim içindedirler. Toprak bu canlılar için bir yaşam ortamıdır. Barındırdığı bu canlılar, toprağın gelişmesinde, fiziksel-kimyasal özelliklerinin şekillenmesinde ve verimliliği üzerine büyük rol oynarlar. Bunlar olmadan toprağın oluşumu ve işlevlerini yerine

getirmesi mümkün değildir. Mikroorganizmalar, toprak faunasının işbirliği ile çeşitli hayvan ve bitki kalıntılarını ayrıştırarak içerdikleri mineral maddelerin açığa çıkmasını sağlarlar. Bu esnada oluşturdukları metabolitler ve ana ürünler ile toprağa yoğun bir biyokimyasal özellik kazandırırılar. Bu aktiviteler sonucu oluşan son ürünlerden çeşitli varlıklar öncelikle de bitkiler yararlanırılar. Böylece doğal yaşam süreçleri işlevini sürdürür.

Toprak mikroorganizmaları ve diğer bazı makroskobik canlılar, toprağın verimliliğini arttırarak doğal ekosistemlerde vejetasyonun gelişmesini sağlar, toprağı rüzgâr ve su erozyonuna karşı korurlar. Toprak mikroflorasının toprak verimliliğini arttırması yanı sıra bazen bitki, hayvan ve hatta insanlar için hastalık etkeni olabilmektedirler. Ayrıca toprakta bulunan bazı mikroorganizmalar diğer canlıların gelişmesini oluşturdukları antibiyotik, bakteriosin, alkol ve organik asitler gibi çeşitli metabolitler üreterek diğer toprak mikroorganizmalarının üremelerini engelleyebilmektedirler (URL-2). Mikroorganizmaların bitki ve toprak ile ilişkileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

1. Bitki ve hayvan artıklarının dekompozisyonu
2. Mineral maddelerin bitki için yararlı hale getirilmesi
3. Azot fiksasyonu, humusun teşkili ve dönüşümü
4. Bitki özümsemesi için gerekli karbondioksitin meydana getirilmesi
5. Suda eriyebilen bitki besin maddelerinin depo edilmesi ve mineral halde hümüse transferi
6. Suda eriyebilen maddelerin hümüsten bitkiye transferi
7. Bitki gelişimini teşvik eden vitamin ve hormonların meydana getirilmesi
8. Toprak eriğindeki besin iyonlarının konsantrasyonlarını sabit tutan tampon maddelerin meydana getirilmesi
9. Toprağın su tutma kapasitesini arttırma ve köklerin daha iyi havalanmasını sağlama
10. Agrigatlarla ilgili maddeleri yaparak toprağın erozyona karşı direncinin artırılması (Şahinkaya, 1967).

1.3.1. Toprak Reaksiyonu ve Mikroflora

Toprak pH'sı besin iyonlarının topraktaki davranışları (çözünürlük, yarayırlılık, toksisite vd.) topraktaki enzimatik ve mikrobiyal reaksiyonların yönünü etkilemesi açısından en önemli toprak özelliğidir. Mikrobiyal sitoplazmanın pH düzeyi yaklaşık olarak nötraldir. Bu nedenle toprak mikroorganizmaları en iyi pH 7.0 civarında gelişme gösterirler. Ancak istisnai durumlarda mevcuttur. Genel olarak toprak bakteri ve aktinomisetleri asit koşullara karşı mantarlardan az toleranslıdır. Mantarların pek çok türü podzal (kül renkli, Fe ve Al düşük yıkanmış toprak) topraklar gibi asit koşullarda (pH 3) gelişebilir ve dominant florayı oluşturabilir (URL-2).

1.4. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Mikroorganizmalar (PGPR)

Toprakta bulunan mikroorganizmalar doğal ekosistemlerin devamlılığını sağlamada önemli bir yere sahiptir. Mikroorganizmalar, özelleşmiş moleküller ve sinyaller ile bitki ve topraktaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlerde yer almaktadırlar. Toprakta, bitki sağlığı açısından zararlı mikroorganizmalar kadar bitki sağlığına doğrudan ya da dolaylı olarak etki eden mikroorganizmalar bulunmaktadır. Yararlı mikroorganizmaların, bitki patojenlerine karşı etkilerinin yanında birbirleri ile olan etkileşimleri tarımsal açıdan birlikte kullanımları önemlidir (Karapire ve Özgönen, 2013).

PGPR toprakta serbest yaşayan bakterilerdir (Kloepper vd., 1989) ve bazıları canlı bitkilerin dokularını istila ederek, belirtisiz enfeksiyonlara neden olurlar (Sturz ve Nowak, 2000). PGPR'ler doğrudan ve dolaylı yollardan bitki gelişimini teşvik edebilirler (Beauchamp, 1993; Kloepper, 1993; Kapulnik, 1996; Lazarovits ve Nowak, 1997). Doğrudan uyarı mekanizmaları; uyarıcı bakteriyel uçucular ve fitohormonların üretimi, bitkide etilen seviyesinin azalması, bitki besin elementlerinin alınması (çözünmeyen kaynaklardan fosfat ve mikro besin maddelerinin açığa çıkarılması; simbiyotik olmayan azot bağlanması) ve hastalıklara dayanıklılık mekanizmalarının uyarılmasını kapsar. Dolaylı etkileri ise PGPR'ların farklı mekanizmalar ile bitki hastalıklarını azaltmalarıdır. Bu mekanizmalar, diğer yararlı simbiyozların

popülasyonunda artış veya azalmalarda uyarıcı etkiler, bulaştırılmış topraklarda ksenobiyotiklerin indirgenmesi yoluyla bitkileri koruma şeklindedir (Jacobsen, 1997).

Bitki kök sisteminde bulunan büyüme teşvik edici bakteriler olarak adlandırılan (PGPR) mikroorganizmalar; fitohormon üreterek, inorganik fosforu çözündürerek, demir-şelat sideroforları üretilip demir alımını arttırarak, auxin, sitokin, giberellin gibi bitki hormonları üreterek ya da bakteri tarafından üretilen veya çevrede var olan besinlerin alımını kolaylaştırarak, bitki gelişimini teşvik ederler. PGPR'nin çimlenme oranı, kök büyümesi, verim, yaprak alanı, klorofil içeriği, Mg, N içeriği, protein, hidrolik aktivite, kurağa dayanım, sürgün ve kök ağırlıkları ve yaprakta absiyon tabakasının oluşumunun gecikmesi suretiyle bitki büyümesine fayda sağladığı belirlenmiştir (Lucy vd., 2004). PGPR uygulamaları laboratuvar, sera ve tarla koşullarında yürütülmekte, ancak tarla denemelerinde beklenmeyen koşullar bazen uygun sonuçların alınmasını zorlaştırmaktadır. Topraktaki pH değişimleri, yüksek sıcaklık, düşük yağış, nem ve besin noksanlığı gibi uygun olmayan koşulların ortaya çıkması mikroorganizma kolonizasyonunu azaltmaktadır (Dobbelaere vd., 2001; Şahin vd., 2004).

Tarımda biyogübre veya kontrol ajanı olarak biyopreparat tarımda kullanılması 1990'lı yıllardan sonra yaygınlaşmıştır. Son yıllarda biyolojik gübrelemenin kapsamı genişlemiş serbest yaşayan, bitkisel gelişimi teşvik eden, biyolojik savaş ajanı veya biyogübre olarak kullanılan bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) kullanılmaya başlanmıştır. Söz konusu bakteriler *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Alcanigenes*, *Arthrobacter*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Artrobacter*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* ve *Flavobacterium* cinslerindeki ırkları içermektedir. *Aspergillus* ve *Penicillium* funguslarının biyolojik gübre olarak kullanıldığını bildiren araştırmalar mevcuttur (Rodriguez and Fraga, 1999; Sturz and Nowag, 2000; Bloenberg ve Luktenberg, 2001; Esitken vd., 2003; Çakmakçı ve Erdoğan, 2005).

PGPR'ler genellikle kök sisteminde kolonize olarak bitki gelişimini düzenlemekte ve zararlı rizosfer mikroorganizmalarını baskı altında tutmaktadırlar. PGPR'ler tohum

çimlenmesi, kök gelişimi ve bitkinin sudan yararlanmasına da çok önemli katkılar sağlamaktadır. Bu rhizobakteriler büyüme hormonlarını üreterek ve faydalı mikroorganizmalar lehine rizosferde mikrobiyal dengeyi değiştirerek doğrudan yadamineral madde oranını düzenleyerek dolaylı olarak bitki gelişimini etkileyebilmektedir. Bakteriyel, fungal ve nematod hastalıklarını geniş ölçüde baskılamakta, ayrıca viral hastalıklara karşı koruma sağlamaktadırlar. Bitki büyümesini teşvik eden rhizobakteriler toprak ve bitki rizosferinde bulunurlar. Bu mikroorganizmalar sürdürülebilir tarım için potansiyel araçlardır. Kök gelişimini arttırmakta ve sık sık bitki patojenlerini kontrol altında tutmaktadırlar. Son birkaç yıl içinde bu alanda belirgin gelişmeler olmuştur. Bitki hastalıklarının PGPR ile biyokontrolü, bitki gelişimini teşvik etmedeki rolleri, biyogübreleme ve bitki hormonlarının üretimi gibi konular ilgi alanına girmektedir (Antoun ve Prevost, 2006).

Toprak mikroorganizmaları, organik ve inorganik besinlerin biyokimyasal döngüsünde önemli rol oynamaktadır. Bakteriler tarafından bitki verim ve gelişmesinin artırılması mekanizmaları bu güne kadar çoğu bitkide tamamen açıklanamamıştır. Bakteriler, aminosiklopropan karboksilat deaminaze (ACC) üretebilme özellikleriyle bitki köklerindeki etilen miktarını azaltarak kök uzama ve gelişmesini teşvik etmektedir (Penrose ve Glick, 2001).

Tablo 2. ACC içeren, bitki gelişimini teşvik edici bakteri aşılamaalarının, bitkilerdeki etkileri.

Bitki türü	PGPR	Etkiler	Kaynak
<i>Brassica campestris</i>	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	Bakteri kök uzamasını teşvik etmekte	Madhaiyan vd.,2006
<i>Brassica campestris</i>	<i>B. circulans B. firmus ve B. globisporus</i>	Aşılama kök ve gövde gelişimini artırmış	Ghosh vd.,2003
<i>Brassica napus</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	Kök uzunluğunda %35-41 oranında artış	Indiragandhi vd.,2008
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kök uzaması ve nodül sayısında artış	Donate-Correa vd.,2004
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	Kök, kök-gövde ağırlığı ve meyvede artış	Gravel vd.,2007
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Nodül gelişimi teşviki	Ma vd.,2003
<i>Zea mays</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	Kök uzamasında artış	Shaharoon vd.,
<i>Vigna radiata</i>	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	Nodülasyonda artış	2006 a, b
<i>Zea mays</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Agronomik parametrelerde artış	Babalola vd.,2003

Bitki gelişmesindeki artışın; bakteriyel ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakterilerin ACC'yi hidrolize edebilme özellikleri, sayesinde mevcut etilen miktarını azaltmaları sonucu, etilenin gelişmeyi engelleme özelliğinin ortadan kalkmasından kaynaklandığı yönünde bulgular ortaya konulmuştur. ACC deaminaze aktivitesine sahip bakterilerin bitkisel gelişmeyi teşvik edici olarak kullanılabilmesi ve bu özelliğin etkin bitki gelişimini teşvik edici bakteri seçiminde önemli bir ölçüt olabileceği bilinmektedir (Tablo 2). Ancak ACC deaminaze aktivitesi gösteren her bakteri bitki gelişmesini artırmamaktadır. Bitki gelişimini teşvik edici bakteri geliştirilmesinde tek başına ACC deaminaz aktivitesinin yeterli kıstas olmayacağı yönünde araştırma bulguları da bulunmaktadır (Dey vd., 2004).

ACC deaminaze aktivitesi *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Variovorax* sp., *Alcaligenes* sp. ve *Bacillus* sp. türlerinde yaygın olmakla birlikte; farklı gruplar tarafından yürütülen araştırmalarda, gram negatif bakteriler (Wang vd., 2000; Babalola vd., 2003), gram pozitif bakteriler (Belimov vd., 2001; Ghosh vd., 2003), endofit bakteriler (Pandey vd., 2005; Sessitsch vd., 2005), *Rhizobium*'lar (Ma vd. 2003a; Uchiumi vd., 2004) ve mantarlar (Minami vd., 1998; Jia vd., 1999) gibi bir çok mikrobiyal türde ACC deaminaze aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Özellikle bitki gelişimini uyaran kök bakterilerinin (PGPR) bazı ırkları kullanılarak, bazı bitkilerde bazı virüs hastalıklarına karşı sistemik uyarılmış dayanıklılık (ISR) sağlanabilmektedir. Kültür bitkilerinde, PGPR olarak çok sayıda bakteri cinsi rapor edilmesine (Adesemoyel vd., 2008; Podile ve Kishore, 2007) rağmen, genellikle bitki virüs hastalıklarına karşı ISR sağlayan PGPR ırkları, 3 farklı bakteri cinsi (*Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Serratia*) içerisinde yer almaktadır.

1.4.1. Biyogübrelerin Tarımda Kullanımı

Bitkisel üretimde verimliliğin artırılması, toprakların fiziksel ve kimyasal yapısının iyileştirilmesi, insan sağlığının korunması ve çevre kirliliğinin önlenmesini amaçlayan organik gübrelerin kullanımının gerekli olduğu bilinmektedir. Organik gübreler içerisinde son zamanlarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan biyolojik gübreler oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Toprakların doğal yapılarında bulunan ve toprakta yetişen bitki türleri ile simbiyotik ve nonsimbiyotik yaşayarak havanın serbest

azotunu konukçu olduğu bitkinin hizmetine sunan *Rhizobium* sp. bakterileri ile azotobakteriler gibi bakterilerin yanında toprak fosforunu elverişli hale getiren fosfat çözücü bakteriler ve mavi-yeşil algler vb. mikroorganizmaların hepsi biyogübre olarak adlandırılmaktadırlar. Biyogübre olarak kullanılan bu mikroorganizmalar bitki gelişmesi için gerekli olan besin elementlerinin döngüsünde görev aldıkları için toprak verimliliğinin önemli unsurlarıdır. Gerek organik tarım gerekse konvansiyonel tarımda kullanılan organik ve mineral gübrelerin bitki tarafından etkin bir şekilde alınmasını sağlayarak, optimum ürünün eldesi için oldukça önemlidir (Sudhakar vd., 2000).

Günümüzde biyogübreleme tüm dünyada bitkilere yapılan azot desteğinin yaklaşık % 65'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. En etkili azot fiske eden bakteri ırkları *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* ve *Allorhizobium* cinslerinde mevcuttur. Bu bakterilerin hepsi baklagil bitkileriyle birlikte simbiyoz oluşturmaktadırlar (Bloenberg ve Luktenberg, 2001). Biyogübrelerin yapraktan uygulanması, azot fiksasyonunun asimilasyon bölgesine yakın meydana gelmesi ve uygun dozlarda kullanımı sonucu pek çok bitki patojenlerine antagonist etki oluşturarak avantaj sağlamaktadır (Sudhakar vd., 2000).Yapılan birçok araştırmada; inorganik veya organik fosfat çözebilen bakterilerin toprağa veya bitki tohumlarına inokülasyonu ile bitki büyümesinin teşvik edildiği rapor edilmiştir (Gaur ve Ostwal, 1972; Subba, 1982; Kloepper vd., 1988; Kucey vd., 1989).

1.5. Sideroforlar

Kimyasal anlamda, siderofor (Yunanca demir taşıyıcı) demirin yetersiz bulunduğu ortamda ökaryotik, prokaryotik ve yüksek organizmalar tarafından salınan düşük moleköl ağırlıklı metal şelat bileşiklerdir (Miethke ve Marahiel, 2007). Önceki literatürlerde siderofor; siderokrom, sideramin, sideromisin ve ionofor olarak kullanılmaktadır. Ancak, artık bu terimler Yunanca'da sideros; demir ve phores; taşıyıcı anlamına gelen siderofor terimi ile yer değiştirmiştir (Thomashow ve Weller, 1995).

Sideroforlar; doğadan başka yerde bulunmayan, pek çok değişik amino asitleri yapısında bulunduran, 400-1500 Da moleköl ağırlığındaki demir bağlayan

proteinlerdendir. Sideroforların yapısı türler arasında oldukça büyük değişiklikler göstermektedir. Şimdiye kadar yaklaşık 500 siderofor değişik mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Boukhalfa ve Crumbliss, 2002). Sideroforların çok çeşitli uygulama alanları vardır ve yapılan çalışmalarda sideroforların biyoteknoloji dünyasında önemli olduğu bildirilmiştir (Diaz de Villegas, 2007). Bu nedenle sideroforlar; özellikle sağlık, tarım, kozmetik gibi biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadırlar (Winkelmann, 2002). Özellikle kanser ve malaria gibi hastalıkların tedavisinde demir taşıyıcısı ve antibiyotik olarak kullanıldıkları bildirilmektedir.

1.6. Bazı Ağır Metaller Ve Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri

1.6.1. Çinko

Çinko, insan ve hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de çok çeşitli ve önemli metabolik işlevlere sahiptir. Protein ve karbonhidrat sentezine katılmasının yanı sıra, enzim aktivasyonu, fotosentez, solunum ve biyolojik membran stabilitesi üzerine etkileri nedeniyle üretilen ürün miktarı ve kalitesini direkt olarak etkilemektedir (Rout ve Das, 2003). Çinko, yoğun endüstri alanlarından bırakılan atık sularla, kanalizasyonsularıyla ve asit yağmurları aracılığıyla toprağa ulaşmaktadır (Vaillant vd., 2005). Çinko toksisitesinde bitkilerin kök ve sürgün büyümesi azalır, kökler inceler, genç yapraklar kıvrılır ve kloroz görülür, hücre büyümesi ve uzaması engellenir, hücre organelleri parçalanır ve klorofil sentezi azalır (Rout ve Das, 2003). Çinkonun kök meristem hücrelerinde bölünecek olan hücrelerde birikerek profazın sonundaki olayları engelleyerek mitoz bölünmeyi engellediği ayrıca hücrelerin ligninleşmesini sağlayarak hem kök hem de gövde büyümesini engellediği bildirilmiştir (El-Ghamery vd., 2003). Yüksek dozlardaki çinkonun klorofil sentezini etkilemesinin nedeni olarak yeterli demir bulunması halinde bile bitkinin bundan yararlanmasını engellemesi ve klorofilin merkezinde bulunan magnezyumun yerine geçmesi gösterilmektedir (Van Assche ve Clijsters, 1990).

1.6.2. Gümüş

Altın ve bakırdan daha sonra keşfedilen gümüş eskiden dünyanın birçok farklı bölgesinde mevcut olan az sayıda ki kaynaklardan elde edilmekteydi. Doğal gümüş; saf veya daha çok altın, bakır, civa ve diğer metallerle alaşımlar halinde bulunuyordu. Gümüş, ışığı çok iyi yansıtan, dövülebilen, esnek bir metaldir. Bitkiler için gerekli olmayan ve doğada yaygın bulunmayan bir metaldir. Son zamanlarda nanopartikül çalışmaları ile işlenebilirliği yeni bir boyut kazanmış buda araştırmaları yer altı kaynaklarına yöneltmiştir.

1.6.3. Demir

Demir dünyada en bol bulunan kimyasal elementtir ve mikroorganizmalar büyümeleri için bu elemente ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle organizmalarda birçok hücrel ve metabolik işlemler için düzenleyici görevleri vardır. Demirin; fotosentez, oksijen salınımı, solunum, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü, gen regülasyonu, nitrat sentezi, azot fiksasyonu, ATP sentezi ve DNA sentezi gibi metabolik reaksiyonlarda ve diğer biyolojik olaylarda birçok mikroorganizma için önemli bir element olduğu bildirilmektedir (Ratledge ve Dover, 2000; Skaar, 2010; Hammer ve Skaar, 2011). Ökaryotik organizmaların demiri çözmesi çok zor olmasına rağmen, bakteriler kendileri için gerekli olan demiri kullanmak için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Demirin Fe-III şeklindeki çözünürlüğü çok düşüktür ve dolayısıyla organizmalar tarafından kullanılamazlar (Erdem, 2013).

1.6.4. Bakır

Bakır bitki bünyesinde enzim aktivasyonu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında yer alması nedeniyle önemli bir elementtir (Kacar ve Katkat, 2006). Bakır kirliliği insan aktivitesi sonucu oluşan emisyon ve atmosferik depositler, pestisid kullanımı, kanalizasyon atıklarının gübre olarak değerlendirilmesi, kömür ve maden yataklarından kaynaklanmaktadır. Toprakta 100 mg/kg, bitki kuru maddesinde ise 15-30 mg/kg'dan fazla bakır toksik etkilidir. Bakır toksisitesi genellikle bitki kök sistemlerinde açığa çıkar ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon

alımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olur (Sossé vd., 2004).

Topraktan artan düzeylerde yapılan bakır uygulamalarının (kontrol, 1000 ve 2000 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$ toprak pH'sı ve bitki besin maddesi alımı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada artan bakır dozlarının toprak pH'sı, değişebilir magnezyum ve bitkiye yararlı demirin azalmasına, toplam N, alınabilir P, değişebilir. K, bitkiye yararlı Zn ve Cu içeriklerinin artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Sönmez vd., 2006).

1.6.5. Kurşun

Kurşun endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerde yaygın olarak kullanılması nedeniyle çevrede sık rastlanılan bir elementtir. Otomobil endüstrisi, batarya ve benzin katkısı olarak tetraetil ve tetrametil olarak kullanılmasının yanı sıra kurşun içeren pestisidlerin kullanılmasıyla da topraklara ulaşabilmektedir. Kurşun elementi bitkiler için mutlak gerekli olmayıp, toprakta 15-40 ppm dozunda bulunur, topraktaki kurşun konsantrasyonu 150 ppm'i aşmadığı sürece insan ve bitki sağlığı açısından tehlike oluşturmaz. Ancak 300 ppm'i aştığında potansiyel olarak insan sağlığı açısından tehlikelidir (Dürüst vd., 2004). Kurşun elementi, hücre turgoru ve hücre duvarı stabilitesini olumsuz etkilemesi, stroma hareketlerini ve yaprak alanını azaltması nedeniyle bitki su rejimini etkilemektedir. Aynı zamanda kökler tarafından tutulması ve kök gelişimini azaltması nedeniyle bitkilerin katyon ve anyon alımını azaltmakta dolayısıyla besin alımını etkilemektedir (Sharma ve Dubey, 2005).

1.7. Ağır Metalin Mikroorganizmaya Etkisi

Ağır metaller, metabolik reaksiyonları yavaşlatır ve canlı organizmalar için aşırı derecede zehir etkisi yapar. Dünyada, endüstriyel gelişmeye bağlı olarak zehirli ağır metaller ve boyar maddelerle çevre kirlenmesi artmaktadır. Ölü veya canlı hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırıldığında, çoğu kez ölü mikroorganizmaların daha yüksek giderme kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Ölü mikroorganizmalarla yapılan giderme işlemine biyosorpsiyon adı verilir. Biyosorpsiyon yöntemi, ağır metal

giderimi için en uygun alternatiftir. Biyosorpsiyon; biyolojik materyallerin, sulu çözeltilerdeki atık maddeleri hücre yüzeyi veya içine alarak gidermesidir. Bu biyolojik materyaller; mantarlar, bakteriler, algler gibi canlılardır (URL-3).

Hemen bütün organizmaların yüzeyi negatif yüklü olduğundan pozitif yüklü metal iyonları (bakır (Cu^{+2}), kurşun (Pb^{+2}), çinko (Zn^{+2}), mangan(Mn^{+2}), kadmiyum (Cd^{+2}), nikel (Ni^{+2}), cıva (Hg^{+2}), krom (Cr^{+2}), demir (Fe^{+2}), vs.) adsorbe etme yeteneğine sahiptirler. Bazı canlı organizmalar metal iyonlarını hücre içine alarak vakullerde biriktirirler. Biyosorpsiyon ile metallerin ayrılması hücre duvarı ile metal arasında etkileşimin sonucudur. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif (-2) yüklü reaksiyon alanları ile kompleks yaparak adsorplanabilecekleri gibi bazı mikroorganizmalar hücrelerin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyerek çözeltiden metal iyonlarını bağlayabilirler. Ayrıca hücre duvarındaki proteinler, iyonları bağlamak için fonksiyonel grupları ve peptid bağlarını da tercih edebilirler. Ağır metal iyonlarının mikroorganizma yüzeyine tutunması adsorpsiyon izotermi ile gösterilebilen tersinir bir taşınım olayıdır. Ağır metallerin mikroorganizmalara biyosorpsiyonunu birçok faktör etkilemektedir. Bu faktörler mikroorganizmanın yüzey özellikleri, film difüzyonu, film kalınlığı, çözeltilerin sıcaklığı, pH, başlangıç metal iyon derişimi, karıştırma hızı, mikroorganizma derişimi gibi parametreleri içerir. Biyosorpsiyon olayında özellikle pH kritik bir parametredir (URL-4).

Metaller, mikroorganizmaların hücre zarını, sitoplazmasını, metabolizmasını ve yapısal işlevlerini bozmak suretiyle olumsuz yönde etkilemektedirler. Metabolizma üzerindeki etkileri ise transkripsiyonun inhibisyonu, hücre membranının bozulması, translasyonun inhibisyonu, DNA tahribi, hücre bölünmesinin inhibisyonu ve protein denatürasyonudur. Ancak mikroorganizmalar bünyelerine çeşitli yollarla giren metallerin toksisitesinden korunmak için bazı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu savunma mekanizmaları arasında; pozitif yüklü iyonların negatif yüklü hücre yüzeyine (dış zar ya da hücre membranına) bağlanması, bu metalleri hücrenin EPS (ekzopolisakkarit) olarakda bilinen hücre dışı polimerik maddelere bağlaması, volatilasyonu, hücre içinde indirgemesi, molekülerpompalanması, hücre içinde alıkoyulması, sitoplazmada metalotiyonein gibi proteinlerin üretimi, sitoplazmada metal tuzlarınıpresipite etme gibi olaylar yer almaktadır.

Biyosorpsiyon mekanizmaları mikroorganizma yapılarının kompleks olması nedeni ile çeşitlilik göstermektedir. Bu mekanizmalar 2 ana başlık altında özetlenmektedir. Birincisi hücre metabolizmasına dayalı biyosorpsiyon; ki bu metabolizmaya bağlı ve bağlı olmayan şeklinde gerçekleşmektedir. İkincisi; Metalin uzaklaştırıldığı bölgeye dayalı biyosorpsiyon; olup ekstrasellüler akümülyasyon / presipitasyon, hücre yüzeyi sorpsiyonu ve intrasellüler (hücre içi) akümülyasyon olaylarını kapsamaktadır.

Metal ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki, fizikokimyasal etkileşim sırasında fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi ve kompleks oluşumu gerçekleşir ve buna hücre yüzeyinde sorpsiyon denir ve metabolizmadan bağımsızdır. Mikrobiyal biyokütlenin hücre duvarı, büyük oranda polisakkarit, protein ve yağları içerir, çok sayıda metal bağlama fonksiyonel gruplarına sahiptirler. Bu gruplar; karboksilik, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gruplarıdır. Bu fizikokimyasal metal biyosorpsiyonu, metabolizmadan bağımsızdır ve nispeten hızlıdır; alglerde 5-10 dakika içerisinde gerçekleşir ve metaller geri kazanılabilir.

Metal bağlama süreci iki basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamak, hücre duvarında metal ve reaktif kimyasal gruplar arasında sitokiometrik etkileşimdir, ikincisi ise artan metal miktarlarının inorganik birikimidir. Bakteri hücre duvarı, metal iyonları ile temasta bulunan ilk bileşendir. Ölü veya inaktif hücre ile metal sorpsiyonunun tipi ekstrasellüler olduğu için hücre duvarının kimyasal fonksiyonel grupları biyosorpsiyonda önemli rol oynamaktadır. Bakteri hücre duvarında bulunan fonksiyonel gruplar karboksil, fosfonat, amin ve hidroksil gruplarıdır.

Bakteri hücre duvarlarının yapısında sadece bu yapılar metal bağlama görevi yapmazlar, bundan başka Gram pozitiflerde teikoik asit ve teikronik asitte metal bağlamada önemli rol oynamaktadır. *E. coli* dış zarında bulunan fosfolipid ve LPS'nin sahip olduğu fosforil grupları da metal katyonlarının bağlanabileceği muhtemel bölgeler arasında yer almaktadırlar. *Streptomyces pilosus*'un karboksil gruplarının bakır bağlamadan sorumlu olduğu, bundan başka amin gruplarının da metal uzaklaştırmada etkili olduğu, katyonik metal iyonlarını şelatlamakla kalmayıp aynı zamanda hidrojen

bağladığı ya da elektrostatik etkileşim sonucu anyonik metal türlerini ve boyaları adsorblayabildikleri rapor edilmiştir.

Biyosorbent olarak önemli bir yere sahip olan mikrofungus ve mayalar da tercih edilmektedir. Mikrofungus biyomaslar, çok iyi metal bağlama özelliği gösteren hücre duvarı yapısına sahip olduklarından biyosorpsiyonda avantajlı mikroorganizmalardır. Özellikle *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Streptoverticillum* ve *Saccharomyces* biyosorpsiyonda oldukça etkili fungal cinslerdir (URL-5).

1.8. Toprakta Ağır Metalin Önemi ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba; kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar (Gür vd., 2004).

Birçok ağır metal, d orbitallerinin tamamen dolu olması nedeniyle geçiş elementleri olarak bilinir. Bu d orbitalleri ağır metal kationlarına redoks tepkimelerine girebilen veya giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, ağır metaller birer iz element olarak birçok karmaşık biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır. Örneğin kalsiyum Ca(II), kobalt Co(II), krom Cr(VI), Cu(II), Fe(II), K(I), Mg(II), Mn(II), Na(I), Ni(II) ve Zn(II) gibi metaller mikroorganizmalar için esansiyel metaller olup besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, mikrobelerin olarak redoks tepkimelerinde, moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmak ve ozmotik basıncı kontrol etmek için enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Fakat gümüş Ag(I), alüminyum Al(I), altın Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi ağır metallerin biyolojik bir önemi yoktur ve bu metaller esansiyel değildirler. Aynı zamanda besinsel değeri de yoktur. Bununla birlikte, mikroorganizmalara oldukça yüksek toksik etkileri bulunmaktadır. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açıp, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları

bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilirler. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında önemli bir yerleri bulunmaktadır (Kılıç ve Dönmez, 2008). Bitki gelişimi için mutlak gerekli element olsun veya olmasın ağır metallerin doku ve organlardaki aşırı birikimi bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Gür vd., 2004).

Ağır metaller bu toksik etkileri nedeniyle bitkilerde transpirasyon, stoma hareketleri, su alımı, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge gibi birçok fizyolojik olayın bozulmasına neden olmaktadır (Kennedy ve Gonsalves, 1987). Toksikite, metalden metale değişebildiği gibi, organizmadan organizmaya da değişebilmektedir. Olumlu veya olumsuz (toksik) etkiler yalnızca elementin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olmayıp değişik türlerin genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilgilidir (Haktanır ve Arcak, 1998).

Topraklara karışan ve buralarda biriken ağır metaller, toprak verimliliği ve mikrobiyal aktiviteyi, biyolojik çeşitliliği, çevre faktörlerini ve en alt kademedan en üst kademeye kadar tüm canlıları etkilemektedir. Ağır metallerin yol açtığı çevresel kirlenme dünya genelinde ciddi bir sorun olmakla birlikte, günümüz sanayi toplumlarında bu kirlenmeyi önlemek pek fazla mümkün olamamaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, diğer gıda ürünlerine nazaran az miktarlarda tüketilmekle birlikte, yüksek oranda ağır metal içermeleri durumunda, sürekli kullanımlarda sağlık üzerine olumsuz etki gösterebilmektedir. Bu durum bitkinin türüne, maruz kaldığı stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına göre büyük değişiklikler göstermektedir. Bitkilerin bu kirleticilere karşı hangi tepkiler verdiğini ve hangi adaptif mekanizmalar geliştirdiğini belirlemek oldukça önemlidir (Yaldız ve Şekeroğlu, 2013).

Tekstil, deri, boya, metal ve kağıt endüstrilerinden kaynaklanan atık sular fazla miktarda ağır metal içermektedir. Bu tip atık suların arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye boşaltılmaları o çevredeki canlılara toksik ve mutajenik etki yapmaktadır. Çeşitli metaller bazı organizmalarda canlılığın devam ettirilmesi için çok az miktarlarda kullanılsalar da yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Ag, Al, Au, Cd, Pb ve Hg gibi toksik metallerin ise biyolojik önemi bulunmamakla birlikte

hücrede düşük konsantrasyonda bile bulunmaları tehlikeli olmaktadır (Bruins vd. 2000; Nies, 2003).

Yapılan birçok çalışmada, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalarla endüstriyel atık sulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmaların toksik kanserojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticeleri ortamdaki uzaklaştırabilmesi ağır metallerle direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalarca ağır metalin içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş sistemlerdir (Bruins, 2000; Malik, 2004; Sultan ve Hasnain, 2006; Egler vd., 2005).

Ağır metallerle dirençli mikroorganizmalar, bahsedilen bu direnç sistemlerinden birini veya birkaçını bir arada kullanarak toksik etkiden korunmaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır. Stres koşuluna yanıt niteliğinde sentezi artan bazı proteinler mikrobiyal dirençte anahtar rol oynamaktadır. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu strese adapte olabilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini artırma yoluna gidebilmektedir. Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini, hem de zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini içerebilmektedir. Bu tip proteinlerin, tanımlanarak stres koşullarına mikrobiyel yanıtın belirlenmesi, proteom çalışmaları ile mümkün olmaktadır (Kılıç ve Dönmez, 2008).

Tarımsal üretimde yüksek verim elde etmek için gübre uygulamaları zorunluluk olarak görülmektedir. Ancak uygulanan gübrelerin miktarları, çeşitleri ve uygulama zamanlarının farklılık göstermesi ve bu alandaki bilgi yetersizliği nedeniyle canlı sağlığı ve çevre olumsuz olarak etkilenmektedir. Yapılan yanlış gübre uygulamalarıyla topraklarda tuzlanma, ağır metal birikimi, besin maddesi dengesizliği, mikroorganizma etkinliğinin bozulması, sularda ötrofikasyon ve nitrat birikimi, havaya azot ve kükürt içeren gazların verilmesi, sera etkisi vb. sorunlar oluşturmaktadır (Sönmez vd., 2006).

Günümüzde toprakta ağır metal kirliliği önemli çevresel problemlerden birisidir. Ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla havyan ve insan sağlığı üzerine de önemli etkileri vardır. Bitki bünyesine ulaşan ağır metaller bitkilerin fizyolojik aktivitelerini engellemekte, verimliliklerini azaltmakta ve ölümlerine neden olmaktadır. Dolayısıyla ürün kalite ve miktarının azalmasına yol açmaktadırlar. Bitkilerin ağır metal toksisitesine karşı toleransları bitki türüne, element türüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle ağır metalin tür ve miktarı, yarayışlılığı, zararın şiddeti ve türü ayrıca zarar oluşum sürecinin bilinmesi bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından oldukça önemlidir (Sönmez vd., 2008).

1.8.1. Bitkilerin Ağır Metal Toksisitesine Tolerans Mekanizmaları

Gübreleme, pestisid kullanımı, endüstriyel atık ve gazlar aracılığıyla toprağa bulaşan ağır metallerin bitkiler aracılığıyla topraktan uzaklaştırılması fitoremedasyon olarak adlandırılmaktadır. Fitoremedasyon'un başarılı olarak yürütülebilmesi için bulaşmanın olduğu alanlarda biyokütle oluştururken önemli miktarda metal biriktiren hiperakümülatör bitki türlerinin kullanılması gerekmektedir. Hiperakümülatör bitkilerinin ağır metal içerikleri ve gereksinimleri biriktirici olmayan türlere göre daha fazladır. Bu bitkiler, 10 ppm'den daha fazla Hg, 100 ppm Cd, 1 000 ppm Co, Cr, Cu ve Pb ve 10 000 ppm Ni ve Zn içerirler. Bugün bilinen 400 ağır metal biriktirici bitki bulunmaktadır (Reeves ve Baker, 1999). En bilinen bitki *Thlaspi caerulescens* (*Alpine pennycress*)'dir. Bu bitkilerin tolerans mekanizmaları özetlenecek olursa;

Hücre duvarlarına metal bağlanması: Pb-karbonat olarak tutulur.

Hücre membranlarına doğru taşınımın azalması: Ağır metallerin bitki köklerinde tutulup, gövde ve sürgünlere taşınmasının engellenmesi ile taşınma azaltılmaktadır.

Vakuollerde depolama: Zn elementi Zn fitat, malat ve oksalat gibi düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler halinde, Cd tiol gruplarına ve Ni histidin ile bağlanması sonucunda vakuollerde depolanır.

Şelatlama: Cd'un, tiol gruplarına, Pb glutathione ve aminoasitlere bağlanarak fitoşelatlar oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra organik asitlerden sitrat, malat ve malonate

ile birleşerek fitoşelatları oluşturmaktadırlar. Metallothioneinler birçok hayvan ve bitkide bulunan proteinlerdir. Ağır metaller ile bağlanarak protein bileşiklerini oluştururlar (Aksu ve Yıldız, 2004).

Sonuç olarak günümüzde, endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, kentsel atıkların gübre olarak kullanımı, kimyasal gübre ve pestisit uygulamaları, atık su ile yapılan sulamalar ve arıtma çamuru uygulamaları ile önemli miktarda ağır metal toprağa ulaşmaktadır. Ağır metallerin toprakta birikmesi, sadece toprak verimliliği ve ekosistem faaliyetleri üzerine etkili olmayıp, bitki bünyesindeki fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi birçok metabolik olayları etkilemeleri nedeniyle bitki sağlığını ve bozulan besin zinciri nedeniyle de hayvan ve insan sağlığını önemli düzeyde etkilemektedir (Sönmez vd., 2008).

1.9. Biyoremedasyon

Biyoremedasyon, mikroorganizmalar kullanılarak zararlı maddeleri toksik olmayan bileşiklere dönüştüren bir proses olup, kimyasal sıvıların ve tehlikeli atıkların arıtılması için kullanılan ümit verici tekniklerden biridir (Ceyhan ve Esmeray, 2012). Bakteriler zararlı atıkları, zararsız yan ürünlere dönüştürdükten sonra ya ölürler ya da sayıları normal popülasyon düzeyine ulaşarak ekolojik dengeyi bozmadan ortamı iyileştirirler. Ayrıca, toprakta bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ile toprak rehabilitasyonu için en uygun kompozisyon oluşturulabilmeleri mümkün olmaktadır (Ceyhan ve Esmeray, 2012).

Biyoremedasyon doğal olarak meydana gelen bir prosestir; mikroorganizmaların çevresel kirlilikleri sabitleyerek ya da dönüşüme uğratarak nihai/son ürün haline getirmeleri sürecidir (Dindar vd., 2010). Biyoremedasyonun etkili olabilmesi için, mikroorganizmaların kirliliklere enzimatik atakta bulunarak onları zararsız ürünlere dönüştürmeleri gerekir. Bu yöntem sadece çevresel şartların mikrobiyal büyüme ve aktiviteye izin verdiği durumlarda etkili olabilir. Kirleticiyi parçalayan mikroorganizmalar, kirleticiler ile yakın ilişkide ve doğru yerde olmalıdırlar. Eğer mikroorganizma popülasyonu mevcut değilse, mikroorganizmaları kirleticilerle temas ettirmek için bazı mühendislik mekanizmaları geliştirilmelidir (Singh ve Ward, 2004).

Bunlardan bazıları, çevresel koşulları kontrol edilmelisi, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin veya büyümelerinin optimize edilmesi şartların iyileştirilmesi gibi mekanizmalar olabilmektedir (Dindar vd., 2010).

Biyoremedasyon için çevrenin optimizasyonunda; sıcaklık, nutrientler (başta azot ve fosfor), elektron alıcılar, (oksijen, nitrat, sülfat) ve pH gibi çevresel faktörlerindüzenlenmesi gelmektedir (Baker ve Herson, 1994). Sağlık ve ekolojik yönden geniş alana yayılmış olan petrol ve petrol türevleri, gazolin, klorlu alifatikler (PCE), tetrakloretilen (TCE) ve klorlu aromatik hidrokarbonlar mikroorganizmalar tarafından kolayca detoksifikasyona uğratılırlar. Metaller biyolojik olarak parçalanamaları da mikroorganizmalar tarafından daha az zararlı hale dönüştürebildikleri için biyoremedasyon dahilinde değerlendirilirler (Vidali, 2001).

Biyoremedasyon teknikleri tipik olarak yakma gibi diğer geleneksel metotlardan daha ekonomiktir. ABD Çevre Koruma Kurumunun (EPA) programına göre, zararlı maddelerle kirlenmiş bölgelerde, geleneksel yöntemlere göre 10 kat daha ucuza mal olduğundan biyoremedasyon kullanımı uygun görülmüştür (Russell vd., 1992). Doğal azaltma proseslerine dayalı bir yöntem olduğu için toplum tarafından diğer teknolojilere göre daha kabul edilebilir olarak göz önünde tutulmaktadır. (Dindar vd., 2010). Biyoremedasyonda rol oynayan mikroorganizmalar funguslar, mayalar ve bakterilerdir.

Biyoremedasyon olayında kontaminant maddeleri parçalayabilen ve onları toksik olmayan yan ürünlere dönüştüren mikroorganizmaların büyümeleri teşvik edilerek onların doğal proseslerinden yararlanılır (Tablo 3). Yani biyoremedasyon uygulaması atıkların döküldüğü bölgeye besin aktarımı yapılarak, toprağın bakteri kompozisyonuna göre, doğal olarak toprakta bulunan bakterilerin etkin duruma geçirilmesi ya da toprağa yeni bakteriler aktarılması şeklinde olabilir. Mikroorganizmalar kontaminantlara maruz kaldığında artan bir yetenek ile bu maddeleri degrades etme yönünde bir gelişme gösterirler. Genellikle bu toksik maddeyi parçalayarak enerji elde eden mikroorganizma suşları ön plana çıkmaktadır (Alexander, 1999).

Biyoremedasyonda tehlikeli atıkları bertaraf etmek için genetik olarak düzenlenmiş mikroorganizmaların kullanımı ABD Çevre Koruma Kurumu (EPA)

tarafından yasaklanmıştır. Böyle mikroorganizmaların doğada rekabet güçleri zayıftır. Bununla beraber, insan sağlığı ve çevre açısından da ne gibi riskler taşıdığı pek bilinmemektedir. Bu nedenle bu tip mikroorganizmalar ancak laboratuvar çalışmalarında kullanılır (Alexander, 1999).

Tablo 3. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler.

Uygun kimyasal biyolojik faktörler	Uygun hidrojeolojik faktörler
Az sayıda organik kirlilik	Granüler boşluk alan
Aşırı toksik olmayan kirleticiler	Yüksek permeabilite(10^{-4} cm/s)
Mikroorganizmaların çeşitliliği	Uniform mineroloji
Oksidasyon için uygun elektron alıcı	Homojen alan
Uygun pH aralığı	Doyurulmuş tabaka
Uygun olmayan kimyasal biyolojik faktörler	Uygun olmayan hidrojeolojik faktörler
Birçok organik ve inorganik kirleticilerin karışımı	Kırık kayalar
Toksik kirleticiler	Düşük permeabilite
Düşük Mikrobiyal popülasyon	Kompleks mineroloji
Oksidasyon için elektron alıcısı yokluğu	Heterojen alan
Uygun olmayan pH aralığı	Doyurulmamış tabaka

1.9.1. Biyoremedasyonun Avantajları

1. Biyoremedasyon ekolojik olarak güvenli doğal bir prosestir.
2. Kontaminantların bir besin kaynağı olarak mevcut olması durumunda var olan mikroorganizmaların artması, kontaminantların azalması durumunda da popülasyon kendiliğinden azalması işlevidir.
3. Biyolojik parçalanmadan çıkan atıklar genellikle karbondioksit, su, yağ asitleri gibi zararsız bileşiklerdir. Orijinal kirleticiden daha toksik bir ürün oluşturma olasılığı çok azdır.
4. Biyoremedasyonda kontaminantlar çevresel bir ortamdan bir diğerine transfer edilmeden hedef kimyasal maddeler tamamen ortadan kaldırılmaktadır.
5. Biyoremedasyon tehlikeli atıkların bertaraf edilmesi için sıklıkla kullanılan teknolojilere göre daha ucuzdur. Örneğin, biyoremediasyon ile bir bölgenin temizlenmesi maliyeti 45–50 milyon \$ iken atıkların ortadan kaldırılması için bir fırın inşa etme maliyeti 140 milyon \$'a kadar çıkmaktadır. Ayrıca atıkların taşınması da farklı alanların kirlenmesine neden olabileceği için pek tercih edilmez (Alexander, 1999).

1.9.2. Biyoremedasyonun Dezavantajları

1. Sahip olduğu bazı sınırlamalar biyoremedasyonun bir temizleme teknolojisi olarak yaygın kullanımını engeller.
2. Biyoremedasyona başlamadan önce çok iyi bir araştırma yapılması gerekmektedir ve kompleks kontaminant karışımı ve bölgeler için uygun biyoremedasyon teknolojisi mühendisine gerek duyulmaktadır. Toprakta mikroorganizmaların izolasyonu için mikrobiyologlara, parçalanma yol izinin belirlenmesi için ise biyokimyacılara gerek duyulmaktadır.
3. Biyoremedasyonla yapılan temizleme işlemi yakma veya toprağın kazılıp atılması ile karşılaştırıldığında uzun bir zaman almaktadır.
4. Bazı toksik yan ürünlerin oluşumuna karşı önceden tedbir almak gereklidir (Alexander, 1999).

1.10. Literatür Çalışmaları

Karmaşık çevre koşullarından kaynaklanan çok sayıda faktörler; örneğin; parlak ışık, UV, çok yüksek ve düşük sıcaklıklar, donma, kuraklık, tuzluluk, ağır metaller ve hipoksi dünya çapında önemli mahsul kayıplarına yol açmaktadır (Boyer,1982; Mahojan and Tuteja, 2005; Mittler, 2006). Genel olarak mikroorganizmalarda sekonder metabolitlerin üretimi logaritmik fazın sonunda, sporulasyondan önce meydana gelmektedir. Karbon kaynağı olarak glikozun ortamda kullanımı ve gelişmenin sonraki aşamaları sırasında azalan pH ile basitrasın üretimi artmıştır (Azevedo vd., 1993).

Bitki virüs hastalıklarına karşı biyokontrol ajanı olarak genellikle yoğun bir şekilde PGPR olarak *Pseudomonas fluorescens* suşları kullanılmıştır. Bu ırkların virüslere karşı başarılı bir şekilde dayanıklılık sağlayabileceği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Maurhofer vd., 1994; Raupach vd., 1996; Ryu vd., 2007; Bharathi vd., 2004; Kandan vd., 2002; Kandan vd., 2005; DeMeyer vd., 1999; Kavino, vd., 2007; Resca, vd., 2001; Karthikeyan vd., 2009; Kavino vd., 2008). Uyarılmış dayanıklılık mekanizması salisilik asit (SA) ve patojenle ilişkili protein (PR) genlerinin sistemik olarak birikmesi ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Maurhofer vd., 1998).

PGPR ırkları *Serratia marcescens* 90-166 ve *B. pumilus* SE34 uygulanan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde CMV' nin enfeksiyon oranının azaldığı belirlenmiştir. Özellikle burada 90-166 ırkı tarafından oluşturulan dayanıklılığın SA ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Ryu vd., 2004). Aynı şekilde bu ırkın (*S. marcescens* 90-166) salatalık bitkisinde CMV'ye karşı dayanıklılık sağladığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Raupach vd.,1996).

Toprakta ağır metallerin varlığı besin zincirine girme potansiyellerinden dolayı önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Bazı kullanılabilir yerinde toprak iyileştirme teknolojileri; kazı, taşıma, kirlenmiş toprakların depolanması, asit sızdırması, kimyasal stabilizasyon ve elektro manyetik iyileştirme gibi yüksek maliyet düşük verimlilik içeren işlevler ekonomik zorluğa ve zarara yol açmaktadır (Lasat, 2002; Kumar ve Nagendran, 2009). Çeşitli mikroorganizmalar ağır metaller için yüksek bir ilgiye sahiptir. Toksik metaller toprakta kalsa da mikroorganizmalarla bir kez bağlanmalarından sonra bitki veya toprakta yaşayan hayvanlar tarafından alınması daha az olmaktadır. Bu şekilde bioaugmentasyon ve biostimulasyon varlığı, microbiyoremidasyon stratejileriyle topraktan ağır metal gideriminin ya da metal iyonlarının biyolojik mevcudiyetinin azaltılmasını içermektedir (Das ve Chandran, 2011).

Congeevaram vd. (2007) yaptıkları çalışmada, endüstriyel atık topraklarında izole ettikleri bakteri ve fungus türlerinin farklı metalleri buldukları ortamdan toplayabilme özelliklerini araştırmışlardır. Bakteriler için optimum pH'ın 7.0 funguslar için 5-5,2 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle funguslardan birinin Cr toksisitesini 10.000 mg/L' ye kadar tolere edebildiği ve sonuçlarda Cr ve Ni bulunan atıklar için *Aspergillus* ve *Micrococcus*' unuygulanabilirliğini bildirmişlerdir.

Kaliteli bir toprak yapısı geliştirmek ve onu muhafaza etmek sürdürülebilir tarımın amaçları arasındadır. Sürdürülebilir tarıma duyulan ilgiden dolayı, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini teşvik etmek için, organik atıkların ilavesi gibi tarımsal uygulamalara ivme kazandırılmıştır (Sonnleitner vd., 2003). Toprağın fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi, toprak neminin artmasını, toprak strüktürünün düzenlenmesine ve erozyona karşı dayanıklılığına katkı sağlar. Toprak yapısını

güçlendirmek için, özellikle son yıllarda bazı organik substratların yoğun kullanımına ilgi gösterilmeye başlanmıştır (Lynch ve Bragg, 1985; Tisdall vd., 1997; Sonnleitner vd., 2003b).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri

Örneklerin incelenmesi için kullanılan laboratuvar gereçleri; Uv-Vis spektrofotometre (Spectramax M5), AVANTA, GBC (Atomik absorpsiyon), soğutmalı santrifüj (Sigma, 2-16PK), pH metre (Hanna HI3220), çalkalayıcı (GFL-3005), ısıtıcı blok (Nosheng MS100), inkübatör (Mettler 600), jel görüntüleme sistemi (UVP-Digi-Doc It), iklimlendirme kabini (Daihan-WGC), distile su cihazı (GFL-2108), güvenlik kabineti (Nüve-MN-20), ışık mikroskobu (Nikon-E100), güç kaynağı (OWL-OSP-500), koloni mikroskobu, pastör fırını (Nüve-FN-500), otoklav (Nüve-OT-40L), hassas terazi (Denver-PL-214), vorteks (Heidolph-Reax top), derin dondurucu, etüv, buzdolabı, UV-transilüminatör, araştırma mikroskobu (Olympus Bx51 ve BSPROP 200, görüntü işleme ve analiz sistemi ile birlikte), magnetik karıştırıcı ve bar, çeşitli cam malzeme (mavi kapaklı şişeler, vida kapaklı (5, 10 ve 20 mL'lik) tüpler, erlenmayer, beher, lam, lamel, mezür, pastör pipeti, baget) ve plastik malzemeler (5-10'luk plastik pipetler, pipet (beyaz, sarı ve mavi) uçları, pipet kutuları, petri (6, 12 mm çaplı) kapları, falkom (15 ve 50 mL'lik) tüpleri, endorf (0,5, 1,5 ve 2,0 mL'lik) tüpleri, piset), bek alevi, mikropipet seti, pens, öze, eküvyon çubukları, filtre kâğıdı, sporlar, raglar, kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler; monosodyum fosfat, bromo phenol blue, 2-ethanesulfonik asit (PIPES), 1-5 diphenyl carbazide hexadieyltrimethylammonium (HDTMA), sodium dodesil sülfat (SDS), potasyum fosfat dibazik (K2HP04), glukonik asid sodyum tuz, TaqDNA polimeraz (10 X buffer ve dNTP 250UN mix), potasyum fosfat, demir sülfat, sodium klorür, kalsiyum fosfat, amonyum sülfat, çinko klorür, magnezyum klorür, demir klorid, amonyum klorür, kobalt klorid, bakır sülfat, agaroz, asetik asit, molibden trioksit, Phenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1), sodium arsenat (SIGMA), mueller hilton agar ve broth, eozin metilen blue (EMB), luria bertani (LB) broth, brain heart infusion broth, patoto dekstroz agar, yeast ekstrakt powder, meat ekstrat, malt ekstrat agar, NaOH, glukoz (MERCK), agar agar, pepton (FLUKA), sodyum asetat, % 96'lık etil alkol (KİMETSAN).

2.2. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

2.2.1. Müller Hinton Agar (MHA) ve Müller Hinton Broth (MHB) Besiyerleri

Ticari olarak temin edilen besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda tartılarak bir litre (2 g beef ekstrat, 17,5 g asit kazein 1,5 g nişasta ve 15 agar) distile suda çözüldü. Otoklavlavda 121 °C'de 1.1 Atm. basınç altında 15-20 dk. steril edildikten sonra steril şartlarda 9 cm'lik steril petri kaplarına dağıtıldı. Sıvı besiyeri (MHB) ticari firmanın önerisi doğrultusunda aynı besiyerinin agar içermeyen formu kullanıldı. Besiyerleri genel üretim amacıyla kullanılmış olup, kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi.

2.2.2. Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) ve sıvı Besiyeri (BHIB)

Ticari olarak temin edilen besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda tartılarak bir litre distile suda çözüldü. Otoklavlavda 121 °C'de 1.1 Atm. basınç altında 15-20 dk. steril edildikten sonra steril şartlarda 9 cm'lik steril petri kaplarına dağıtıldı. Sıvı besiyeri (MHB) ticari firmanın önerisi doğrultusunda aynı besiyerinin agar içermeyen formu kullanılarak mavi kapaklı şişelerde hazırlandı. Besiyerleri genel üretim ve bazı fiziksel ve kimyasal testlerin yapılması amacıyla kullanılmış olup, kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi.

2.2.3. Hareket Besiyeri

Besiyeri hazırlamak için MHB besiyeri kullanıldı. Ticari firmanın önerisi doğrultusunda tartıldı ve % 0.6 g agar ilave edilerek karıştırıcı yardımıyla distile suda agar eriyene kadar ısıtılarak çözüldü. Sıcakken tüplere 5 mL dağıtılıp 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.4. NaCl Testi

Ticari olarak temin edilen firmanın önerisi doğrultusunda 250 mL'lik mavi kapaklı 3 ayrı şişede 100 mL MH sıvı besiyerine hazırlanandı. Besiyerlerine sırası ile

her birine % 5 (5,48 g), % 10'luk (10,96 g) ve % 15 (16,42 g) NaCl ilave edilerek karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Her birinin pH'sı 6.6-7.4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5. Biyokimyasal Testler

2.2.5.1. İndol Besiyeri

İndol sıvı besiyeri için 1,5 g peptone ve 0,5 g NaCl, 100 ml distile suda çözüldü. Vida kapaklı tüplerin her birine 3 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121 °C'de 1.1 atm basınç altında 15-20 dk. otoklav edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.2. Metil Kırmızısı (Red) Besiyeri

Bu besiyeri için 7 g peptone, 5 g Glukoz, 5 g K₂ HPO₄ tartılarak 1 L distile su da (pH 6.9) çözüldü. Vida kapaklı tüplerin her birine 3 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121 °C'de 1.1 atm basınç altında 15-20 dk. otoklav edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.3. Sitrat Besiyeri

Üretici firmanın (MERCK, Almanya) önerilen doğrultusunda 225 g granül halinde ki besiyeri tartılıp 1000 ml distile su içinde çözüldü ve tüplerin her biri 5 mL olacak şekilde dağıtıldı. 121 °C'de 1.1 atm basınç altında 15-20 dk. otoklav edildi. Yatık olarak donduruldu ve kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.4. İki Şeker (Kligler İron) Agar Besiyeri

Kligger Agar besiyeri, ticari olarak temin edilen besiyerinden 55 g tartılıp 1 L distile su içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Vida kapaklı tüplerin herbirine 6 mL olacak şekilde dağıtıldı. 1.1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemine tabi

tutulduktan sonra yatık şekilde soğutuldu ve slant agar hazırlandı. Tüpler donduktan sonra kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C’de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.5. Nitrat Besiyeri

Ticari olarak temin edilen beef ekstraktan 3 g, peptondan 5 g ve potasyum nitrattan (KNO₃) 1 g tartılarak 1 L distile suda karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Vida kapaklı tüplere 3 mL miktarında dağıtıldı ve 1,1 atm basınçta 121 °C’de 15 dk. otoklavda steril edildi. Besiyeri kullanılacağı süreye kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.6. Üreaz Besiyeri

Ticari olarak temin edilen üre agar base’den 2,9 g tartılıp 100 mL distile su da çözüldü, % 1.5 agar ilave edildi ve 1.1 atm basınçta 121 °C’de 15 dk. otoklav edildikten sonra 50 °C’de su banyosunda bekletildi. Filtre ile steril edilen % 1 üre solüsyonundan 5 mL ilave edildikten sonra steril plaklara 10-15 mL kadar döküldü. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C’de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.7. Amilaz Besiyeri

Ticari olarak temin edilen beeft extrattan 0,9 g, nişastadan 3 g ve agardan 3,6 g tartılarak 300 mL distile suda karıştırıcı yardımıyla çözüldükten sonra 1,1 atm basınç altında 121 °C’de 15 dk. otoklavda steril edildi. Steril petri kaplarına 4 mm kalınlığında tevzi edildi. Plaklar kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4 °C’de kapalı bir kap içinde muhafaza edildi (Bilgehan, 2004; Coneman, 1997).

2.2.5.8. Lesitinaz Besiyeri

Ticari firmanın önerdiği ölçülerde 500 mL BHIA besiyeri hazırlandı ve 1,1 atm basınçta 121 °C’de 15 dk. otoklav edildikten sonra 50 °C’de su banyosunda bekletildi.

İki yumurta yıkandı ve yüzeyi (% 70'lik) alkolde 3'dk. bekletilerek steril edildi. Yumurtaların sarı kısmı steril şartlarda falkom tüplerine alındı ve vorteks yardımıyla iyicene çırıldı. Hazırlanmış ve su banyosunda bekletilen besiyeri içine steril şartlarda ilave edildikten sonra homojen karıştırılıp steril petri plaklarına döküldü. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında +4°C'de bekletildi (Bilgehan, 2004; Coneman, vd., 1997).

2.2.5.9. Jelatin hidrolizasyon Besiyeri

Nutrien sıvı besiyerine % 10 jelatin ilave edilerek kaynar suda eritilir. Vida kapaklı tüplere 2 mL şeklinde dağıtılır ve otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilir. Kullanılacağı süreye kadar oda ısında bekletilir (Bilgehan, 2004).

2.2.5.10. Siderofor Besiyeri

Hazırlıktan önce tüm cam şişeler 6 mM'lık HCl ile temizlenerek eser elementler uzaklaştırıldı ve cam şişeler iki distile su ile üç kez yıkandı. Bu test üç farklı hazırlık aşamasından oluşmaktadır (Dworken ve Foster, 1958). Bunlar;

a) Boya Solüsyonu;

Solüsyon 1:Chrome azurol-S (CAS)'in 0,06 g 50 mL ddH₂O'da çözüldü.

Solüsyon 2: FeCl₃.6 H₂O'nun 0,0027 10 mL HCl'de çözüldü.

Solüsyon 3: HDTMA'nın 0,073 40 mL ddH₂O'da çözüldü.

Solüsyonların karışımı; solüsyon 1'in içine 9 mL solüsyon 2'den ilave edildikten sonra solüsyon 3'ün tümü karıştırıldı. Solüsyon mavi renge dönüştükten sonra cam şişede otoklavlanıp kullanılacağı süreye kadar (1 hafta içinde kullanılır) buzdolabında saklandı.

b) Minimal media 9 (MM9); Bunun için 15 g KH₂PO₄, 25 g NaCl ve 50 g NH₄Cl tartılıp 500 mL dd H₂O'ya tamamlandı.

% 20 Glukoz Stok Solüsyonu; 20 g glukoz 100 mL dd H₂O'da çözüldü ve otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısında bekletildi.

Stok NaOH; 25 g NaOH 150 mL dd H₂O'da (yaklaşık olarak pH 12 dır) çözüldü ve besiyerinin pH ayarı için kullanıldı.

c) CAS Agar Hazırlanışı; MM 9'dan 100 mL alındı ve 750 ml double distile suda çözüldü. PİPES (2-ethanesulfonik asit)'in 32,24 g ilk solüsyona ilave edildi. Bu işlemten sonra solüsyon pH 5.0'in altına düşer. NaOH ile pH 6.0-6.8 aralığına (6,8'i geçerse rengi yeşile dönüşmekte) ayarlandı. Daha sonra 15 g agar ilave edilip otoklavlandı ve soğuması için 50 °C'ye ayarlı su banyosundabekletildi. Soğutulan agarın içine 10 mL % 20'lik steril glukoz solüsyonundan ilave edildi. Üzerine yavaşça 100 mL boya solüsyonu ilave edilip yavaşça karıştırıldı ve steril petri plaklarına döküldü. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi.

2.2.5.11. Fosfat Çözünürlüğü (Katı ve Sıvı) Besiyeri

Besiyeri için 10 g glukoz, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 5 g MgCl₂.6H₂O, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,1 g KCl, 0,1 g (NH₄)₂SO₄ ve % 1,3 agar tartılıp hazırlandıktan 500 mL distile suda karıştırıcı yardımıyla çözüldü ve pH 7.0'ye ayarlandı. İndikatör olarak 0,025 g brom fenol mavisi (BPB) ilave edilip ve 1.1 atm basınçta 121°C'de 15 dk. otoklav edilir. Steril şartlarda steril petrilere döküldü ve kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi (Aydoğan vd., 2013).

2.2.5.12. Amonyum Üretimi Besiyeri

Ticari olarak temin edilen peptondan 10 g ve NaCl'den 5 g tartılıp 1 L distile suda çözüldü ve mavi kapaklı şişelede otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi. Çalışma esnasında steril şartlarda 2 mL'lik steril ependorf tüplere 1,5 mL miktarında dağıtılarak kullanıldı (Bakker, 1987).

2.2.5.13. Nessler Reagent

0.09 mol/L potassium tetraiodomerkurat (II) (K₂[HgI₄]) ile 2.5 mol/L potasyum hidroksit (KOH) distile suda çözülerek taze hazırlanıp kullanıldı (Bakker, 1987).

2.2.5.14. 1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat (ACC Deaminaz) Besiyeri

Manuel olarak hazırlanan besiyerine için 4 g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 μg H_2BO_3 , 10 μg MnSO_4 , 70 μg ZnSO_4 , 50 μg CuSO_4 , 10 μg MoO_3 , 2 g glukoz, 2 g glukonik asit, 2 g sitrik asit ve 12 g agar tartılıp hazırlandıktan sonra 1 litre distile suda karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Litreye 2 gr amonyum sülfat ilave edilerek otoklavda steril edildi. Steril şartlarda steril petrilere döküldü ve kullanılacağı süreye kadar buzdolabında muhafaza edildi (Dworken ve Foster, 1958).

2.2.5.15. AgNO_3 Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MHA besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Distile suda AgNO_3 'ın (Appllichem) 100 mM'lık stok solüsyon hazırlandı. Besiyerinin içine 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L olacak şekilde AgNO_3 solüsyonu ilave edildikten sonra 1.1 atm basınç altında 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı.

2.2.5.16. CuSO_4 Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MHA besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Stok solüsyon 2,496 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 mL distile suda çözülerek 100 mM'lık hazırlandı. MHA besiyeri içine 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek magnetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. 1.1 atm basınç altında 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi ve steril şartlarda, steril petrilere döküldü. Kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı.

2.2.5.17. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MHA besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Stok solüsyon için 3,3121 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 100 mL distile suda magnetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. MHA besiyeri içine 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L olacak şekilde

Pb(NO₃)₂ ilave edilerek otoklavda steril edildive steril şartlarda petrilere döküldü. Kullanılacağı zamana kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

2.2.5.18. ZnCl₂ Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MHA besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Stok solüsyon için 1,3635 g ZnCl₂ 100 mL distile suda mağnetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. MHA besiyeri içine 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L olacak şekilde ZnCl₂ ilave edilerek 1,1 atm basınç altında 121 °C’de 15 dk. otoklavda steril edildi. Daha sonra steril şartlarda petrilere döküldü ve kullanılacağı zamana kadar buzdolabında saklamaya alındı.

2.2.5.19. FeCl₃.6H₂O Besiyeri

Ticari olarak temin edilen MHA besiyeri, firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Stok solüsyon için 2,703 g FeCl₃.6H₂O, 100 mL distile suda mağnetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. MHA besiyeri içine 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L olacak şekilde FeCl₃.6H₂O ilave edilerek 1,1 atm basınç altında 121 °C’de 15 dk. otoklavda steril edildi. Steril plaklara döküldükten sonra kullanılacağı zamana kadar buzdolabında saklandı.

2.2.5.20. Farklı pH Aralığında Cu’luve Cu’suz BHIB ve MHB’lerin Hazırlanışı

Ticari firmanın önerisi doğrultusunda (MHB) ve (BHIB) tartıldı ve distile suda çözümlenerek çift konsantre hazırlandı. Mavi kapaklı şişelere bir kısmı alınarak NaOH ve HCL yardımıyla pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5’e ayarlandıktan sonra distile su ilave edilerek tek konsantre hale getirildi.

Aynı şekilde hazırlanan MHB ve BHIB besi ortamlarına CuSO₄.5H₂O stok solüsyondan ilave edilerek 1,5, 2,0, 2,5 ve 3,0 mM olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan CuSO₄’lı BHIB besiyerlerinin pH’ları yukarıdaki şekilde ayarlandı. Tüm besiyerleri 1,1 atm basınç altında 121 °C’de 15 dk. otoklavda steril edildikten sonra buzdolabında kullanılacağı süreye (en fazla 1 ay) kadar saklandı.

Besiyerleri bakterilerin sıvı ortamda farklı pH'da, optimum bakır konsantrasyonlarında üreyebilme yeteneklerinin belirlenmesinde, üreme eğrilerinin belirlenmesinde ve büyük hacimde bakteri üretimlerinde kullanıldı.

2.2.5.21. Spektrofotometrik Ölçümler

Çalışmada sıvı ortamlarda bakır varlığının ölçülmesinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bu amaçla ölçümler (Spectramax M5) marka ve model spektrofotometre ile yapıldı. Her örnekten 100 veya 200 mL alınarak düztabanlı ELİSA plakalarına konuldu. Veriler Excel programına (SPSS 21) aktarılarak grafikleri çizildi.

2.2.6.Çimlenme Deneyi Düzenegi

Mısır tohumlarının Cu ve bakteri varlığında çimlenme deneyi düzenegi verilerinin tümü istatistiksel analizlerle değerlendirildi. Deney yapılacak petri plaklarına iki kat filtre kağıdı kesilip (120 cm) yerleştirildi ve otoklavda steril edilip kurutuldu, kullanılırken numaralandı. Gum arabik'in % 10'luk solüsyonu distile suda hazırlanıp otoklavda steril edildi. Bakır stok solüsyonu 100 mM olarak distile suda hazırlandı ve deney esnasında 1,5 mM steril distile suda sulandırılarak kullanıldı.

2.2.7.Ayıracılar

2.2.7.1. Oksidaz Testi Ayıracı

Bu amaçla 10 mL saf suda 0,1 g p-aminodimetilalanin okzalat eritilir. Ependorf tüplere 1 mL dağıtılarak aliminyum folyo ile kapatıldı ve kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de saklandı (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.2. Katalaz Testi

Test için % 30'luk H₂O₂ stokundan % 3'lük solüsyon hazırlanarak karanlık şişede stoklandı. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.3. Kovaks Ayıracı

Bu amaçla 10 g p-(dimettilamino benzaldehit), 150 mL izoamil alkolde çözüldü ve 50 mL HCl'e ilave edildi. Işık geçirmeyen karanlık şişeye doldurulduktan sonra kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.4. Metilred Ayıracı

Bu amaçla 0,05 g metil kırmızısı tartıldı ve 150 mL etil alkol (% 95) içinde havanda etil alkolle dövülerek çözüldü. Daha sonra 100 mL distile su ilave edilerek homojen çözünmesi sağlandı. Işık geçirmeyen şişeye aktarılarak kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.5. Voges Proskauer Ayıracı

A ayıracı; 5 g α -naftol tartıldı ve 100 mL etil alkol (% 95) ile çözüldü.

B ayıracı: 10 g Potasyum hidroksit 100 mL distile suda çözüldü.

İki ayıraç ayrı ayrı hazırlandı ve ışık geçirmeyen şişeye aktarılarak kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.6. Nitrat Ayıracı

A ayıracı; 0,5 g α -Naphthylamine tartılıp 100 mL % 30'luk acetic asit içerisinde çözüldü. B ayıracı; 0,8 g sülfanik asit tartılıp 100 mL % 30'luk acetic asit içerisinde çözüldü. C ayıracı; çinko tozu. Ayıraçlar ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karanlık şişelere aktarılıp, kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.7. Lugol Solüsyonu

Solüsyon için 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür tartıldı, havanda birlikte ezilerek 300 mL distile su ile homojenize edildi. Karanlık şişeye aktarılarak oda ısısında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.8. Kongo Kırmızısı

Ticari olarak temin edilen Kongo red boyasından 0,1 g tartılıp 100 mL saf suda çözüldü. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.9. 1 N'lik NaCl Çözeltisi

Çözelti için 58,8 g NaCl tartılıp 1000 mL distile suda çözülerek hazırlandı. Otoklavda steril edildikten sonra oda ısısında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.10. Kristal Viyole Boyası

A solüsyonu; 1 g kristal viyole tartılıp 10 mL % 96'lık etanolde çözülerek 90 mL distile suyla tamamlandı. B solüsyonu; 4 g amonyum oksalat 400 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Her iki solüsyon hazırlandıktan sonra karıştırılarak oda ısısında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.11. Safranin Boyası

Boya solüsyonu için 0,25 g safranin, 10 mL etil alkolde (%95) çözüldü. Üzerine 90 mL distile su ilave edilerek hazırlandıktan sonra oda ısısında bekletildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.7.12. Aseton Alkol

Gram boyamada dekolorizasyon için 1:1 oranında % 96'lık etil alkol ve aseton ile hazırlandı (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.2.8. Metal Stok Solusyonu hazırlanışı

Pb stok solusyonu; 3,793 g Kurşun ($Pb(NO_3)_2$) tartılıp, 100 mL distile suda çözülür. Cu stok solusyonu hazırlanışı; 2,4968 g Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) tartılıp, 100 mL distile suda çözülür. Fe stok solusyonu hazırlanışı; 2,703 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ tartılıp, 100 mL distile suda çözülür. Ag stok solusyonu hazırlanışı; 1,6987 g Gümüş nitrat ($AgNO_3$) tartılıp, 100 mL distile suda çözülür. Zn stok solusyonu hazırlanışı; 1,3635 g $ZnCl_2$ tartılıp, 100 mL distile suda çözülür.

Stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra her birinden 1mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM'lık konsantrasyonlar hazırlandı. MHA besiyeri içine alınıp 100 mL dH_2O 'da çözülüp, pH ayarlandı ve otoklav edildi (Coneman vd., 1997)..

2.3. Yöntem

2.3.1. Örneklerin Ekimi

Orkide örnekleri Rize ili yaylalarından 2012-2013 yılında çiçeklenme döneminde alındı. Orkide bitkisinin gövdesi ayrı, yumrusu ve 20 cm derinliğinde ki toprağı birlikte olacak şekilde steril plastik torbalara alındı. Teşhis edildikten sonra tüm örnekler çalışılacağı süreye kadar derin dondorcuda ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) bekletildi. Laboratuarda derin dondurucuda bekleyen orkide örnekleri işlem yapılmadan önce musluk suyunda iyice yıkandıktan sonra parçalanmadan bütün olarak % 70'lik etil alkol içinde 3 dk. bekletildi. Daha sonra steril distile su ile 3 kez yıkandı. Steril bisturi yardımıyla orkide kök ve yumrularından küçük parçalar kesilip MHA besiyerleri içine ekilerek $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 gün boyunca inkübe edildi.

Toprak örnekleri ise 10 g kuru ağırlığa eşdeğer miktarda yaş toprak tartıldıktan sonra 90 mL steril distile suda çözüldü. Dilüsyon yöntemi kullanılarak MHA ve EMB besiyerine 100 mikrolitre olacak şekilde yayma ekimleri yapıldı ve 37 °C'de 2 gün boyunca inkübe edildi.

2.3.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

Besiyerlerinde (MHB, EMB) üreyen koloniler makroskopik ve mikroskopik olarak incelendi. Farklı koloni morfolojileri gösteren bakteriler önce gram boyama yapıldı. EMB agarda üremeyen, MHA'da üreyen gram pozitif sporlu/sporsuz basiller tek koloni alınarak saf kültür için MHA besiyerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekimleri yapıldı ve 37 °C'de 1-2 gün inkübe edildi. Tek koloniler saf kültür için muller hinton sıvı (MHB) besiyerine pasaj yapılarak aynı şartlarda inkübe edildi. Elde edilen saf kültürler steril ependorf tüplerin içine, MHB sıvı besiyeri (800 µL) ve % 20 gliserol (200 µL) ilave edilerek, ikişer adet -80 ve -20 °C'de daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklamaya alındı. Petrilere üreyen örneklerin; koloni şekilleri, kapsül varlığı, pigment üretimi gibi makroskopik özellikleri incelendi ve tanı için kaydedildi. Daha sonra tanı için gerekli bir dizi biyokimyasal testleri yapıldı. Çalışmada bakteri izolatlarının daha iyi üremeleri için zengin besiyeri olan BHI agar ve sıvı besiyerleri kullanıldı. Her bir izolat en iyi üreme gösteren ortamda üretilmesi hedeflendi.

2.3.3. Hareket Testi

Bakterilerin flagella adı verilen hareket organellerinin varlığını göstermek amacıyla yapılan bir testtir, bakteriler besiyerinin her tarafında ürerler. Saf ve bir gecelik kültürlerden alınan bakteriler iğne öze yardımıyla batırma tekniği kullanılarak ekimleri yapılır, 18-24 saat 36 °C'de inkübasyona bırakılır. Hareketli bakterilerde ekim çizgisi boyunca yatay olarak bakterinin yayılması, hareket negatif olanlarda ise tek bir çizgi boyunca üremenin izlenmesiyle test değerlendirildi. Ayrıca bakterilerin petri plaklarında yayılma şeklinde üremeleri ile hareket pozitifliği desteklenmiştir (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.4. Oksidaz Testi

Müller Hinton agarda saf üretilen kültürlerden bir öze dolusu alındı. Petri kabına, filtre kağıdı küçük parçalar halinde kesilerek kondu ve üzerine oksidaz ayıracı ilave edildi. Bakteriler öze yardımıyla ayıraç damlatılmış filtre kağıtlarına sürüldükten sonra 30-60 saniye içerisinde koyu mavi rengin oluşumu oksidaz pozitifliğini, rengin değişmemesi negatifliğini gösterdi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.5. Katalaz Testi

Katalaz enzimi üreten bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırıştırırlar.. Bakteri kolonileri öze yardımı ile alınıp bir lamın üzerine bırakıldı. Üzerine bir iki damla H₂O₂ damlatıldı ve öze ile karıştırıldı. Katalaz olumlu olan bakteriler H₂O₂'i, H₂O ve O₂'e ayırıştırdığından dolayı gaz kabarcıklarının açığa çıkmasına sebep olurlar. Gaz kabarcığı oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.6. Sıcaklık Testi

Bakterilerin üreme sıcaklıklarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla MH sıvı besiyeri kullanıldı. Önce hazırlanan bakterilerin bir gecelik taze kültürden MHB besiyerinde McFarland 0.5 bulanıklıkta süspansiyonu hazırlandı. Sıvı besiyeri steril şartlarda 1.5 mL şeklinde steril 2 mL'lik ependorf tüplere dağıtıldı. Her bir örnekten 100 mikrolitre (µL) 3'er tekrarlı ependorf tüplere ekimleri yapıldı ve tüpler 10, 20, 30, 40 ve 45 °C'lik etüvlerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24-48 saat sonra üreme gerçekleşen tüpler pozitif olarak kaydedildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.7. NaCl Tolerans Testi

Bu test için MHB besiyeri kullanıldı. Ticari firmanın önerisi doğrultusunda hazırlanan sıvı besiyerine % 10 ve % 15 olacak şekilde NaCl tartılarak ilave edildi. Çözündükten sonra 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklav edildi. Steril şartlarda 1,5 mL miktarda 2 mL'lik steril ependorf tüplere dağıtıldı. Önce hazırlanan bakterilerin

taze kültürden MHB besiyerinde McFarland 0,5 bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Her bir bakteriden üçer adet % 10 ve % 15'lik NaCl içeren ependorflara 100 µl miktarında ekimleri yapıldı. Kültürler 36 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra üreme olan kültürler pozitif olarak kaydedildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.8. pH Testi

Bakterilerin en iyi üreyebildiği pH aralıklarının belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla MHB besiyerleri firmanın önerisi şeklinde 4 farklı şişede 100'er mL için hazırlandı. Her biri glasiyel asetik asit ve HCl kullanılarak pH 4.5, 5.5, 6.5 ve 8.5 şeklinde farklı pH'lara ayarlandı ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklav edildi. Steril şartlarda 2 mL'lik steril ependorflara 1,5 mL şeklinde dağıtıldı. Önceden hazırlanan bakterilerin taze kültürlerinden, MHB besiyerinde McFarland 0.5 bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı ve her bir pH'dan 3 tekrarlı olacak şekilde 100 µL miktarında ekimleri yapıldı. Önekler 36 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme olan örnekler pozitif olarak kaydedildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9. Biyokimyasal Testler

2.3.9.1. İndol Besiyeri ve Deneyi

Bu test bakterinin buldukları triptofanaz enzimler ile triptofandan indol oluşturduklarının araştırılması temeline dayanan bir testtir. İncelenecek bakterilerin taze kültürlerinden öze yardımıyla indol besiyerine ekimleri yapıldı ve 18-24 saat 36 °C'de enkübe edildi. Üreme olan tüplere kovaks ayırıcından 5-6 damla tüp kenarından akıtılarak besiyerinin üzerine döküldü. Birkaç saniye içerisinde besiyeri ile ayıraç arasında parlak kırmızı bir halkanın oluşması pozitif, sarı halka oluşması negatif sonuç olarak kabul edildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.2. Metil Kırmızısı (Red) Testi

Metil kırmızısı deneyi bakterilerin karbonhidratları fermante etmeleri esnasında oluşan laktik, asetik ve formik asit gibi ürünlerden besiyerinin pH'sını metil kırmızısı

ayıracı ile saptanabilecek derecede düşürmeleri temeline dayanır. Bu amaç için tamponlanmamış glikozlu besiyeri ve metil kırmızısı ayıracı kullanıldı. Besiyere saf kültürden ekim yapıldı ve 36 °C’de 48-72 saat enkübe edildikten sonra kültür içerisinde 5-6 damla metil red ayıracından damlatıldı. Rengin kırmızı olması testi olumlu, turuncu ve sarı renkler ise olumsuz olarak değerlendirildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.3. Sitrat Testi

Sitrat tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğindeki bakterilerin belirlenmesinde kullanılan bir besiyerdir. Bir gecelik kültürlerden iğne öze yardımıyla alınan bakteriler batırma kültürü ile sitrat besiyerine ekimleri yapıldı ve 36 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyeri renginin maviye dönüşmesi pozitif sonuç, değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.4. İki Şeker (Kligler İron) Testi

Bakterilerin glikoz laktoz ve sükroz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını araştırma temeline dayanır. Bir gecelik kültürlerden iğne öze yardımıyla alınan bakteriler, batırma ve yüzeye yayma tekniğiyle KIA besiyerine ekimleri yapıldı. Glikozu fermente edip laktoz ve sükrozu parçalayamayan bakteriler, dipte sarı yatıkta kırmızı renk oluştururlar. Laktozu, sükrozu ya da her ikisini fermente edebilen bakteriler hem dipte hem de yatıkta sarı renk oluştururlar. Fermantasyon esnasında gaz oluşumu varsa besiyerinin içinde gaz kabarcıklarının oluşmasına ya da besiyerinin parçalanmasına sebep olur. Besiyerinin dip kısmının siyahlanması ise bakterinin H₂S oluşturabilme yeteneğini göstermektedir (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.5. Nitrat Deneyi

Bakterinin nitratı redükleyip nitrit ve daha ileri ürünlerinin ortaya çıkmasını sağlar. Saf kültür halinde bulunan bakteriden öze yardımıyla ekim yapıldı ve 36 °C’de

24-48 saat enkübe edildi. Bu süre sonunda kültürlerle sırası ile önce A sonra B ayırıcından birer mililitre eklendi, 30 saniye içerisinde kırmızı bir renk oluşması nitritin varlığını yani bakterilerin nitratları redükte etmiş olduğunu gösterdi. Bu süre içinde renk değişimi olmayan tüplere ise çinko tozu ilave edildi ve 30 saniye içerisinde kırmızı renk oluşumu, besiyerindeki nitratların bakteriler tarafından redükte edilmemiş olduğu, eklenen çinko tarafından redükte edilmiş olduğu anlaşıldı ve nitrat olumsuz olarak değerlendirildi. Renk oluşmaması ise bakterinin nitratı nitrite, nitriti ise azot gazına kadar indirgediğini, dolayısıyla bu durumdada test olumlu olarak değerlendirildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.6. Üreaz Testi

Mikroorganizmaların üreaz enzimi vasıtasıyla, üreyi parçalayıp, parçalamadığının tespit amacıyla fenol kırmızısı (fenolfitalin) ihtiva eden üre besiyerinde test edilir. Bir gecelik kültürlerden öze yardımıyla bakteri, üre besiyerine ekim yapıldı ve 36 °C’de 24-48 saat enkübe edildi. Üre parçalandıkça oluşan amonyak alkali bir ortam yaratır ve neticede fenol kırmızısı koyu pembeye dönüşür. Bu sonuç üreaz için pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan vd., 2004; Coneman vd., 1997).

2.3.9.7. Amilaz testi

Nişasta hidrolizi aktivitesi ölçülecek mikroorganizmalar nişastalı agar üzerine çizgi yöntemiyle yoğun ekimler yapıldı ve 36 °C’de 2-5 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda bakteri alfa-amilase enzimi üretiyorsa koloninin etrafındaki alanda nişastayı hidroliz eder ve üzerine lugol solusyonu ilave edildiğinde koloni etrafında renksiz bir halka oluşur. Bu durum pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Negatif durumlarda ise besi yeri mavi renkte görülür. Koloni etrafındaki oluşan pembe-esmer bölge ise zayıf olarak değerlendirildi. Reaksiyon 5 dakika içinde okundu (Aygan, 2008).

2.3.9.8. Lestiaz Testi

Bir gecelik taze bakteri kültürlerinden yoğun çizgi ekim tekniğiyle Lestiaz agar plaklarına ekimleri yapıldı ve 36 °C’de 2-5 gün inkübe edildi. Bu test, yumurta sarısında

bulunan lipoprotein komplekslerinin, bakteriler tarafından oluşturulan lesitinaz ve fosfolipaz enzimleri ile hidrolize edilebilme durumunu belirler. Koloniler etrafında lesitin hidrolizasyonu sonucu oluşan açılmalar ve opaklaşmalar pozitif olarak değerlendirildi.

2.3.9.10. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların, protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilen jelatini, hidroliz eden jelatinaz salgılamasının belirlenmesinde kullanılır. Bir gecelik taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla jelatin besiyerine ekimleri yapıldıktan sonra tüpler 36 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabı sıcaklığında 1-2 saat bırakıldı. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde kalması pozitifliği, katılaşmış olması negatifliği gösterdi (Bilgehan vd. 2004; Coneman 1997).

2.3.9.11. Siderofor Testi

Bakterilerin siderofor proteinlerini üretilip üretmediklerinin test edilmesi için kullanıldı. Bu amaçla bir gecelik taze bakteri kültürlerinden McFarland 0,5 bulanıklılıkta solüsyon hazırlandı. Bu solüsyondan 5 µl alınarak siderofor besiyerlerine nokta ekim yapıldı. Plaklar 36 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Araştırılan suşların kolonileri etrafında sarı renkte halelerin görülmesi siderofor üretimi yönünden pozitif, herhangi bir renk değişiminin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Alexander ve Zuberer, 1991).

2.3.9.12. Fosfat Çözünürlüğü Testi

Bakterilerin fosfatı çüzebilme yeteneklerinin varlığını belirlemek amacıyla sıvı ve katı fosfat besiyerleri hazırlandı. Bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla fosfat agar besiyerine yoğun çizgi ekimleri yapıldı ve plaklar 36 °C'de 2-7 gün inkübe edildi. Üreme ve kültür etrafında sarı renk veya şeffaf zon oluşumu fosfat çözünürlüğü pozitif olarak değerlendirildi. Üreme olmayışı, az üremesi ve renk değişiminin olmaması testin

negatif olduğunu gösterdi. Testin tekrarı olarak sıvı besiyerinde yapıldı. Her iki ortamda olumlu sonuç alınan bakterilerde test pozitif olarak değerlendirildi (Furnkranz vd., 2009).

2.3.9.13. Amonyum Üretimi Testi

Bakterilerin amonyum üretimini kolorimetrik yöntemle ölçmek amacıyla amonyum sıvı besiyeri kullanıldı. Bir gecelik bakteri kültürlerinden hazırlanan McFarland 0,5 bulanıklılıktaki kültürlerden 30 µl ekilerek 36 °C’de 4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda her bir örneğe taze hazırlanmış Nessler ayırıcından 0,5 mL ilave edilerek 2-5 dk. beklendi. Amonyum üretimi açık sarıdan kırmızıya doğru artan renk değişimi ile pozitiflik belirlendi (Aydoğan vd., 2013; Bakker, 1987).

2.3.9.14. 1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat (ACC Deaminaz) Testi

Bakterilerin ACC deaminaz üretme yeteneklerinin belirlenmesi için bakteri kültürlerinden öze yardımıyla ACC deaminaz besiyerine yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Kültürle 2-7 gün 36 °C’de inkübasyonu sonucunda bakterilerin üremesi testin pozitif, ürememesi ise negatif olarak değerlendirildi (Dworken ve Foster, 1958).

2.3.9.15. İndol Asetik Asit (IAA) Testi

Bu test izole edilen suşların, bitki gelişimi için önemli bir etken olan indol asetik asit hormonunu üretip üretmediğini test etmek için yapıldı. Hazırlanan DF Salt Medium 5 mL olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve üzerine 20 µL bakteri inokülasyonu yapıldı. Daha sonra üzerine L-triptofanın farklı konsantrasyonları (0, 50, 100, 200 ve 500 µg/mL) ilave edildi. 37 °C’de 48 saat inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek süpernatant kısımları alındı. Spektrum plaklarına 1 mL süpernatant konup üzerine 4 mL salkowski reagent ilave edilip karıştırıldı. 37 °C’de 20-30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra spektrofotometrede 535 nm’de ölçümleri yapıldı.

2.3.10. Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi

2.3.10.1. Bakterilerin AgNO₃ Toleransı

Bakterilerin AgNO₃'ın farklı konsantrasyonlarında katı agar ortamında üreme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla alınan bakteriler 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L AgNO₃ içeren besiyerlerinin her birinin replika yöntemiyle yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Plaklar 36 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten sonra oda ısısında 2 ay saklandı. Plaklarda üreme olanlar belirlendi bekleme süresince oluşan renk değişimleri ve berraklaşma zon çapları kaydedildi.

2.3.10.2. Bakterilerin CuSO₄ Toleransı

Bakterilerin CuSO₄'ın farklı konsantrasyonlarında katı agar ortamında üreme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla alınan bakteriler 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L CuSO₄ içeren besiyerlerinin her birine replika yöntemiyle yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Plaklar 36 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten sonra oda ısısında 2 ay saklandı. Plaklarda üreme olanlar belirlendi, bekleme süresince oluşan renk değişimleri ve berraklaşma zon çapları kaydedildi. Bahvin V-Vis spektro'da absorbansı ölçülebildiği, [Cu(H₂O)₆]²⁺ nin UV-Visible alınırken renge göre dalga boyları ölçülmektedir. Kırmızı renk 630-700, portakal rengi 590-630, mor 400-450 nm dalga boyunda absorbans oluşturmaktadır. Bakır sülfat turkuaz rengi olup portakal rengi ışığında absorbans vermektedir. Zira portakal ve turkuaz renkleri birbirini tamamlayan renklerdir. [Cu(H₂O)₆]⁺² portakal rengi bölgesinde (590-630nm) [Cu(NH₃)₄ (H₂O)₂]⁺² ise sarı bölgede (560-590 nm) absorbans vermektedir.

2.3.10.3. Bakterilerin Pb(NO₃)₂ Toleransı

Bakterilerin Pb(NO₃)₂'ın farklı konsantrasyonlarında katı agar ortamında üreme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla alınan bakteriler 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L Pb(NO₃)₂ içeren besiyerlerinin her birinin replika yöntemiyle yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Plaklar 36 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten

sonra oda ısısında 2 ay saklandı. Plaklarda üreme olanlar kaydedildi, bekleme süresince oluşan renk değişimleri ve berraklaşma zon çapları belirlendi.

2.3.10.4. Bakterilerin ZnCl₂ Toleransı

Bakterilerin ZnCl₂'ın farklı konsantrasyonlarında katı agar ortamında üreme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla alınan bakteriler 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L ZnCl₂ içeren besiyerlerinin her birinen replika yöntemiyle yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Plaklar 36 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten sonra oda ısısında 2 ay saklandı. Plaklarda üreme olanlar kaydedildi, bekleme süresince oluşan renk değişimleri ve berraklaşma zon çapları belirlendi.

2.3.10.5. Bakterilerin FeCl₃.6H₂O Toleransı

Bakterilerin FeCl₃'ın farklı konsantrasyonlarında katı agar ortamında üreme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla bir gecelik taze kültürlerden öze yardımıyla alınan bakteriler 1, 2,5, 5 ve 10 mM/L FeCl₃ içeren besiyerlerinin her birinen replika yöntemiyle yoğun çizgi ekimleri yapıldı. Plaklar 36 °C'de 2-5 gün inkübe edildikten sonra oda ısısında 2 ay saklandı. Plaklarda üreme olanlar kaydedildi, bekleme süresince oluşan renk değişimleri ve berraklaşma zon çapları belirlendi.

2.3.11. Bakterilerde Bakır Minimum İnhibisyon (MIC) ve Minimum Bakterisit (MBC) Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Bakır metalinin bakteri gelişimini engelleyen dozunun belirlenmesi için minimum inhibisyon (MIC) testi yapıldı. Bu amaçla önce agar kuyucuk metodu kullanılarak etkinliğin varlığı belirlendi. MHA besiyerine bir gecelik kültürlerden McFarland 0.5 bulanıklıkta bakteriler eküviyon çubuğuyla yayma ekim yapıldı ve cam boru yardımıyla 0.6 mm kuyucuklar açıldı. Bu kuyucuklara 100 mM bakırın ½ seri dilüsyonlarından 100 µL'si damlatıldı. Kültürler 36 °C'de 24-48 saat sonra inkübe edildikten sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü.

Bakırın MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi için agar kuyucuk metodunda olduğu gibi bakteri kültürler hazırlandı. Mikrodilüsyon tekniğiyle, MHB besi ortamında eliza plakalarında 100 mM bakırın ½ seri dilüsyonları yapıldı. Üzerine bakteri kültürlerinden 20 µL ilave edildi ve 36 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. Üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki bakır miktarı MIC olarak belirlendi.

Bakırın bakteriyi öldüren dozunun (MBC) belirlenmesi için, MIC testinde üremenin olmadığı kuyucuklardaki besiyerinin tümü (100 µL) steril pipetle alındı ve MHA besiyerine yayma ekimleri yapıldı. Plaklar 24-48 saat 36 °C’de inkübe edildikten sonra üremenin olmadığı kuyucukların dilüsyonları MBC değeri olarak belirlendi. Testler üç tekrarlı yapıldı.

2.3.12. Bakterilerin Farklı Ortamlarda (Cu’lu ve Cu’suz MHB ile BHI Besiyerinde) Üreme Eğrileri

Bakterilerin Cu varlığında ve yokluğunda farklı pH aralıklarında ve iki farklı besi ortamında üreme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla BHI ve MH sıvı besiyerleri kullanıldı. BHI agarda 3 mM Cu içeren ortama adapte olmuş kültürlerden tek koloni alınarak Cu içeren MHB ve BHIB besiyerine pasaj yapıldı ve 1 gece 36 °C’de kültürleri yapıldı. Bu kültürlerden steril distile suya McFarland 0,5 bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı.

Steril dansitometre plağına 200 mL 3 mM Cu içeren farklı pH’larda (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5) BHIB ve MHB besiyerleri dağıtıldı. Kontrol için Cu içermeyen farklı pH’larda BHI ve MHB besiyerleri de dağıtıldıktan sonra 1 damla (20 µL) hazırlanan kültürden ilave edildi. Negatif kontrol kuyucuklarına bakteri ilave edilmedi. Her deneme 3 tekrarlı yapıldı. Kültürler Dansitometre cihazına yerleştirilerek 48 saat 36 °C’de her 30 dk.’da ölçüm alacak şekilde programlanarak inkübasyona bırakıldı. Spektrumlar 400-600 nm dalga boyunda her yarım saatte ölçülerek bilgisayara kaydedildi ve Excel programında grafikleri oluşturuldu.

2.3.13. Bakır Spektrofotometrik Yöntemlerle Belirlenmesi

Bakterilerin bakırı absorpsiyonunu belirlemek amacıyla yapıldı. Bakırın sulu ortamlarda (distile su, BHI ve MHB besiyerleri) spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi amacıyla 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 mM'lık solüsyonları taze hazırlandı. Her bir solüsyondan 100 µL miktarında düz tabanlı eliza plakalarına dağıtılarak 350-800 nm dalga boyunda spektrumları alındı. Bu spektrumlarla bakır standart eğri grafiği oluşturuldu. Aynı ortamların bakteri ekilmeksizin 36 °C'de 1-7 gün inkübe edildikten sonra her bir örnekten 1.5 mL numune alındı ve 13 000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek besiyerinin bakırı zamana göre absorbans (bağlama/indirgeme kapasitesi) özelliği 350-800 nm dalga boyunda spektrumları alınarak araştırıldı ve grafikleri Ekzel'de çizildi (Tunalı vd., 2006)

Bakırın farklı (1, 2 ve 3 mM) konsantrasyonlarındaen iyi üreme gösteren bakterilerden biri seçildi ve bakteri varlığında sıvı ortamda bakır absorpsiyonu ölçülmesi planlandı. Bu amaçla 3 mM bakır içeren ve farklı pH'lara ayarlanan BHIB hazırlandı. 250 mL'lik erlenmayerlerde 100 mL dağıtıldı ve bir gecelik kültürlerden 3 mL ekim yapılarak 150 rpm'de 14 gün 36 °C'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Kültürlerden her gün 2 mL örnekler alınarak 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlarısteril ependorflara aktarılarak spektrofotometrik ölçümleri alınacağı süreye kadar -20 °C'de bekletildi. Tüm örnekler tamamlanınca 100 mL olarak düz tabanlıeliza plakalarına 3 tekrarlı dağıtılarak 350-800 mm dalga boyunda spektrumları alındı. Veriler excele aktarılarak grafikleri elde edildi.

2.3.14. İzolatların Moleküler Tanımlanması

2.3.14.1. Genomik DNA İzolasyonu:

İzolatların16-24 saatlik gece kültürleri distile su içerisinde toplandı ve her bir izolat ependorf tüpe aktarılarak aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı (Sambrook, 1989).

Gece kültürleri 13.000 rpm'de 3-4 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü. Pelletlerin üzerine 500 µl tris-ETTA (TE) tamponu eklenerek (10 mM Tris, pH 8.0 mM EDTA pH

8.0) çözüldü. Her bir tüpe 50 µl lizozim enzimi konularak vortekslendi. Tüpler 37 °C'de 1 saat bekletildi. Her bir tüpe 50 µl % 10'luk SDS eklenerek 5-6 defa alt üst edildi ve 37 °C'de 30 dk. bekletildi. Sonra her tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (Na-Ac pH 5.2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dk. beklenerek her 10 dk.'da bir alt üst edildi. Her tüpe 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek, vortekslendi ve 5 dk. 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Tüplerin üstündeki sıvı kısım steril ependorf tüplerine aktarıldı. Tüplere tekrar 500 µl kloroform ilave edildi ve tüpler alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi ve üstte olan sıvı kısım steril tüplere alındı. Tüplere yeniden 500 µl kloroform ilave edildi. Tüpler alt üst edilerek 13000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Böylece bu işlem üç defa tekrar edildi. Bu tüplere 1/10 hacimde sodyum asetat ve 2 hacim (yaklaşık 900 µl) % 96'lık soğuk EtOH (etil alkol) ilave edilerek -20 °C'de 45 dk. beklendi. Daha sonra tüpler 13000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı. Kalan pelletlerin üzerine 500 µl % 70'lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Pelletler 37 °C'de kurutulduktan sonra 75 µl TE içerisinde çözüldü.

2.3.14.2. Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi

Genomik DNA yürütülmesi işlemi için % 8'lik agaroz mikrodalga fırınında çözüldü. Jel tankının parçaları birleştirilerek eriyik jelin döküleceği yer hazırlandı ve kuyucukların oluşması için jel tarağı takıldı. Eriyik jel fırınından çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulunca içerisine 0,5 µL etidyum bromür (0,5 µg/mL) konuldu ve homojen şekilde çözüldü. Soğuyan eriyik jel, jel kalıbına döküldü ve 15-20 dakika katılaşması için bekletildi. Agaroz jel katılaştıktan sonra jel tarağı dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra agaroz jel elektroforez tankının içerisine düzgünce yerleştirildi ve jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi. Her bir izolatın DNA solüsyonundan 7 µL alındı ve 3 µl 10X yürütme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 100 V'luk elektrik alanda 25 dk. yürütüldü. Yürütme sonucunda izolatlardan elde edilen genomik DNA'lar UV ışığı altında görüntülendi. İzolatların DNA bantları agaroz jel üzerinde görüldükten sonra DNA solüsyonları üzerine 3 µL RNA az ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.3.14.3. 16S rRNA Geninin PCR ile Arttırılması

16S rRNA genleri her bir izolattan elde edilen genomik DNA'dan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ileri ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğatıldı. Primerler MACROGEN (Hollanda) firmasından elde edildi. PCR reaksiyon şartları; 12 ng kalıp DNA, 5 ul 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1U *Tag* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP olacak şekilde hazırlandı ve bu karışımı steril saf su ile 50 µL'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µL'lik tüplerde ve Thermocycler (Eppendorf)'de gerçekleştirildi.

Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri sırasıyla; 5 dk. 94 °C'de, 45 sn. 94 °C'de, 1 dk. 50 °C'de, 1:30 dk. 72 °C'de ve 45 sn. 35 döngü 94 °C'de, 1:30 sn. 72 °C'de ve 4 °C sonrada bekleme şeklinde düzenlendi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µL'si % 1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/mL) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntüledi. Elde edilen PCR ürünleri sekans edilmek üzere MACROGEN (Hollanda) firmasına gönderildi. Sekanslama işleminde ise 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primerleri kullanıldı (MACROGEN).

2.3.14.4. Veri Analizi

Elde edilen bütün 16S rRNA dizileri BioEdit (Hall, 1999, version 7,09) programı ile düzenlendi ve NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak GenBank'ta yer alan diğer 16S rRNA dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. 16S rRNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak Clustal W programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA (Tamura vd., 2011, version 5) filogenetik programı yardımıyla neighbor-joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 5,0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

2.3.15. Mısır Tohumlarının Cu ve Bakteri Varlığında Çimlenme Deneyi

Çalışmada mısır tohumlarının bakteri ve Cu varlığında çimlenme başarısı ölçülmesi amaçlandı. Bu amaçla mısırlar 10'arlı 3 grup şeklinde (İlk grup: 22-23 g, İkinci grup: 24-25 g, Üçüncü grup: 26-27 g) tartıldı ve erlene alındı. Her bir grup boyası gidene kadarmusluk suyunda (2-3 kez) yıkandı. Etanolde (% 70 lik) 3 dk. bekletildikten sonra % 3'lük çamaşır suyunda 3 dk. daha bekletildi ve steril distile su ile hudun içinde çamaşır suyu kokusu gidene kadar yıkandı. Mısırlar her bir grup için 10 adet olacak şekilde erlenlere steril şartlarda dağıtıldı.

Mısırların bakteri ile inokülasyonu için seçilen bakterilerin bir gecelik plak kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerden alınarak, 50 mL BHI sıvı besiyerine 1/10 oranında inokülasyon yapıldı. Mavi kapaklı şişelerde yapılan kültürler 30 °C'de 24-48 saat 150 rpm'de inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra bu kültürlerden steril distile suda McFarland 2 bulanıklıkta solusyon hazırlandı.

Bakteri uygulanacak mısır tohumları içeren erlene MacFarland 2 sulandırımı bakteri solusyonundan önce 5 mL, daha sonra % 10'luk steril gumarabikten 5 mL ilave edildi. Gumarabik tohuma bakterinin yapışmasını sağlamak amacıyla kullanıldı. Kontrol grubuna aynı miktarda su ilave edildi. Tüm deney grupları 30 °C'de, 150 rpm'de 2 saat çalkalamada bekletildi.

Bakteri ile yeterince muamele edilen mısır tohumları çalkalamadan alındı. Önceden hazırlanan ve otoklavda steril edilen petri kaplarına 10'ar adet olacak şekilde yerleştirildi. Petri kaplarında mısırın nemini koruyabilmek için petri iç ölçülerine göre kesilmiş filtre kağıtları bulunmaktaydı. Bu şekilde otoklavda steril edildiler ve mısır tohumları iki filtre kağıdının arasında olacak şekilde yerleştirildiler. Deney ve kontrol gruplarına aşağıda verildiği şekilde işlemler uygulandı.

Kontrol grubları;

1. Mısır kontrol (bakırsız ve bakterisiz); Üç adet petri de 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril 10 ml distile su ilave edildi.

2. Mısır + Cu kontrol (bakterisiz); Üç adet petri de 10'ar tane mısır yerleştirildi ve üzerine 10 mL 1.5 mM Cu'ın sudaki solüsyonu ilave edildi.

3. Mısır + bakteri kontrol (bakırsız); Üç adet petri de 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril distile sudan 10 mL ilave edildi.

Deney grubu;

Mısır + Bakteri +1.5 mM Cu; Üç adet petri de 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril distile suda hazırlanan 1.5 mM Cu solüsyonundan 10 mL ilave edildi.

Tüm plaklar iklim dolabına tek sıra halinde yerleştirilerek 16 saat gündüz 8 saat gece olacak şekilde 26 °C'de ve % 70 nem ortamında 1 hafta boyunca inkübe edildi. Tohumların 3., 5. ve 7. günlerinde çimlenme başarısını belirlemek amacıyla, inkübatörden çıkarılıp güvenlik kabinetinde steril şartlarda çimlenenleri sayıldı. Tüm örnekler 7. günün sonunda ölçümler için sonlandırıldı. Ölçümlerde her bir tohumun ana kök uzunluğu, saçak kök sayısı, kökün yaş ve kuru ağırlığı, gövde boyu, gövde yaş ve kuru ağırlığı, tohum kısmının yaş ve kuru ağırlıkları belirlendi. Kuru ağırlığın ölçümü için örnekler 24 saat 65 °C'de bekletildikten sonra tekrardan tartılarak belirlendi.

2.3.16. *Bacillus* sp. 5O5Y11 Suşunun Metal Absorbsiyonun Belirlenmesi

Bakterinin metal absorpsiyonunu Atomik absorpsiyon spektrofotometrede belirlemek amacıyla deney düzeneği hazırlandı. Deney düzeneği şöyle oluşturuldu;

1. Kontrol grup 1; Bakır ve bakteri içermeyen pH 7.0±0,2'ye ayarlanmış BHI sıvı
2. Kontrol grup 2; Bakır (2,5 mM) içeren pH 7.0±0,2'ye ayarlanmış BHI sıvı
3. Deney grup 1; Bakır (2,5 mM) varlığında bakterinin (5O5Y11 suşu) pH 7.0±0,2'ye ayarlanmış BHI sıvı besiyerinde 3 günlük kültürü.
4. Deney grup 2; Bakır yokluğunda bakterinin (5O5Y11 suşu) pH 7.0±0,2'ye ayarlanmış BHI sıvı besiyerinde 3 günlük kültürü.

Bu amaçla *Bacillus* sp. 5O5Y11 suşunun bir gecelik kültüründen 2,5 mM Cu ihtiva eden pH 7.0 ±0,2'ye ayarlanmış 250 mL BHIB besiyerine 2,5 (1:10) mL ekim yapıldı. Kontrol için aynı şartlarda hazırlanmış bakır içermeyen besiyerine, aynı miktarda ekim yapıldı ve 36 °C'de 3 gün 150 rpm'de inkübe edildi. Kültürler 3 gün sonra soğutmalı santrifüjde 10 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü.

Sıvı kısım içinde kalan bakırın miktarını ölçmek için ayrı bir steril falkoma alındı. Bakteri pelleti 3 kez steril distile su ile yıkandı. Elde edilen pellet 65 °C'de 3 gün kurutulduktan sonra 0.3 g tartılarak AVANTA GBC Atomik Absorbsiyon ile bakır analizi için yakma deneyine hazırlanmak üzere stoklandı. Bakırlı ve bakırsız kültürlerin sıvı kısımları ve bakterisiz besiyeri kontrolleri bakır içeriğinin ölçülmesi için kullanıldı.

2.3.17. Yakma Düzenegi

Bacillus sp. 5O5Y11 bakterili ve bakterisiz sıvı besiyerinin (süpernatantın) yakılma işlemi meyve suyundaki yakma metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için her bir sıvı numune örneğinden 5 mL alınarak mikrodalga tüplerine konuldu. Üzerine sırasıyla 5 mL % 65'lik HNO₃ ile 1 mL % 30'luk H₂O₂ konuldu. Bekletilmeden kapaklar kapatılıp mikrodalgaya yakmak üzere konuldu. Meyve suyu yakma programında yakma işleme tabi tutuldu. Yakma işlemi 35 dk. sürdü (Kacar vd., 2009). Daha sonra aletten alınan örnekler steril tek kullanımlık 15 mL'lik satrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler bidistile su ile yıkanıp kalıntı bırakılmadı. AVANTA GBC (Atomik Absorbsiyon) cihazında okuma yapılırken cihazın tıkanmaması için örnekler filtreden (MN640w.Ø125 mm) geçirildi ve bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Bakteri pelletleri kuru bitki yakma metodunda kullanılarak yakılmıştır. Bunun için 300 mg (0,3 g) bakteri hücresi tartıldı, çeker ocak içinde mikrodalga yakma tüplere konuldu. Üzerine sırasıyla 5 mL HNO₃ (% 65) ve 3 mL H₂O₂ (% 30'luk) konuldu. Tüpler 20 dk. belirli aralıklarla sallanarak hücrelerin asitle parçalanması sağlandıktan sonra cihaza yerleştirilip program çalıştırıldı ve yakma işlemi 35 dk. sürdü. Daha sonra aletten alınan örnekler tek kullanımlık 15 mL'lik satrifüj tüplerine aktarıldı. filtre kağıtları yardımıyla partiküller uzaklaştırıldı ve bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı. Analiz esnasına kadar oda ısısında bekletildi.

2.3.18. Saksı Deneyi

Saksı deneyi için, 10 adet mısır tohumu tartılarak tane ağırlığı belirlendi ve 24-26 gr ağırlığındaki tohumlar seçildikten sonra yıkandı, çimlendirme deneyindeki gibi steril edildi ve 28 °C'de 2 gün petri kaplarında çimlendirildi. Deneyde kullanılacak saksılar

çamaşır suyunda 1 saat bekletilip, steril distile suda yıkandıktan sonra kullanıldı. Saksılara doldurulacak toprak, ticari firmadan temin edildi. Toprak birgün önceden 1 saat 121 °C'de 1.1 atmosfer basınçta otoklav edildi. Saksılara steril şartlarda (500 g) dolduruldu, üzerine 5 adet çimlenmiş tohum yerleştirildi. Her deney düzeneği için toplam üç adet saksı hazırlandı. Üzeri aynı toprakla (250 g) kaplandı ve 50 mL can suyu (distile su) verildi. Saksılar 23 °C'de % 70 nem içinde iklim dolabına yerleştirildi ve her gün 50 mL distile su ile sulandı. Deney düzeneği aşağıdaki gibi yapıldı.

Kontrol grubları;

1. Kontrol (bakırsız ve bakterisiz); 3 adet saksı : 3×5= 15 fide
2. Bakteri (bakırsız); 3 adet saksı : 3×5= 15 fide
3. 50 mg Cu (bakterisiz); 3 adet saksı : 3×5= 15 fide
4. 100 mg Cu (bakterisiz); 3 adet saksı : 3×5= 15 fide

Deney grubu;

1. Bakteri+50 mg Cu; 3 adet saksı : 3×5= 15 fide
2. Bakteri +100 mg Cu; 3 adet saksı : 3×5= 15 fide

2.3.19. Saksı Toprağına Bakteri Metal Uygulaması

Deney için bir dizi ön denemelerle belirlenen *Bacillus* sp. 505Y11 suşu kullanıldı. Bu amaçla MHA besiyerinde 36 °C'de bir gece kültürü yapıldı, 5 mL MHB içine McFarland 1 olacak şekilde süspansiyonu hazırlandı. Steril 250 mL MHB besiyerine hazırlanan bakteri süspansiyonundan 1/10 oranında (yani 2,5 mL) ekim yapıldı. Kültür 36 °C'de 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra steril 50 mL'lik falkom tüpleri yardımıyla 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüjde çöktürüldü ve 2 kez steril distile suda yıkandı. Pelletlersteril distile suda yeniden süspansiyon edildi ve 600 nm dalga boyunda OD_{0,515} adsorbans olacak şekilde (yaklaşık bakteri miktarı 7.4×10⁸ cfu/mL) sulandırımı ayarlandı.

Bakteri uygulaması saksılardaki mısırların gelişmesinin 8.gününde, bitkiler 2 yaprak halindeyken yapıldı. Bakteriler sadece bakteri kontrol grubu ve deney (Bakteri-50 mg Cu ile Bakteri-100 mg Cu) gruplarına uygulandı. Saksı başına ayarlanan bakteri

süspansiyonundan 15 mL alınıp 35 mL steril distile su ile tamamlanarak her bir fidanın kök dibine eşit miktarlarda homojen olacak şekilde döküldü. Kültürlerin toprağa adaptasyonu saksılar için 1 hafta daha aynı şartlarda iklim dolabında bekletildi. Saksılara bakteri süspansiyonu konup 50 mL distile suya tamamlandı (15 mL bakteri +35 mL dH₂O).

Mısır bitkilerine metal uygulaması 15. günde yapıldı. Bu amaçla distile suda 50 ve 100 mg/L bakır solüsyonu hazırlandı ve steril edildi. Mısır bitkisinin kök diplerine homojen olacak şekilde döküldü. Bitkiler her gün 100 mL steril distile su ile sulanarak 10 gün daha büyütüldükten sonra sonlandırıldı (Jinanag vd., 2008; Albarracin vd., 2010; Ramakrishna vd., 2011). Deneyin her aşamasında fotoğrafları çekilerek görsel farklılıklar kayıt altına alındı.

Bitkiler sonlandırıldığında saksılardan her birinden toprakta var olan metalin belirlenebilmesi için steril falkom tüplerine toprak örnekleri alındı. Daha sonra akan musluk suyu yardımıyla kökleri topraktan ayrıldı. Her bir bitkinin yaprak sayısı, yaprakların uzunlukları, gövde uzunlukları, ana kök uzunluğu ve saçak kök sayıları tet tek sayıldı ve ölçüldü. Kökleri ayrılarak kök ve gövde kısımlarının tek tek yaş ağırlıkları tartı yardımıyla belirlendi. Örneklerin yaprak kısımları ve kök kısımları 65 °C'de 24 saat bekletildikten sonra tartılarak kuru ağırlıkları hesaplandı. Tüm veriler SPSS programına aktarıldı.

2.3.20. Cu Analizi İçin Mısır Yakma Düzeneği

Mısır kök ve gövdesindeki bakır içeriğinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Mısır kök ve gövdelerin yakılmasında sıvı metod olan bitki yakma programı kullanıldı (Tablo 4). Bunun için 300 mg (0,3 g) toz haline getirilmiş bitki kök ve gövde kuru tartıldı, çeker ocak içinde mikrodalga yakma tüplerine konuldu. Üzerine sırasıyla 5 mL HNO₃ (% 65) ve 3 mL H₂O₂ (% 30'luk) konuldu. Tüpler 20 dk. belirli aralıklarla sallanarak hücrelerin asitle parçalanması sağlandıktan sonra cihaza yerleştirilip program çalıştırıldı, yakma işlemi 35 dk. sürdü. Daha sonra aletten alınan örnekler tek kullanımlık 15 mL'lik satrifüj tüplerine aktarıldı. Filtre (Vatman MN 640w Q125 mm) kağıtları kullanılarak filtreden geçirildi ve bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tablo 4. Metal analizi için numunelerin mikrodalga fırında (Microwave Digestion) yakma programları

	Besiyeri		Bakterive Bitki		Toprak
	Programı		Programında		Programı
Step	1	2	1	2	1
T(°C)	170	200	145	190	100
P(bar)	40	40	50	50	30
Power	80	90	70	90	70
Ta(min)	5	1	10	5	5
Time(min)	10	15	5	10	5

Toprak için 1 (g±1 mg) toprak tartılıp tüplere konuldu. Üzerine 2,35 mL HNO₃ (% 65) ve 7 mL HCl (% 37) konuldu. Hafifçe karıştırılıp 2 dk. beklendikten sonra cihaza yerleştirildi, program çalıştırıldı ve işlem 35 dk sürdürüldü. Daha sonra aletten alınan örnekler tek kullanımlık 15 mL'lik satrifüj tüplerine aktarıldı. Filtre kağıtları (MN 640 w Q 125 mn) kullanılarak iki kez filtreden geçirildi ve bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3. BULGULAR

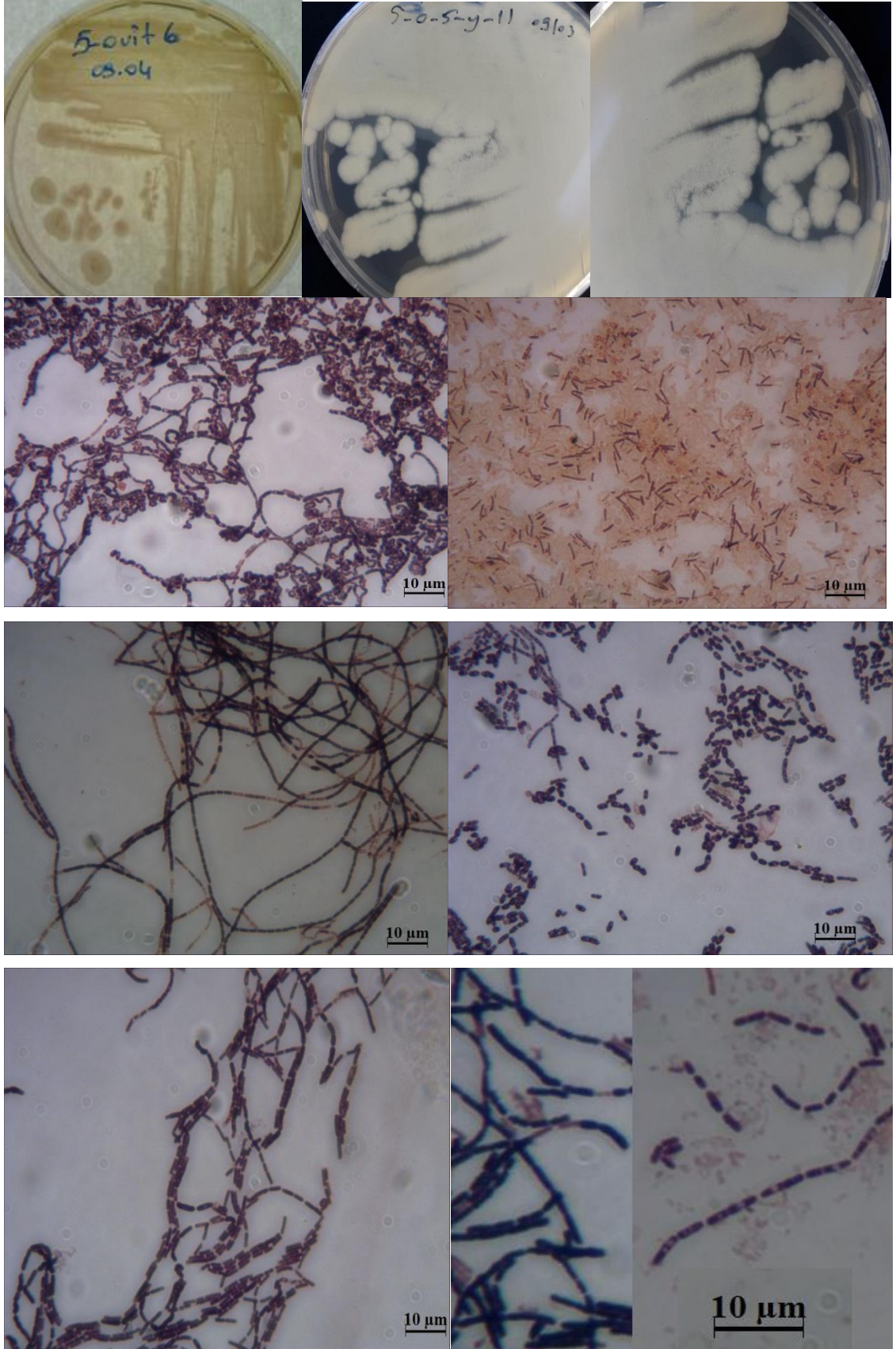
Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında Ekim 2012 – Mayıs 2015 tarihleri arasında yapılmıştır. Örnekler, Ovit dağından alınan 4 adet orkide toprak nümunesinden izole edilen 20 adet bakteri çalışma materyalini oluşturmaktadır (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışmada kullanılan izolatlar ve numaraları.

Sıra No	Suş Adı:	Suş Kodu	Sıra no	Suş Adı	Suş Kodu
1	5 Ovit 7	5O7	11	5-ovit-1	5O1
2	5 Ovit 8	5O8	12	5 Ovit 5 Yumru 10	5O5Y10
3	1,1 2 Ovit 1	112O1	13	5 Ovit 5 Yumru 11	5O5Y11
4	5 Ovit 6	5O6	14	1 4 2	142
5	1 4 12	1412	15	5 Ovit 5 Yumru 2	5O5Y2
6	5 Ovit 11	5O11	16	1 4 4	144
7	1 4 6	146	17	5 Ovit 5 Yumru 1	5O5Y1
8	5Ovit5Yumru12	5O5Y12	18	5 Ovit 9	5O9
9	1,1 2 Ovit 3	112O3	19	5 Ovit 3	5O3
10	1 4 1	141	20	5 Ovit 5 Yumru 13	5O5Y13

3.1. Bakterilerin Geleneksel Yöntemlere Göre Tanımlanması

Çalışmada orkide kök topraklarından MHA besiyerinde üreyen koloniler gram boyama yapılarak Gram pozitif sporlu basiller seçildi ve saf kültürleri elde edildi. Saflaştırılmış kültürler öncelikle % 20 gliserollü MHB besiyerinde -20 °C’de stokları yapıldı. Kültürlerin katı besiyerinde oluşturdukları kolonileri, morfolojik görünümüleri, Gram boyamada mikroskopik görünümüleri ve bir dizi biyokimyasal özellikleri incelenerek geleneksel yöntemlerle tür tanımlarının belirlendi (Şekil 1). İzolatların tür tanımlarında, makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile biyokimyasal test sonuçları, kaynak verilerle karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 1. Bazı izolatların makroskobik (506 ve 505Y11) ve mikroskobik görünüşleri ile sporları. Soldan sağa sırasıyla;142, 146, 505Y1, 505Y10, 505Y8 ve 505Y11 nolu suşlar.

Bakterilerin çoğunluğunda oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif olduğu, bazılarında zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği, büyük çoğunluğunun R tipi kolonili ve hücredeki spor yerleşimi çoğunlukla subterminal oldukları gözlemlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Mikroorganizmaların makroskopik, mikroskopik ve bazı biyokimyasal özellikleri.

Sayı	Suş No	Koloni Tipi	Sol.	Oks.	Kat.	Har.	Gr	Spor Konumu
1	507	R	FA	-	+	-	+	Subterminal
2	508	R	FA	-	+	-	+	Subterminal
3	11201	S	FA	-	+	-	+	Santral
4	506	R	AE	+	+	-	+	Santral
5	1412	R	FA	+	+	-	+	Subterminal
6	5011	R	AE	-/+	+	-	+	Subterminal
7	146	R	A	-	+	-	+	Subterminal
8	505Y12	R	A	+	+	-	+	Subterminal
9	11203	R	FA	+	+	-	+	Subterminal
10	141	R	AE	+	+	-	+	Subterminal
11	501	R	AE	+	+	-	+	Santral
12	505Y10	R	FA	-	+	-	+	Santral
13	505Y11	R	FA	-/+	+	-	+	Santral
14	142	R	AE	+	+	-	+	Santral
15	505Y2	S	AE	+	+	-	+	Subterminal
16	144	R	FA	+	+	-	+	Subterminal
17	505Y1	R	FA	+	+	-	+	Subterminal
18	509	R	FA	-	+	-	+	Santral
19	503	R	FA	-	+	-	+	Subterminal
20	505Y13	R	FA	-/+	+	-	+	Santral

Sol.; solunum, Oks.; Oksidaz, Kat.; Katalaz, Har.; Hareket, S: Düzgün, R; pürüklü koloni, A; Aerobik, AE; Anaerobik tercihli, F; Fakültatif anaerobik, Gr.; Gram boyanma *; eski kültürleri Gram negatif.

Çalışmada izole edilen bakterilerin tanımlanmasında standart kaynaklarda belirtilen bir dizi biyokimyasal (indol, metilkırmızısı, sitrat, nitrat/nitrit vb.) özellikler test edildi (Tablo 7). Suşların 3'ünde amilaz aktivitesi, 11'inde nitrat ve güçlü lesitinaz aktivitesi ve 12'sinde jelatin hidroliz özellikleri belirlendi.

Tablo 7. Mikroorganizmaların bazı biyokimyasal aktivite test sonuçları.

Suş No	IMVIC Testi			KIA Testi			Nit	Amilaz	Üre	Lest	Jel	
	İn	MR	Cit	D/Y	H ₂ S	G						
1	507	+	+	-	A/AI	-	-	-	-	4+	+	
2	508	-	-/-	-	AI/AI	-	-	-	-	-	-	
3	112O1	-	+	-	AI/AI	-	-	+	-	-	-	
4	506	-	+	-	AI/AI	-	-	+	2,8/3,4	4+	+	
5	14-12	-	+	-	AI/AI	-	-	+	-	TE	+	
6	5011	-	-/-	-	AI/AI	-	-	-	-	-	-	
7	146	-	-	±	AI/AI	-	-	-	-	±	TE	+
8	505Y12	-	+	±	A/A	-	-	-	-	-	TE	+
9	112O3	-	-	±	A/A	-	-	+	-	++	TE	+
10	141	-	+	-	A/A	-	-	+	-	-	4+	-
11	501	-	+	-	A/A	-	-	-	-	-	4+	-
12	505Y10	-	-	++	A/A	-	-	+	-	-	TE	+
13	505Y11	-	+	-	A/A	-	-	+	-	-	4+	+
14	142	-	+	-	A/A	-	-	+	-	++	4+	-
15	505Y2	-	-	±	A/A	-	-	-	-	±	TE	+
16	144	+	+	-	AI/AI	+	-	+	1,8/2,8	-	4+	-
17	505Y1	+	+	-	A/A	-	-	-	-	-	4+	+
18	509	-	+	-	AI/AI	-	-	+	-	-	4+	-
19	503	-	+	-	A/A	-	-	-	-	-	4+	+
20	505Y13	-	+	-	A/A	-	-	+	2,9/3,4	-	4+	+

İn; İndol, MR; Metilred, Cit; Sitrata, KIA: Üç şeker, D: Dip, Y; Yüzey, G; Gaz, Nit; Nitrat, Lest: Lesitinaz, Jel; Jelatinaz, TE; Test edilmedi, -/-; Besi ortamında üremiyor, -; üreme var ancak test sonucu olumsuz, ±; zayıf pozitiflik, +; Sonuç olumlu, 4+; Sonuç çok iyi.

Çalışmada izolatların bazı fiziksel özellikleri (farklı sıcaklıkta, tuz varlığında ve pH'da üreyebilme) incelendi (Tablo 8). Tuz (% 10) varlığında izolatların % 85'ini iyi (üçü hariç) ürettiği, % 15 tuz varlığında ise üç suşun (508, 505Y10 ve 505Y11) çok iyi olmak üzere % 50'sinin (9 suş) üremeyebildikleri gözlemlendi. Bir izolatın ise (505Y12) % 10 tuz varlığında daha iyi ürettiği belirlendi.

Üreme ısılarının belirlenmesi için yapılan çalışmada suşların geniş bir ısı aralığında üreyebildikleri (141 nolu suşun 10 °C'de, 505Y2, 144 ve 505Y13 nolu suşların ise 45 °C'de üreyemedikleri) gözlemlendi. Özellikle 146 ve 505Y11 nolu izolatların 10-45 °C sıcaklık aralığında iyi üreyebildikleri belirlendi. Suşların pH 4.5 ile 8.5 aralığında üreme yetenekleri incelendiğinde, 505Y1 suşu hariç tümünün geniş pH aralığında oldukça iyi üreme özelliğine sahip oldukları izlendi (Tablo 8).

Suşların tür dağılımlarına bakıldığında ovit yaylası orkide toprağında 7 farklı *Bacillus* türünün izole edildiği, 9 suşun *Bacillus* sp. olarak belirlenip tür tanısı yapılamadığı gözlemlendi. İzolatların % 20'si *B. mycoides*, % 10'u *B. insolitus*, bir suş *B.*

macerasn, bir suş *B. popilliae*, birer suş *B. laterasporus*, *B. globisporus* ve *B. thuringiensis* olarak tanımlandı (Tablo 9).

Tablo 8. Mikroorganizmaların bazı fiziksel özelliklerinin belirlenmesi.

Sayı	Suş No	NaCl tolerans testi		Sıcaklık (°C) testi		pH testi		
		%10	%15	10	45	4.5	5.5	8.5
1	507	±	±	2+	+	2+	2+	2+
2	508	+	2+	2+	+	±	3+	+
3	11201	±	-	TE	TE	2+	2+	2+
4	506	-	-	+	+	+	2+	2+
5	1412	±	+	+	+	2+	2+	2+
6	5011	+	+	2+	+	2+	+	2+
7	146	+	-	2+	2+	2+	+	2+
8	505Y12	2+	-	+	+	2+	2+	2+
9	11203	+	+	+	+	+	+	+
10	141	+	±	-	+	+	+	2+
11	501	+	±	+	+	+	2+	2+
12	505Y10	+	2+	2+	+	2+	+	2+
13	505Y11	+	2+	2+	2+	+	2+	3+
14	142	±	+	+	+	2+	2+	2+
15	505Y2	-	-	+	-	+	2+	2+
16	144	+	-	+	-	-	+	+
17	505Y1	+	-	2+	±	2+	2+	2+
18	509	+	-	+	2+	+	+	+
19	503	+	-	±	+	2+	2+	±
20	505Y13	-	-	+	-	2+	2+	3+

Çalışmada izole edilen bakterilerin geleneksel yöntemlerle yapılan testlere göre tür tanıları yapıldı. Suşların tür dağılımları Tablo 9 ve 10'da verilmiştir. Bitki gelişimini teşvik eden, bakır toleransı yüksek ve bundan sonraki aşamalarda kullanılması düşünülen üç (501, 509 ve 505Y11) adet suş moleküler (16S rRNA sekans analizi) yöntemler kullanılarak tür tanıları doğrulandı.

Tablo 9. İzolatların geleneksel yöntemlerle yapılan tür tanımlanması (N=20).

Suş Kodu	Tanımlanan	Suş Kodu	Tanımlanan
507	<i>B. macerans</i>	501*	<i>B. mycoides</i>
508	<i>B. popilliae</i>	505Y10	<i>Bacillus</i> sp.
11201	<i>Bacillus</i> sp.	505Y11*	<i>Bacillus</i> sp.
506	<i>B. mycoides</i>	142	<i>B. insolitus</i>
1412	<i>Bacillus</i> sp.	505Y2	<i>Bacillus</i> sp.
5011	<i>Bacillus</i> sp.	144	<i>B. mycoides</i>
146	<i>Bacillus</i> sp.	505Y1	<i>B. mycoides</i>
505Y12	<i>Bacillus</i> sp.	509*	<i>B. thuringiensis</i>
11203	<i>Bacillus</i> sp.	503	<i>B. laterasporus</i>
141	<i>B. insolitus</i>	505Y13	<i>B. globisporus</i>

Tablo 10. İzole edilen bakterilerin tür dağılımı (N=20).

Bakteri Türü	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>B. mycoides</i>	4	20
<i>B. insolitus</i>	2	10
<i>B. globisporus</i>	1	5
<i>B. laterosporus</i>	1	5
<i>B. popilliae</i>	1	5
<i>B. macerans</i>	1	5
<i>B. thuringiensis</i>	1	5
<i>Bacillus</i> sp.	9	45
TOPLAM	20	100

3.2. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özelliklerin Belirlenmesi

Tanımlanan bakterilerin bitki gelişimini teşvik eden bir dizi (siderofor üretimi, fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz aktivitesi ve amonyum üretimi) faktörleri sıvı ya da katı ortamlarda (agar plakta) test edildi (Şekil 2, Tablo 11).

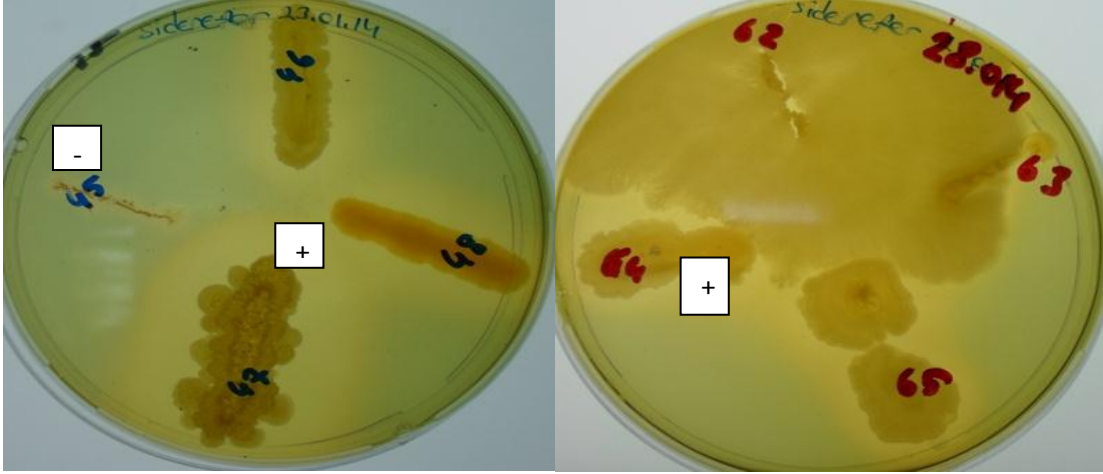
Tablo 11. Mikroorganizmaların bitki gelişimini teşvik eden bazı özellikleri.

Suş No	U/Z (mm) Sid Fos	ACC- DA	Amo	Suş No	U/Z (mm) Sid Fos	ACC DA	Am o
507	10/12 6/-	-	3+	501	13/30 -	+	2+
508	4/13 3/-	-	3+	505Y10	9/14 7/9	-	2+
11201	20/43 4/8	+	+	505Y11	10/16 -	-	3+
506	18/48 5/-	-	2+	142	7/18 5/8	+	2+
1412	- -	-	+	505Y2	6/9 4/-	-	2+
5011	8/15 3/-	-	3+	144	4/7 9/12	-	2+
146	17/20 6/-	+	+	505Y1	12/16 4/-	-	3+
505Y12	8/10 5/-	-	3+	509	30/34 5/-	-	2+
11203	8/10 6/14	±	2+	503	19/24 5/-	+	2+
141	6/10 7/9	-	2+	505Y13	18/45 5/-	-	2+

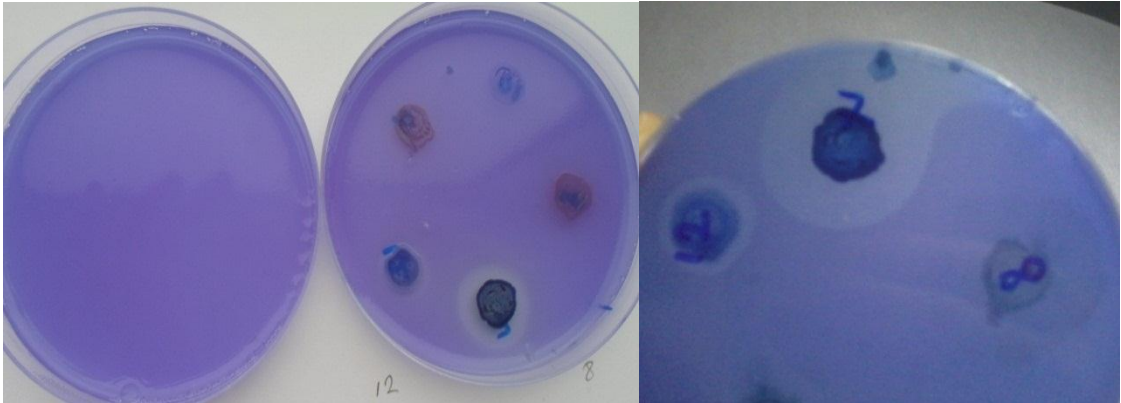
U; Üreme, Z; Zon çapı, -; aktivite yok, +; aktivite var, Amo; Amonyum üretimi, Siderofor (Sid.) üretimi ve Fosfat (Fos.) çözünürlüğü için 1-9 mm; aktivite var, 10-19 mm; aktivite iyi, ≥20; aktivite çok iyi.

Çalışmada suşların bitki gelişimini teşvik eden bazı özellikleri araştırıldı (Tablo 11). İzolatların büyük kısmında orta düzeyde olmak üzere, 7'inde güçlü siderofor üretimi (≥20) yeteneği tespit edildi. Yalnızca üç izolatta düşük düzeyde siderofor (505Y2 ve 144) belirlenirken birinde ise hiç (1412) üretim tespit edilemedi (Şekil 2). İzolatların ikisinde (11203 ve 144) daha iyi olmak üzere toplam 6'sında fosfat çözünürlüğü (Şekil 3) aktivitesi tespit edildi. Amonyum fosfatı çözme yetenekleri

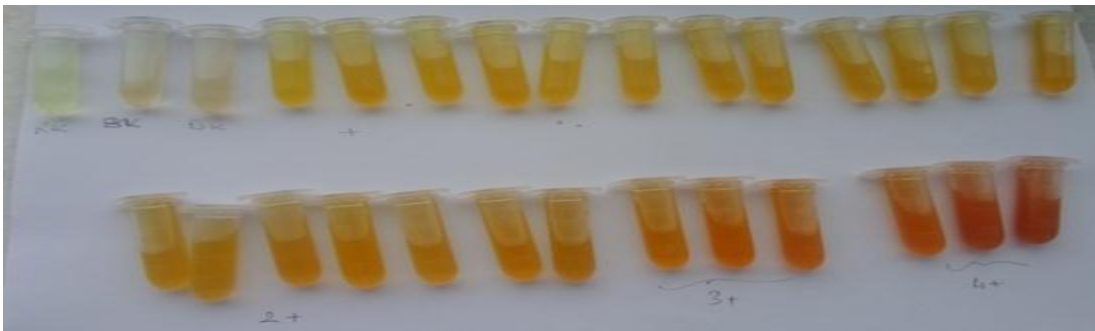
açısından incelendiğinde bazı izolatların diğerlerinden daha iyi oldukları belirlendi (Şekil 4). Ayrıca izolatların birinde düşük olmak üzere 6'sında ACC deaminaz (Şekil 5) pozitifliği belirlendi.



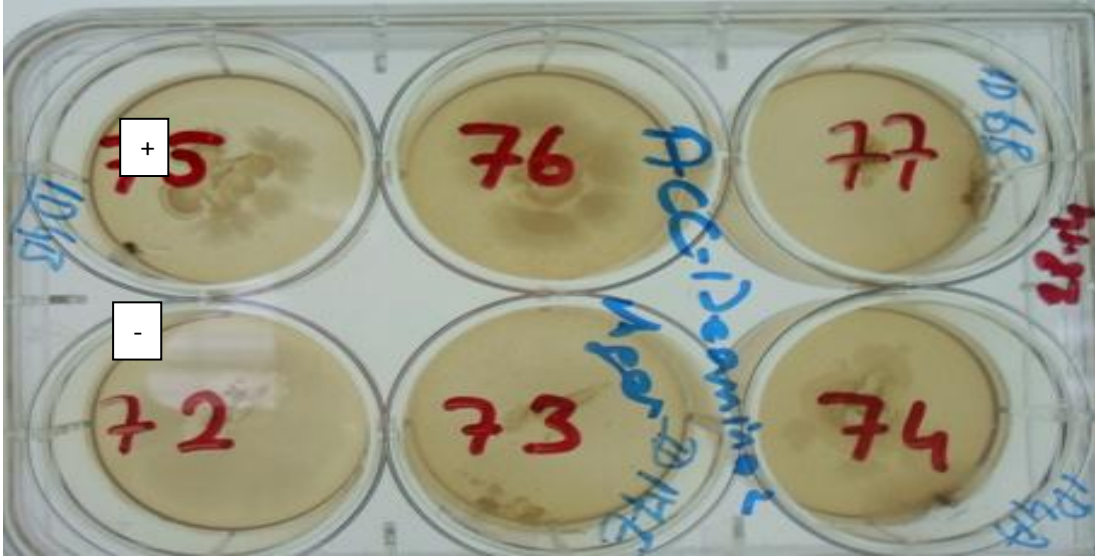
Şekil 2. Demir içeren besiyerinde siderofor üretiminin belirlenmesi. -; mavimsi alan siderofor negatif, +; Sarımsı zon siderofor pozitif.



Şekil 3. Fosfat içeren besiyerinde fosfataz varlığının tespiti. Şeffaf zon görünümü testin pozitifliğini vermektedir.



Şekil 4. Amonyum sülfat çözünürlüğü aktivitesinin (kırmızılık artıkça aktivite artar) belirlenmesi. RK; Nessler ayrıçlı negatif kontrol, BK; Besiyeri kontrol, ÜK; Bakteri üreme kontrol, +; zayıf, 2-3+; iyi, 4+; çok iyi aktivite varlığı.



Şekil 5. Bakterilerde ACC Deaminaz aktivitesinin (üreme varlığı testi pozitif kılar) belirlenmesi. +; üreme var, -; üreme yok.

Çalışmada suşların indol asetik asit üretme yetenekleri spektrofotometrik yöntemle araştırıldı. Örneklerin çoğunda iyi düzeyde, üçünde (508, 146 ve 505Y12) çok iyi düzeyde IAA aktivitesi tespiti edilirken, 6'ında aktivite bulunmadığı belirlendi (Tablo 12, Şekil 6).

Tablo 12. Mikroorganizmaların indol asetik asit (IAA) aktiviteleri.

Suş kodu	IAA aktivitesi	Suş kodu	IAA aktivitesi
507	7,54±0,26	501	-4,44±0,43
508	28,68±2,33*	505Y10	3,76±0,65
11201	13,53±0,31	505Y11	-1,58±0,11
506	10,92±2,45	142	-5,56±0,17
1412	15,29±0,26	505Y2	5,94±7,32
5011	11,10±0,12	144	-4,18±0,95
146	18,14±0,63*	505Y1	5,03±0,98
505Y12	17,00±0,51*	509	11,66±0,29
11203	-2,80±0,36	503	5,81±1,35
141	-5,15±0,10	505Y13	14,68±0,62

≤0; Aktivite yok, 0-9, Aktivite var, 10-15; Aktivite iyi, ≥16; Aktivite çok iyi.



Şekil 6. İndol asetik asit (IAA) aktivitesinin (pembe rengin artışı) belirlenmesinde tüpte ve ELİSA plakalarından bir görünüm.

3.3. Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi

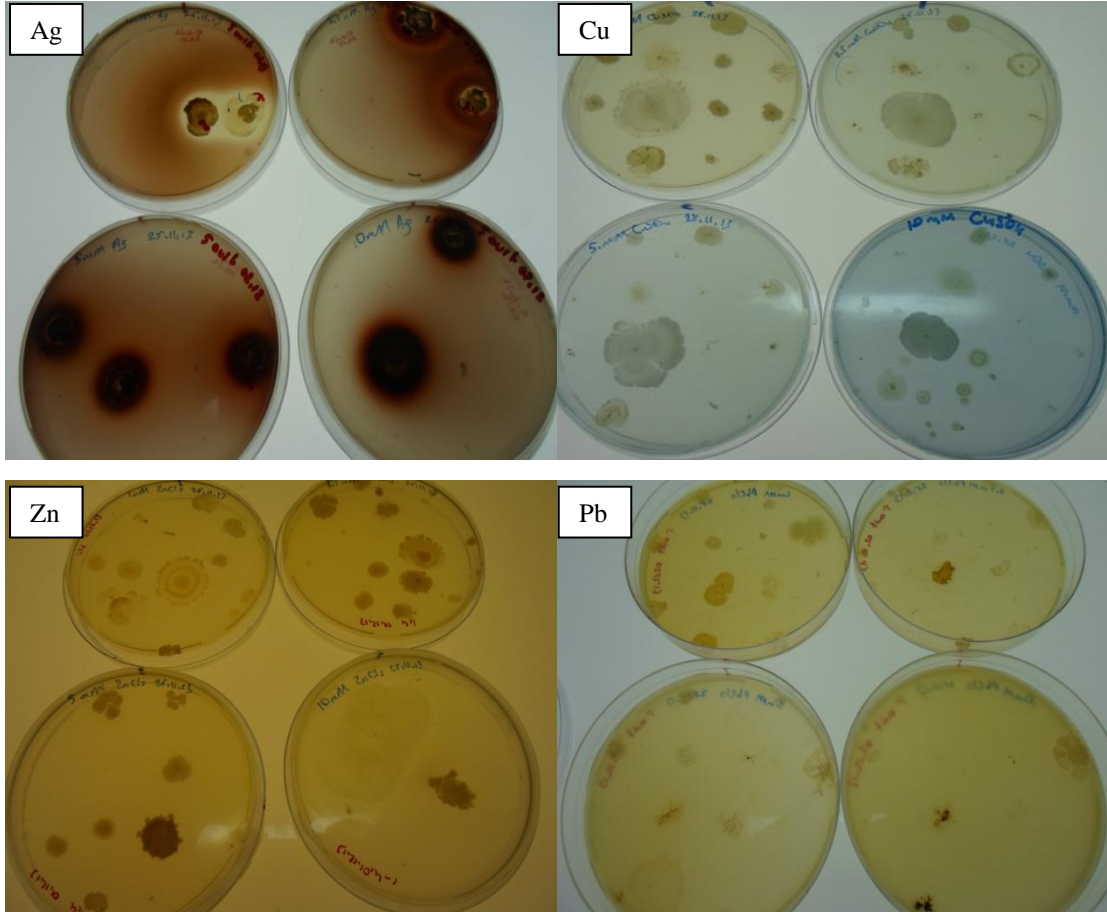
Çalışmada test edilen ovit suşlarının beş farklı (bakır, kurşun, demir, gümüş ve çinko) ağır metalin 1, 2.5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlu agar ortamında üreme özelliklerine incelendi (Tablo 13, Şekil 7). Suşların tümü 10 mM demir varlığında dahi çok rahat şekilde üredikleri tespit edildi. Suşların 7'si 10 mM gümüş varlığında, 9'u 10 mM bakır varlığında, 15'i 10 mM kurşun varlığında üreyebilirlerken hiçbirinin çinkonun bu konsantrasyonlarında üremediği belirlendi.

Tablo 13. Bakterilerin katı agar ortamında gümüş, demir, bakır, kurşun ve çinko (1, 2.5, 5 ve 10 mM) varlığında üreyebilme yetenekleri.

Suş Kodu	Metal Miktar(mM) ve Üreme Yoğunluğu K/U				
	Ag	Fe	Cu	Pb	Zn
507	TE	≤10 /+	TE	TE	TE
508	≤10/ +	≤10 /+	≤1/ +	≤10/ +	≤2,5/ +
11201	≤1/ +	≤10/ 2+	≤2,5/ +	≤10/ +	-/-
506	-	≤10/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +
1412	TE	≤10 /+	TE	TE	TE
5011	1 / +	≤10/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤2,5/ +
146	≤10/ +	≤10/ +	≤2,5/ +	≤5/ +	≤1/ +
505Y12	-	≤10/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +
11203	1 / +	≤10/ +	≤5/ +	≤10/ +	-/-
141	≤10/ +	≤10/ 2+	≤5/ 3+	≤1/ +	≤5/ +
501	-	≤10/2 +	≤5/3 +	≤2,5/ +	≤2,5/ +
505Y10	-	≤10/ 2+	≤5/3 +	≤10/ 2+	≤5/ +
505Y11	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +	≤10/ +	≤5/ +
142	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +	1(-/+)	≤5/ +
505Y2	-	≤10/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤2,5/ +
144	≤2,5/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +
505Y1	≤10/ +	≤10/ 2+	≤10/ +	≤10/ +	≤5/ +
509	≤10/ +	≤10/2 +	≤10/ 3+	≤10/ +	≤2,5/ 2+
503	-	≤10/ 2+	≤10/ 2+	≤10/ +	≤2,5/ +
505Y13	-	≤10/ +	≤10/ 3+	≤10/ +	≤5/ +

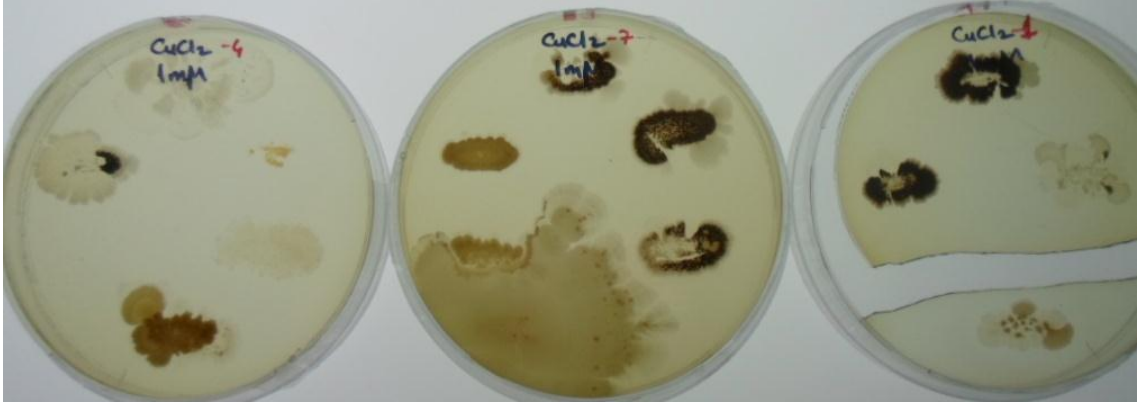
K: Metal konsantrasyonu, U: Metal varlığında üreme, TE: Test edilmedi, (≤); 1-10 mM'da üreme, (-); ürememe, (+): Üreme, (2+); iyi üreme, (3+); çok iyi üreme.

Bakteriler, gümüş varlığındaki üremede bazı suşların bariz renk değişimi ve şeffaf zon oluşumu gösterdikleri gözlemlendi. Kurşun varlığında bu olay kolonilerin üzeri kararma şeklinde tespit edildi. Bakır varlığında ise renk değişimi yok ancak petride koloni etrafında renk açılması şeklinde belirlendi. Çinko ve demir metali varlığındaki üremede ise herhangi bir görsel değişiklik gözlenmedi (Şekil 7).



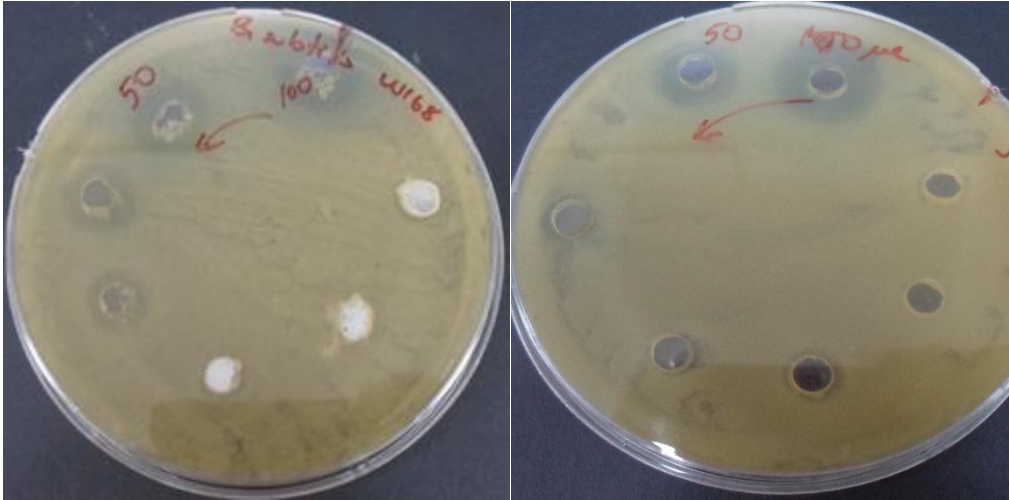
Şekil 7. Farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat, bakır sülfat, çinko klorür ve kurşun varlığında nitrat üreme (Kültürlerin 4. gününde çekilen resimleri).

Bakır varlığında üreyen koloniler oda ısısında bekletildiğinde bariz olarak renk değişimi oluşturdu gözlenmiş olup bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır (Şekil 8). Muhtemelen metal tuzları bekledikçe bakteri yüzeyinde birikerek ya da bakteri metalleri yüzeyine adsorbe ederek indirgenmiş olacağı düşünülmektedir.

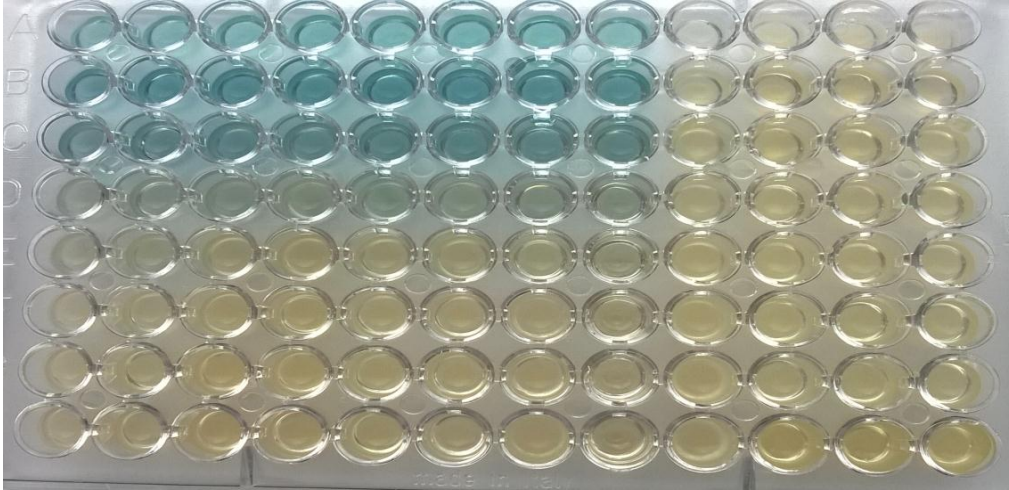


Şekil 8. Bakır içeren MHA besi ortamında kültür edilen suşların kolonileri oda ısısında bekletildiğinde renk dönüşümleri. Kremden kahve rengi ve siyaha dönüşümleri.

Bakterilerin test edilen bir kısım parametreleri (bitki gelişimini teşvik etme, metaller varlığında üreme ve özellikle de bakır varlığında en iyi üreme gözlenen suşlar) incelenerek en iyi etkinlik gözlenen suşlar bir sonraki çalışma için seçildi. Bu suşlarda bakır tuzunun minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri, hem agar kuyucuk dilüsyon hem de sıvı mikrodilüsyon (MIC) yöntemiyle test edildi (Tablo 14, Şekil 9 ve 10). Test edilen suşların genelde katı ortamda 6-12 mM Cu varlığında etkilenmeye başladıkları 3 mM'da etkilenmedikleri, dolayısıyla bakıra tolerant bakteriler oldukları gözlemlendi.



Şekil 9. Agar kuyucuk diffüzyon yönteminde Cu'nun inhibisyon zon çapları.



Şekil 10. Eliza plakasında bakır MIC deneyi (dilüsyon yukarıdan aşağıya doğru yapılmıştır).

Tablo 14. *Bacillus* sp. suşlarının bakır toleranslarının agar kuyucuk dilüsyon, MIC ve MBC yöntemleriyle belirlenmesi.

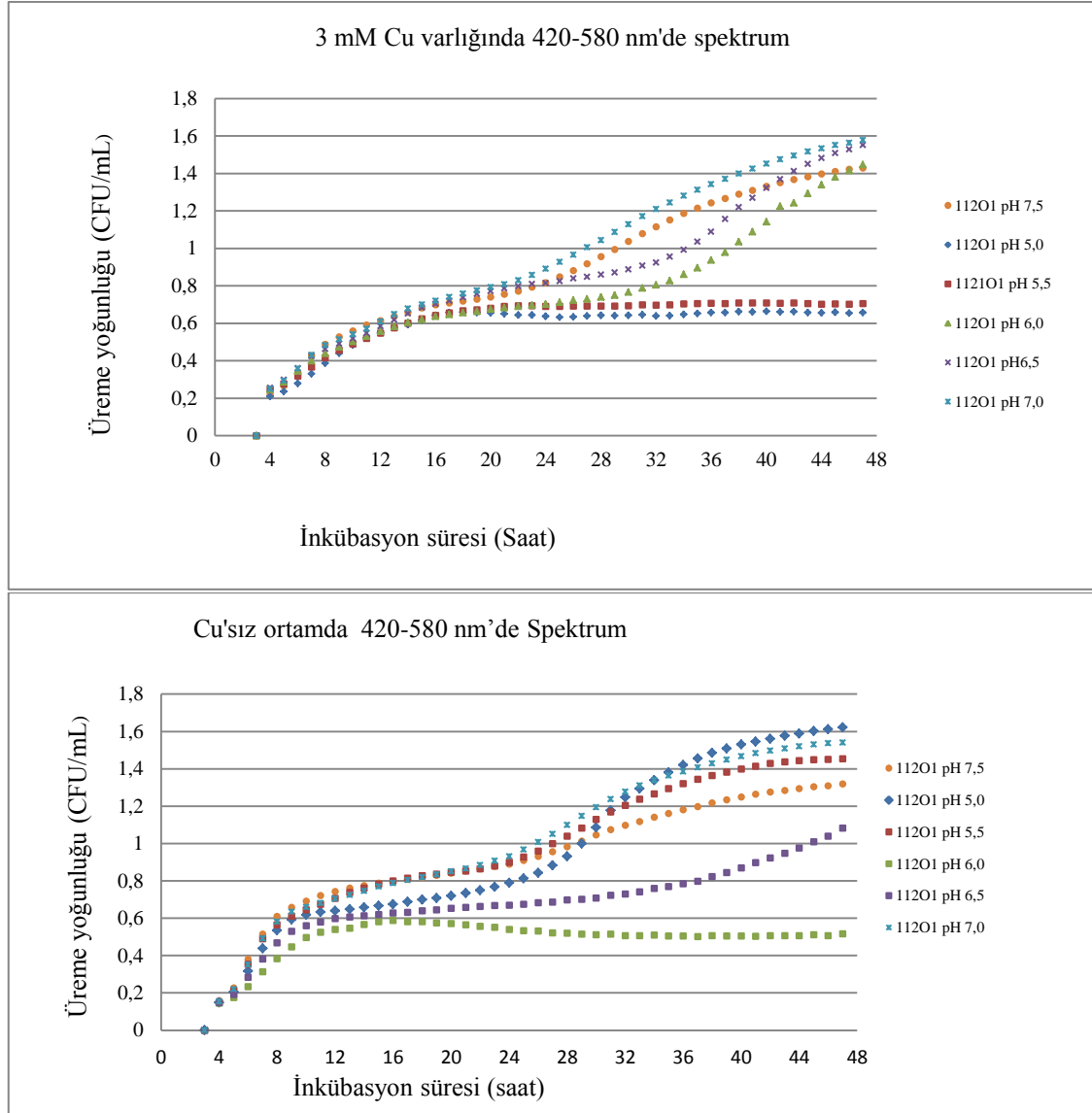
Örnek No	Bakırın (mM) Agar Kuyucuk Yöntemiyle İnhibisyonunu (mm)						İnhibisyon değeri (mM/L)	
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	MIC	MBC
112O1	13	11	8	6	-	-	25±0	50
5O1	20	10	6	-	-	-	12,5±0	50
5O5Y1	15	10	8	6	6	-	12,5±0	100
5O8	16	12	8	6	6	-	12,5±12	50
5O9	16	13	10	6	6	-	12,5±0	50
5O5Y11	15	14	14	10	6	-	12,5±0	50
<i>B. subtilis</i> W168*	16	14	14	10	6	-	6,3±0	50

*: kontrol olarak kullanıldı.

Bakır varlığında ve yokluğunda BHIB sıvı besiyerinde pH 5.0-7.5 aralığında bakterilerin üreme eğrisi, metal çalışmalarında kullanılmak üzere en uygun suşun seçilmesi amacıyla incelenmesi hedeflendi. Çalışmada bakır varlığında iyi üreyen altı adet suşun farklı pH ortamlarında (pH 5.0-7.5 aralığında) büyüme özelliklerinin belirlenmesi için optimum üreme ısılarında bakırlı ve bakırsız ortamda üreme eğrileri inkübatörlü dansitometre (Bioscreen C) cihazı yardımıyla ölçüldü ve verilerin eksel programında grafikleri oluşturuldu (Şekil 11 - 16).

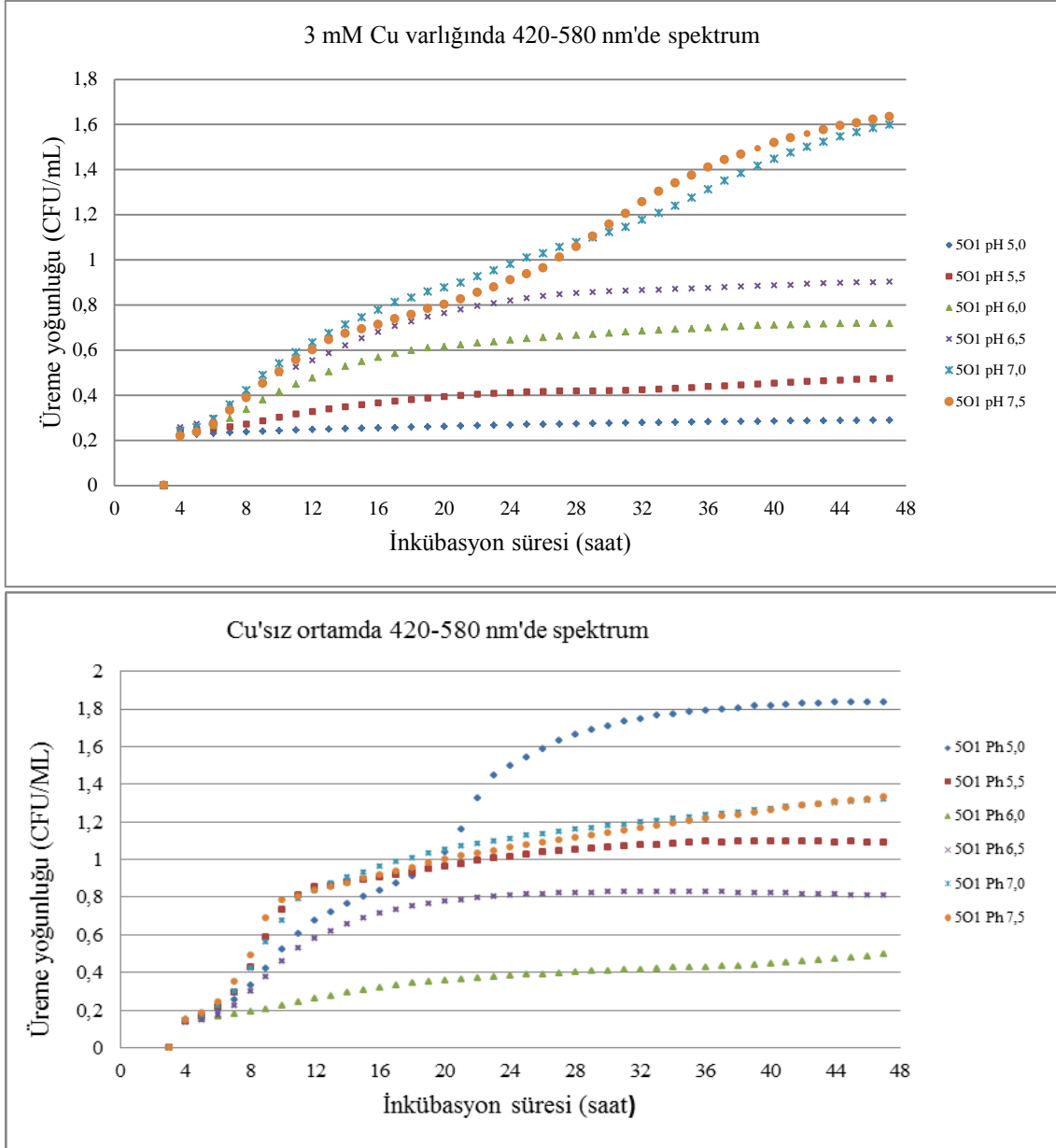
Bacillus sp.112O1 suşu bakır yokluğunda tüm pH'larda logaritmik fazı 8 saatte tamamlarken 3 mM Cu varlığında bu sürenin 18 saate kadar uzadığı gözlemlendi. Suşun metal varlığında pH 6.0-7.5 aralığında 24 saaten sonra da üremeye devam ederken pH

5.0-5.5 aralığında ise stasyonel faza geçtiği gözlemlendi. Bu durum metalsiz ortamda pH 6.0 dışında benzer olarak belirlenmiştir.



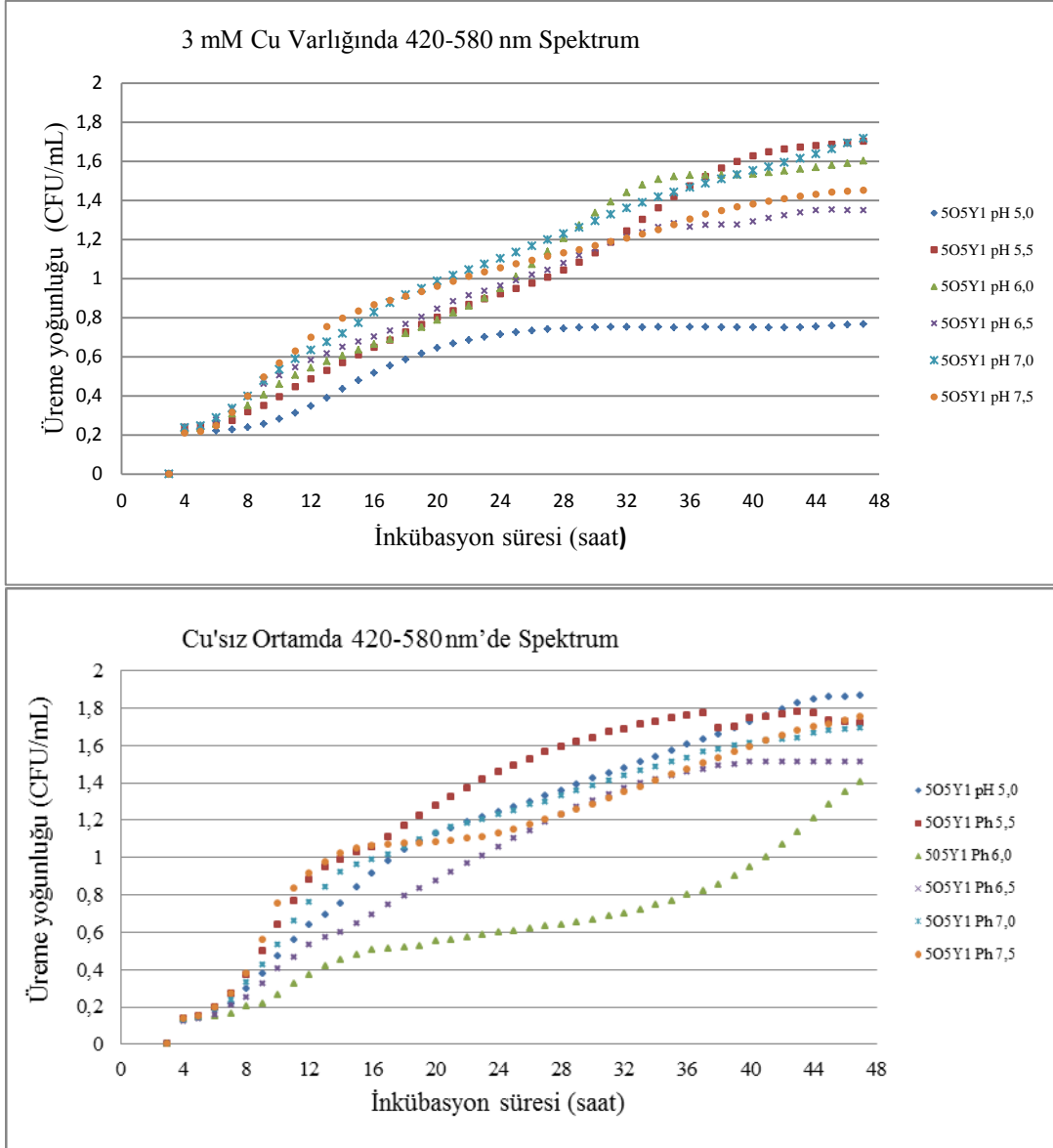
Şekil 11. 11201 suşunun Cu'lu ve Cu'suz, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

Bacillus mycoides 501 suşu genel olarak üreme yoğunluğunun az olduğu, en iyi üremenin pH 5.0-5.5 ile 7.0-7.5 aralığında olduğu, en az üremenin ise pH 6.0'da olduğu gözlemlendi. Metal varlığında üremenin düşük pH değerlerinde (pH 5.0-5.5) çok etkilendiği gözlemlendi. Metalsiz ortamda düşük üreme gözlenen pH 6.0 dahil olmak üzere diğer pH değerlerinde metal varlığında daha iyi ürediği belirlendi. En iyi üremenin pH 7.0-7.5 aralığında olduğu ve bu değer metalsiz ortamdan daha iyi olduğu tespit edildi.



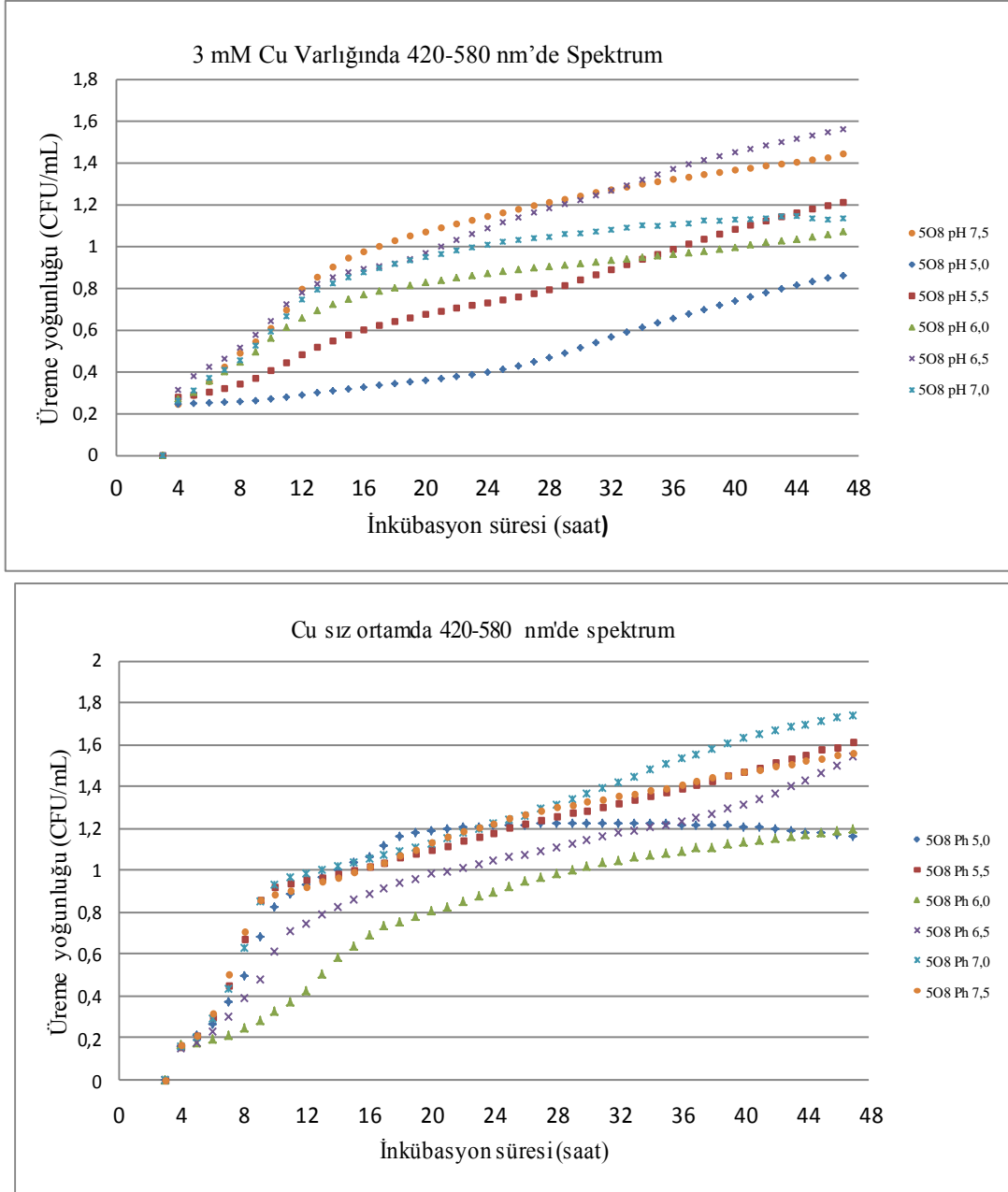
Şekil 12. 5O1 suşunun Cu'lı ve Cu'sız, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

B. mycooides 5O5Y1 suşu pH 6.0-6.5 aralığında düşük üreme yoğunluğuna sahip olduğu, diğer pH'larda ise daha iyi ürediği, ilk 10 saatte logaritmik fazın hızlı 40. saatten sonra stasyonel faza girdiği gözlemlendi. Metal varlığında en az üremenin düşük pH'da olduğu (pH 5.0) diğer pH değerlerinde logaritmik evrenin 40 saate ulaştığı yoğunluk açısından pek değişmediği gözlemlendi.



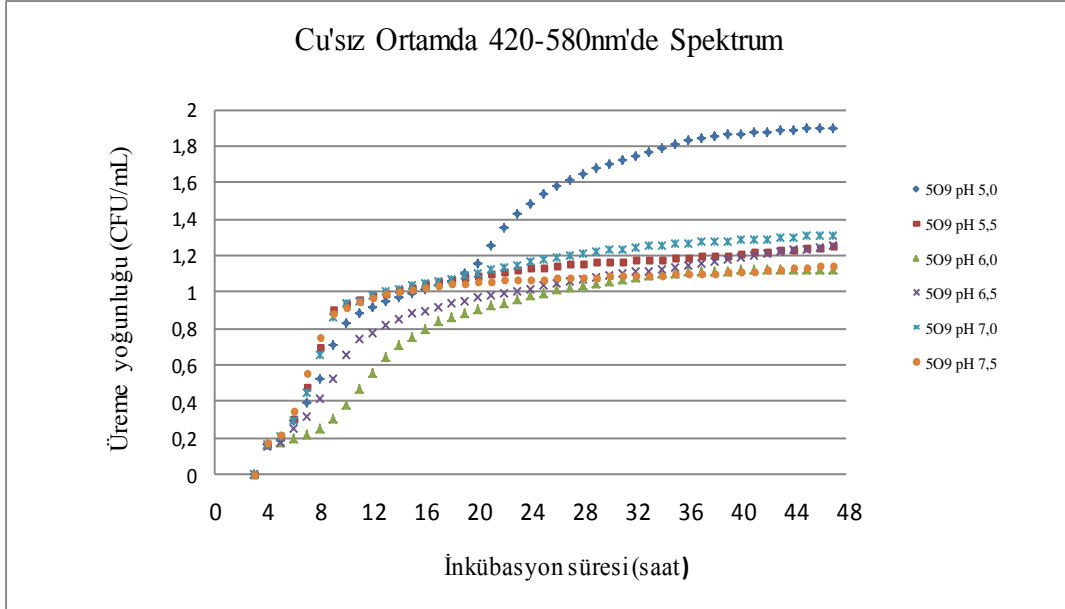
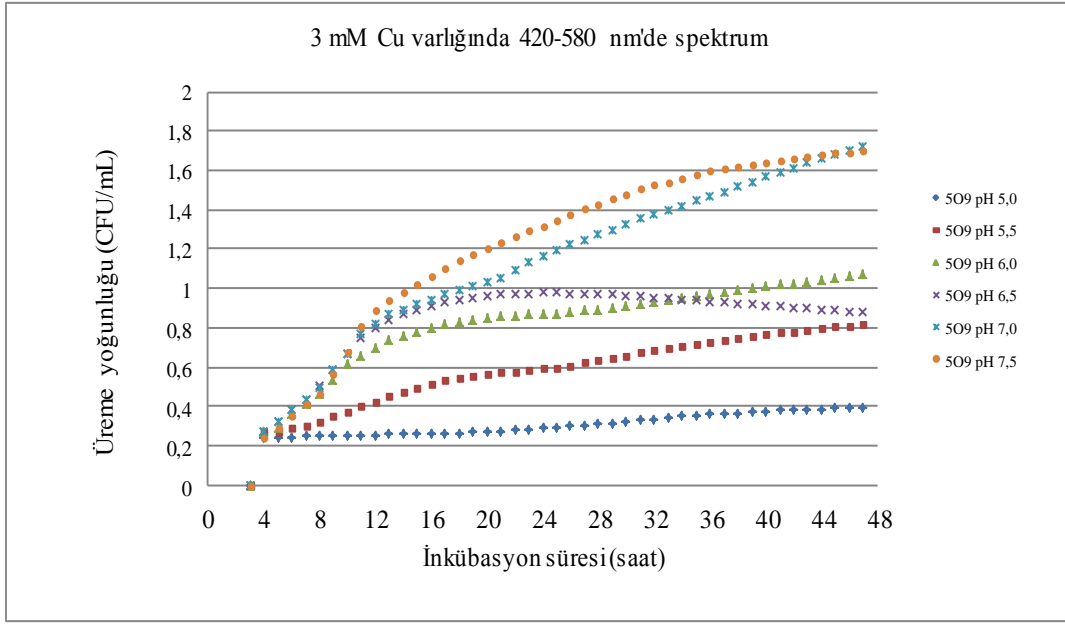
Şekil 13. 505Y1 suşunun Cu'lu ve Cu'suz, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

B. popilliae 508 suşunda diğer suşlarda genel olarak tüm pH değerlerinde üreyebildiği ancak pH 6.0-6.5'de en az üreme gösterdiği gözlemlendi. Logaritmik fazın sonu ise yine benzer şekilde 8 saatte tamamlamıştır. Metal varlığında ise farklı pH değerlerinde üreme hızının ve yoğunluğunun etkilendiği, düşük pH'larda en az (sırasıyla pH 5.0-6.0) üreme gösterdikleri belirlendi. En iyi üreme pH 6.5-7.5 aralığında gözlenmiş olup logaritmik üreme evresi 12-16 saatlere ulaştığı gözlemlendi.



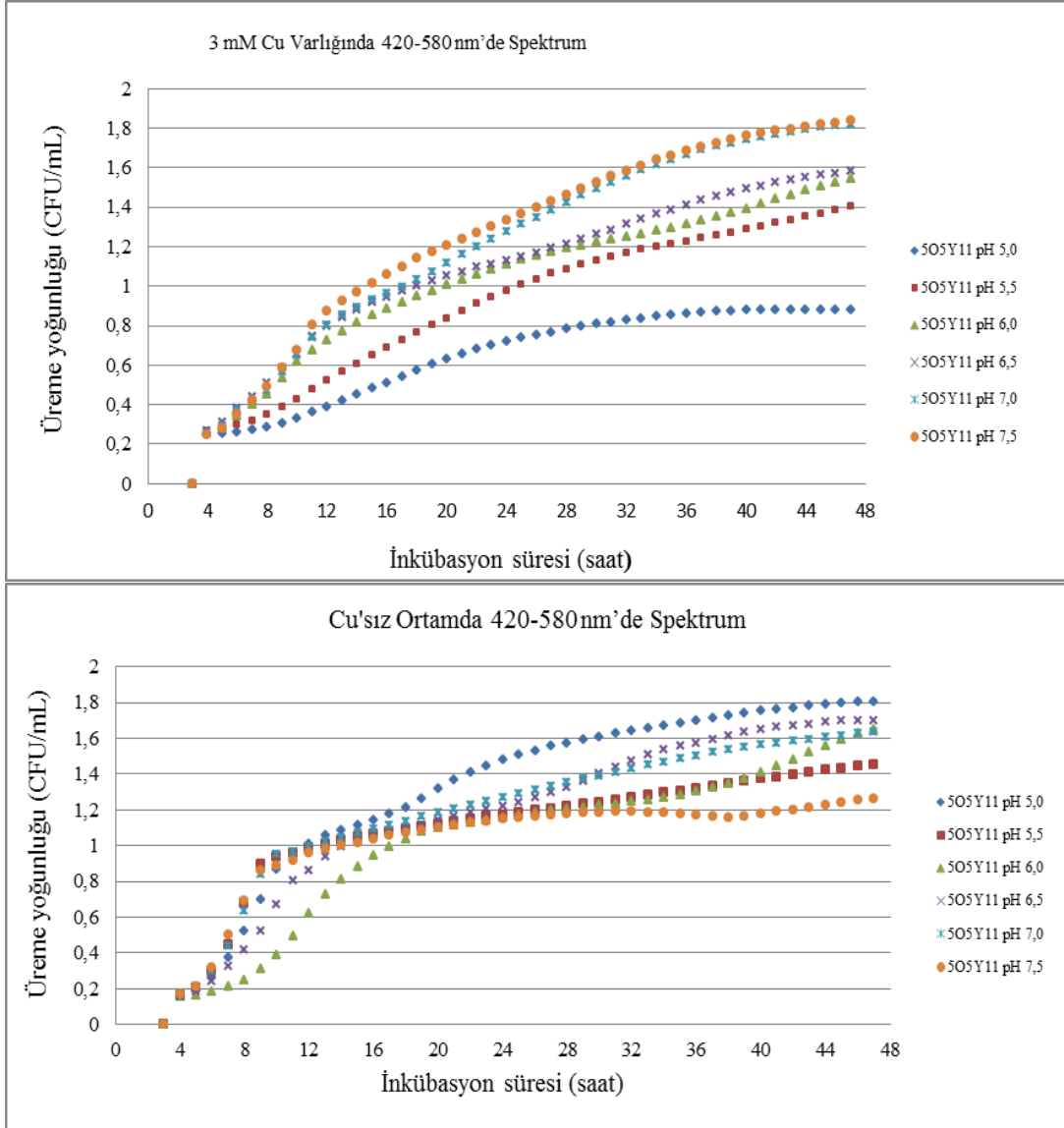
Şekil 14. 508 suşunun Cu'lu ve Cu'suz, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

B. thuringiensis 509 suşunun üreme eğrisine bakıldığında metalsiz ortamda pH 6.0-6.5'de üremenin logaritmik evreye geç ulaştığı ve duraklama evresine 12-18 saatte vardığı gözlemlendi. Diğer pH değerlerinde ise ilk 8 saatte logaritmik evreyi tamamladığı, en iyi üremenin pH 5.0, 5.5 ve 7.0 olduğu gözlemlendi. Metal varlığında en iyi üremenin 7.0-7.5'de olduğu, metalsiz ortama göre logaritmik evrenin uzadığı ancak duraklama evresi 36-40 saate ulaştığı gözlemlendi. Diğer pH değerlerinde suşun oldukça etkilendiği, en ciddi seviyede etkilenmenin düşük pH değerinde (pH 5.0-5.5) olduğu tespit edildi.



Şekil 15. 509 suşunun Cu'lu ve Cu'suz, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

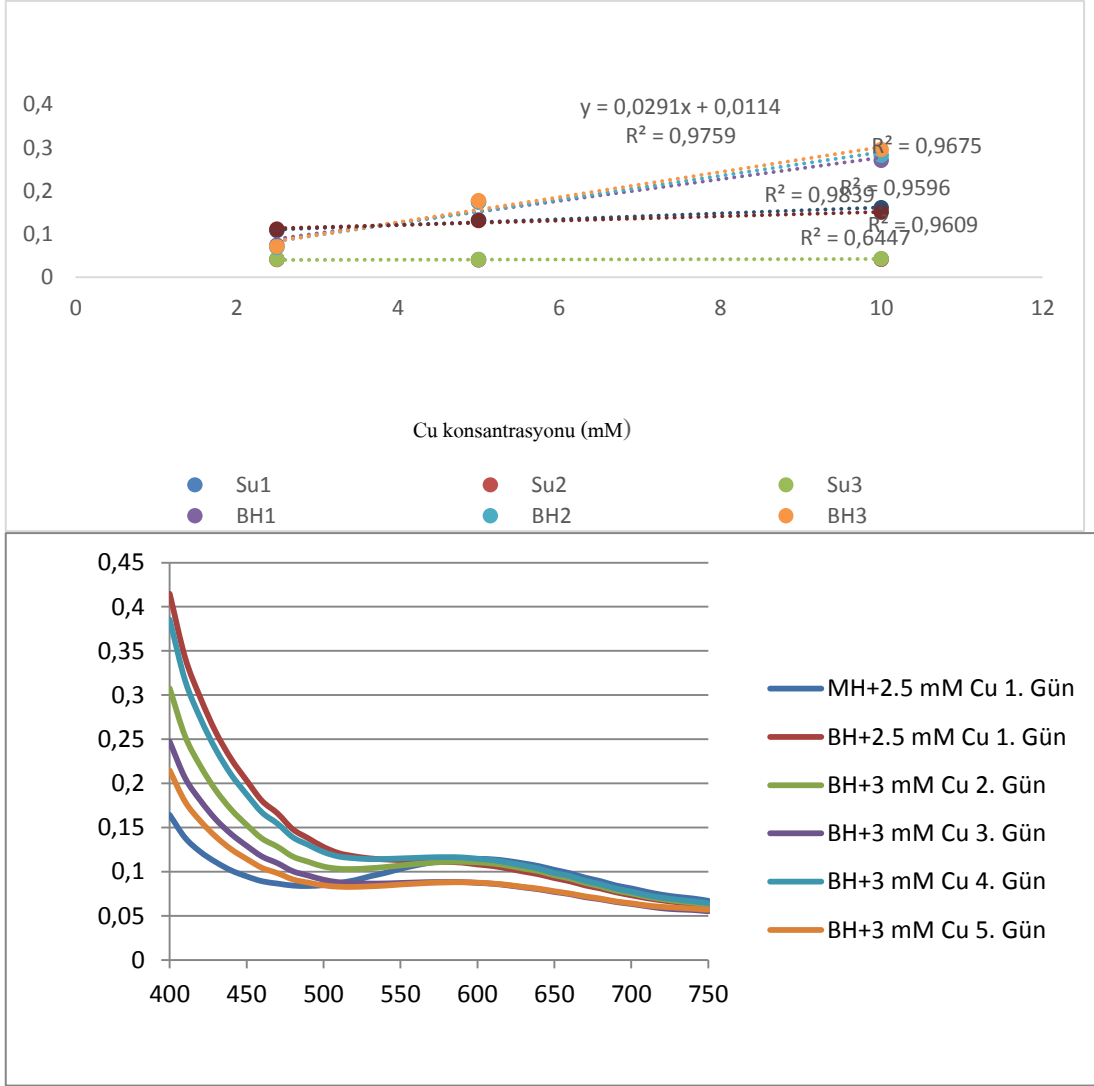
Bacillus sp. 505Y11 suşu metal yokluğunda 8 saatte logaritmik dönemi genel olarak tamamladığı, üremenin 24-28 saat aralığında stasyonel faza girdiği ancak 48 saate kadar yavaş da olsa üreme devam ettiği gözlenmektedir. Metalsiz ortamda geniş bir pH aralığında (pH 5.0-7.0) üremenin iyi olduğu, ancak pH 7.5'de ise düşük olduğu belirlendi. Bakır (3 mM) varlığında farklı pH'larda yapılan denemede logaritmik fazın 24 saatin üstüne çıktığı, pH 5.0-6.5 aralığında üremenin düştüğü, ancak pH 7.0-7.5'de en iyi olduğu gözlemlendi.



Şekil 16. 505Y11 suşunun Cu'lu (3 mM) ve Cu'suz, farklı pH'lı BHIB besiyerinde üreme grafiği.

3.4. 505Y11 Suşunun Bakırı Absorbsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Bakırın besi ortamıyla olan etkileşimini belirlemek amacıyla su, MHB ve BHIB ortamlarında 1-10 mM Cu içeren standart solüsyon hazırlanıp OD₃₅₀₋₈₀₀ nm dalga boyunda spektrum alınarak standart eğri çıkarıldı (Şekil 17). Bu şekilde gözlemlendiği üzere en uygun besi ortamının ya da metali bağlama etkinliğinin BHI sıvı besiyerinde gözlemlendiği, MHB besi ortamının absorpsiyon değerinin (dataların tümü tezde verilmedi) düşük olduğu, ayrıca bakterinin BHIB ortamında daha iyi ürettiği için bundan sonraki aşamalarda BHIB besiyeri kullanıldı.



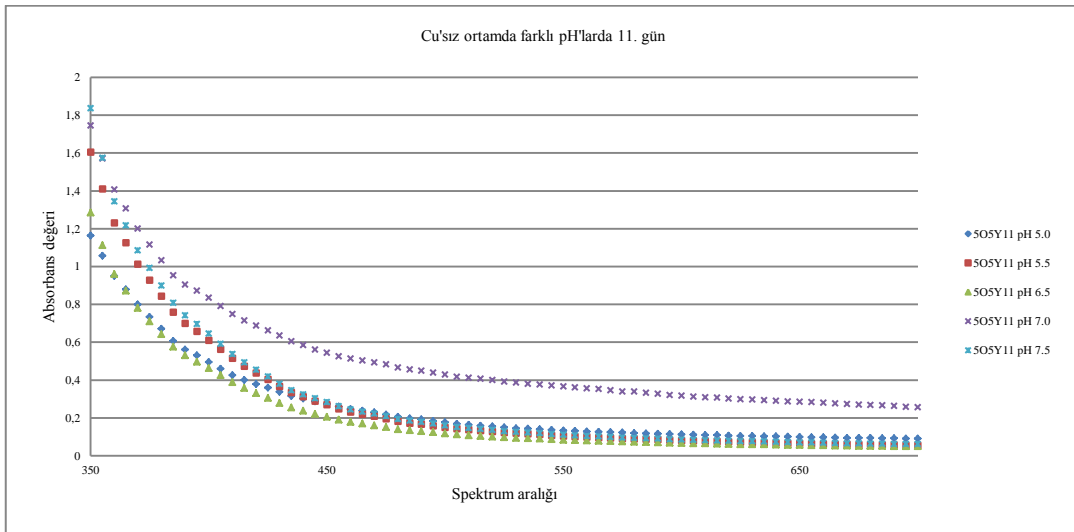
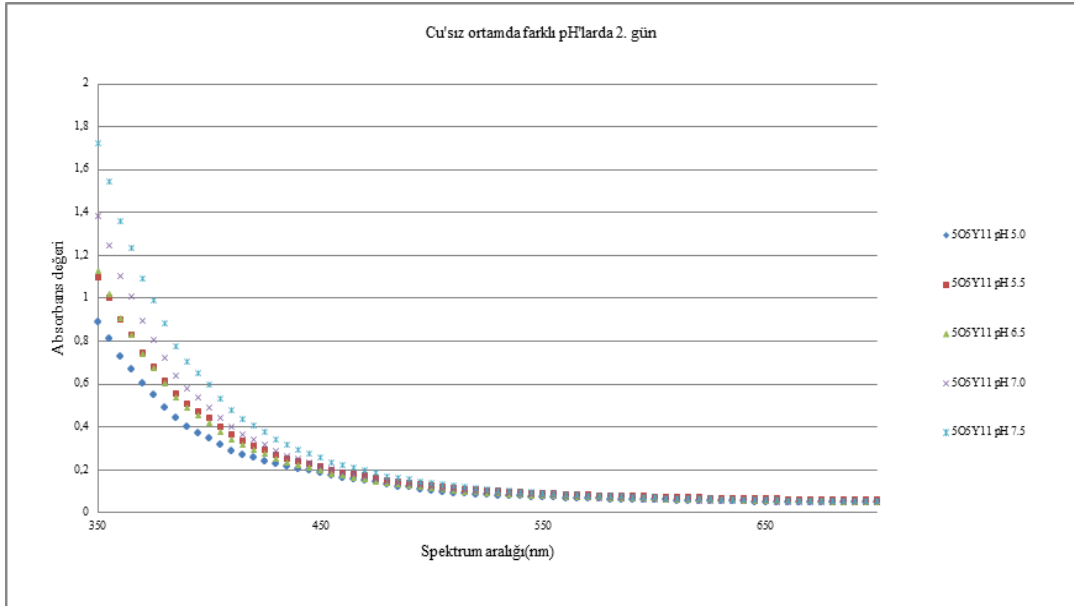
Şekil 17. Bakırın MHB ile BHIB besiyerleri ve su ortamındaki standart ile absorbans grafiği eğrileri.

Çalışmada bakır en iyi adsorblayan ya da indirgeyen suşun belirlenmesi için Tablo 6'da belirtilen izolatların tümü, 3 mM bakır varlığında BHIB ortamlarında test edildi. Bu demnemelerden elde edilen veriler göre farklı pH'larda (pH 5.0-7.5) suşların bakır varlığında ve yokluğunda üreme ile bakır bağlama/indirgeme kapasitesi araştırıldı. Bu özelliği en uygun olan suşun 505Y11 suşu olduğu gözlemlendi. Çalışmada sadece bu suşun değerleri verildi.

Bacillus sp. 505Y11 suşu 3 mM Cu varlığında ve kontrol olarak bakır yokluğunda, pH 5.0-7.5 ayarlanmış BHIB besi ortamında 15 gün 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 36 °C'de inkübe edildi. Kültürlerden her gün 2 mL alınarak 10.000 g'de santrifüj edildi ve süper natant alınarak -20 °C'de stoklandı. Kültür

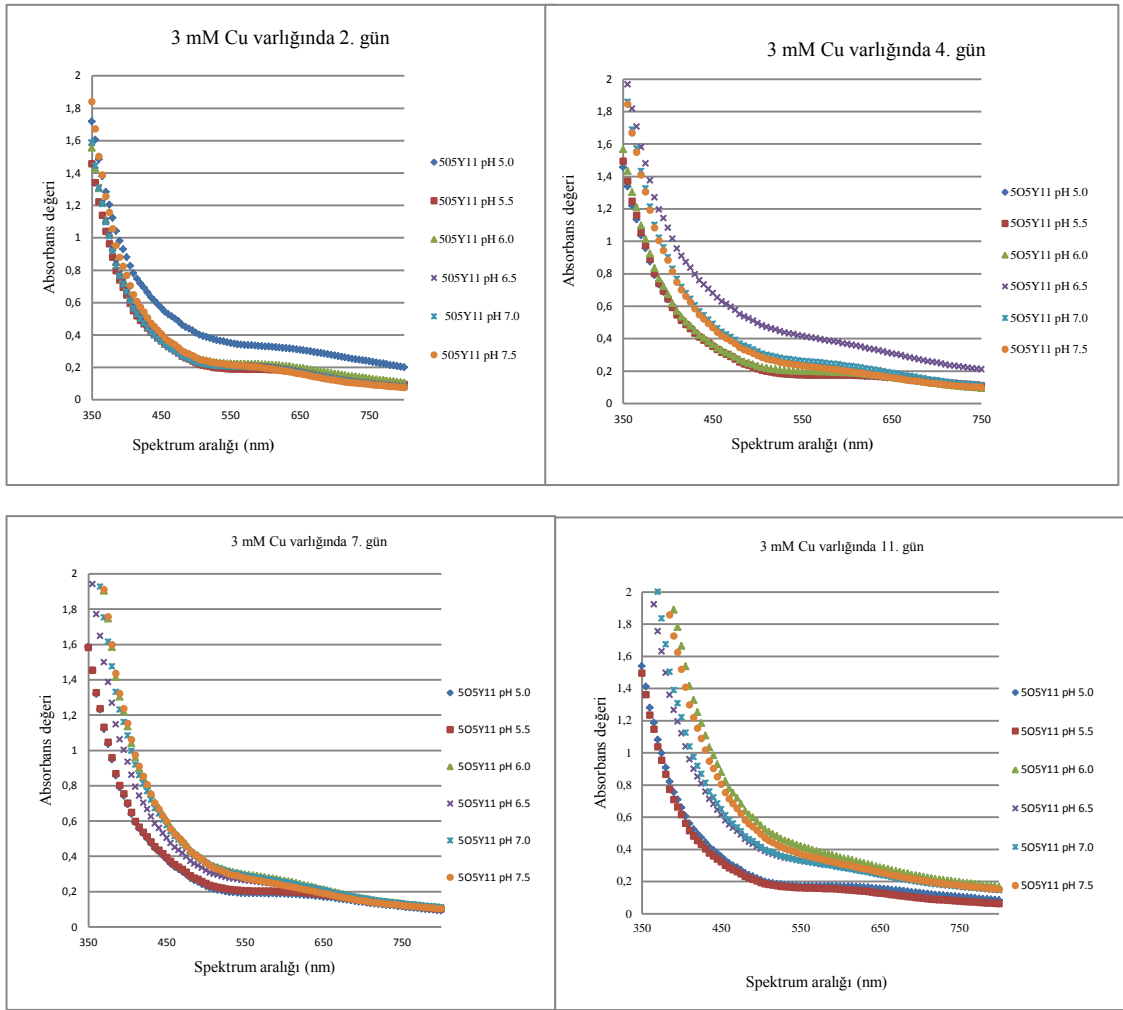
sonlandırıldığında tüm süpernatantların spektrofotometrik ölçümleri alındı (Ölçüm değerleri tablo olarak tezde verilmedi).

Bakır içermeyen kontrol örnekleri 2. 7. ve 11. günleri incelendiğinde (Şekil 18) herhangi bir spektrofotometrik pik oluşmadığı, bakteri kültür süresi uzadıkça spektrumda da total artış olduğu gözlemlendi. 5O5Y11 suşunun kültür süresi uzadıkça pH 7.0’de spektrum artışı olduğu, 11. gün de bu artışı bariz bir fark oluşturduğu izlendiği. Bu sonuçlar kültürün üremesi için en uygun pH aralığının pH 7.0 olduğunu göstermektedir.



Şekil 18. 5O5Y11'in Cu'sız BHIB ortamında ve farklı pH'larda 2. ve 11. gün inkübasyon sonrası absorbans spektrumları.

Bakır (3 mM) varlığında 5O5Y11 suşunun farklı pH değerlerinde alınan spektrumlarda 550-600 nm’de bir pik oluştuğu ve bu pikin bakıra ait olduğu gözlemlendi (Şekil 19). Spektrumun hem kültür süresine göre hem de pH değerine göre değiştiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara doğrultusunda 5O5Y11 suşunun metali bağladığı/ya da indirgemiş olduğu belirlenmiş olup bitki denemesinde bu suşun kullanılması ve denemelerin pH 7.0’de yapılması gerektiği gözlemlendi.



Şekil 19. BHI Besi ortamında 5O5Y11 suşunun 3 mM Cu varlığında ve farklı pH’larda kültürlerin 2., 4., 7. ve 11. günlerde alınan absorbans spektrum grafikleri.

3.5. Bakır ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı

Yukarıda incelenen bir kısım özellikler açısından seçilen dört adet suşların, 1,5 mM Cu varlığında mısır bitkisinin çimlenmesine olan etkinliği araştırıldı. Bu amaçla her bir grup için 3 tekerrürlü olmak üzere toplamda 30 (10X3) adet mısır tohumu bir

hafta çimlendirilerek çimlenme başarısı, gövde ve kök gelişimi parametreleri ölçüldü. Tüm parametrelerin ortalama değerleri Tablo 15’de verildi. Bakteri varlığında 3. günde 5O8 nolu suş, 5. günde 5O5Y11 ve 7. günde çimlenme başarısı en yüksek 112O1 nolu suşların olduğu gözlemlendi. Bakır ve bakteri birlikteliğinde ise 3. günde 5O5Y11 nolu suşun % 100 çimlendiği belirlendi.

Tüm veriler, genel olarak kendi grupları içinde değerlendirildiğinde, bakterilerin çimlenmeyi kontrollerine göre olumsuz etkiledikleri, en az olumsuz etkinliğin 5O8 nolu suş grubunda gözlenirken, sırasıyla 5O1, 5O5Y11 ve 1121O1 suşları bunu izledikleri belirlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Mısır çimlenmesi üzerine bakteriler ve bakır (1,5 mM) etkinliğinin belirlenmesi.

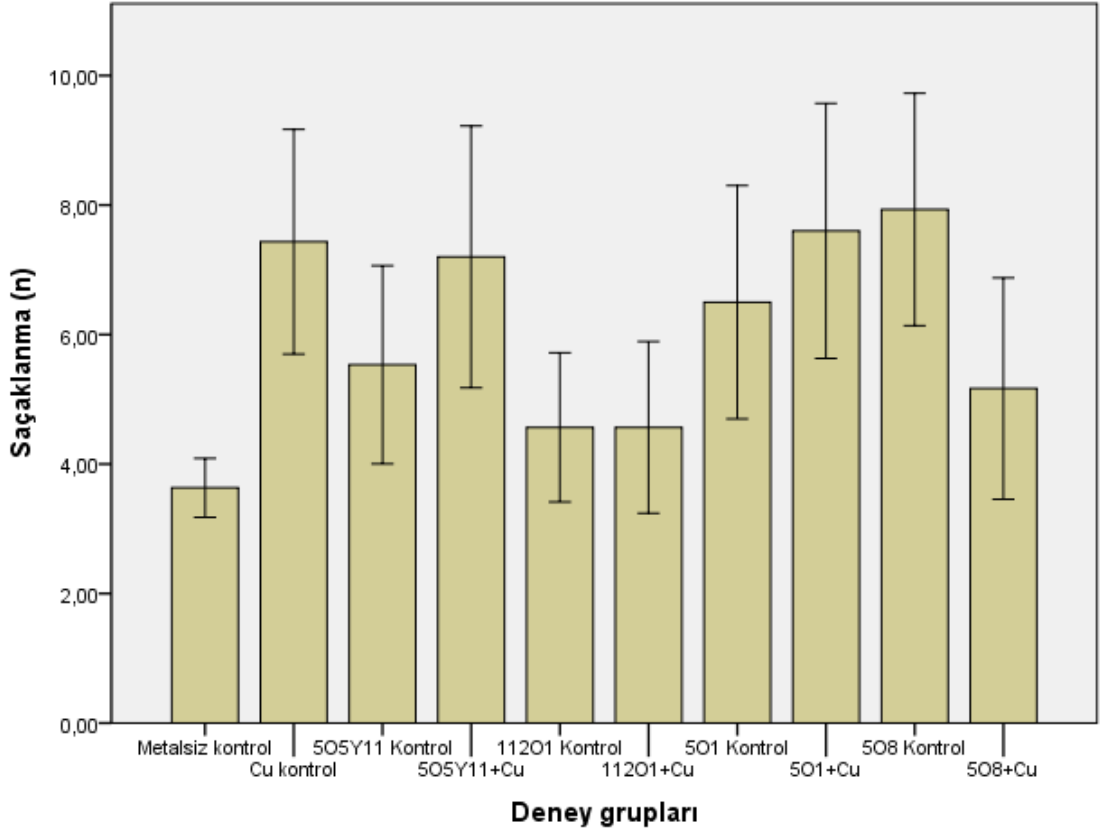
Deneme Deseni	Güne Göre Çimlenme			Koleptil (Gövde)		Radikul (kök)		Saçak Kök
	Yüzdesi			Verileri (g ve cm)		Verileri (g ve cm)		Verileri
	3.	5.	7.	Ağırlık	Uzunluk	Ağırlık	Uzunluk	N/%
Mısır	87	100	100	0,199	3,625	0,199	10,04	3,6
Mısır-Cu	96,7	100	100	0,12	2,6	0,085	1,69	8,3
112O1-M	76,7	83,3	96,7	0,161	4,48	0,195	7,296	5,2
112O1-Cu-M	80	90	93,3	0,108	2,63	0,062	1,94	5,7
5O1-M	70	83,3	90	0,146	4,64	0,25	8,68	8,0
5O1-Cu-M	83,3	96,7	100	0,113	2,916	0,407	1,1	7,9
5O8-M	80	86,7	90	0,148	4,95	0,323	10,42	8,9
5O8-Cu-M	80	96,7	96,7	0,132	3,1	0,041	1,177	6,8
5O5Y11-M	75	92	92	0,208	4,41	0,445	7,00	7,3
5O5Y11-Cu-M	100	100	100	0,371	3,88	0,164	1,31	8,1

M; Mısır, N; Sayı, U; uzunluk, %; Yüzde.

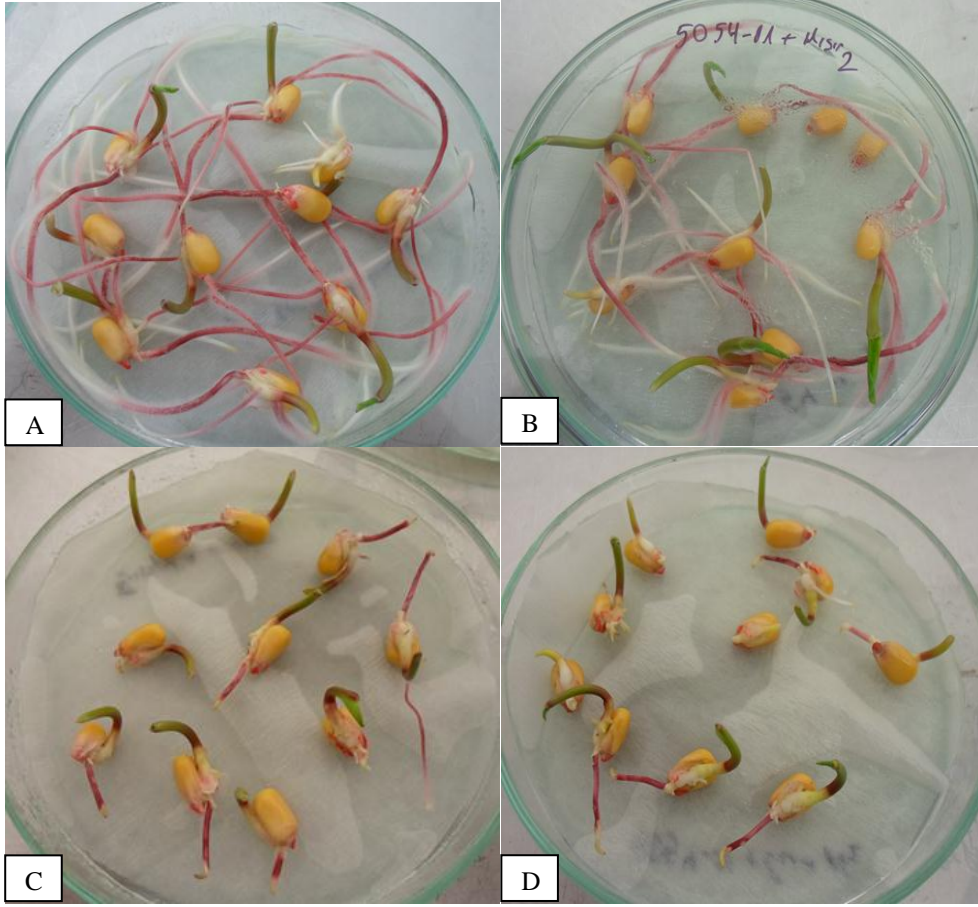
Bakır varlığında test edilen 4 farklı bakteri suşunun mısırın gelişimi (gövde, kök ve saçaklanma) üzerine etkinlikleri istatistiksel (ANOVA) açıdan incelendiğinde, gövde ağırlıkları ($p=0,117$) dışındaki parametrelerin anlamlı fark oluşturduğu ($p<0,01$) gözlemlendi.

Bakır varlığında saçaklanma hariç tüm verilerde kontrole göre büyük oranda azalmanın olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda saçaklanma sayısı az olduğu bakır varlığında kontrole göre saçaklanma sayısının % 100’e varan oranda arttığı belirlendi

(Tablo 15). Test edilen 4 bakteride, bakır yokluğunda ortamda kontrole göre saçaklanma sayısı yüksek olduğu, bakır varlığında ise 508 ve 11201 dışındaki bakterilerde daha da arttığı belirlendi. Bakır varlığında saçaklanma artmakta ancak uzamamakta ve çok kısa kalmaktadır (Şekil 20-21, Tablo 15).



Şekil 20. Çimlenme deneyinde, bakteriler ve bakır (1.5 mM) varlığında ve yokluğunda mısır bitkisinin saçaklanma sonuçları.



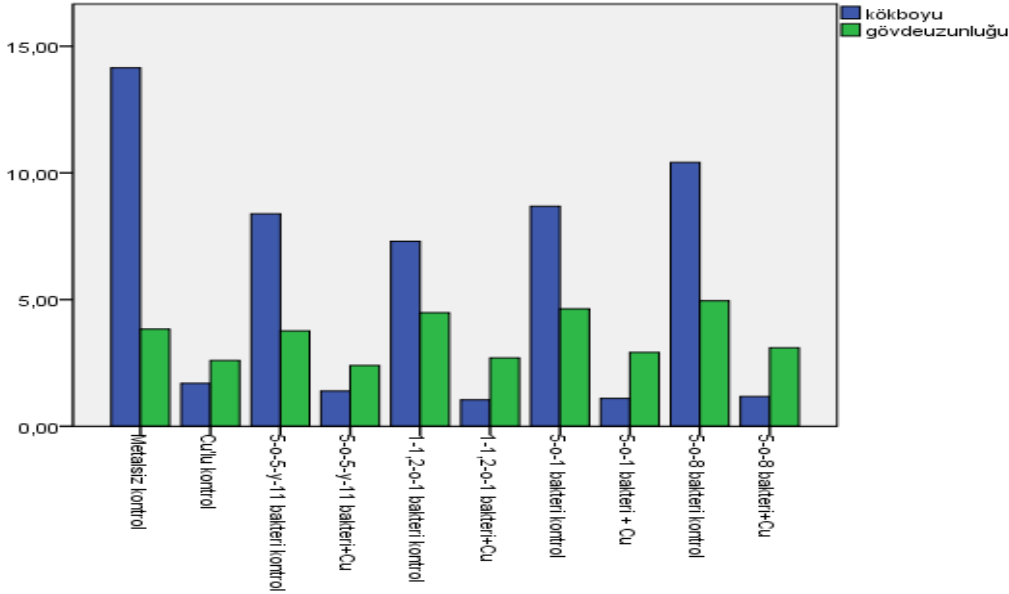
Şekil 21. Mısırın çimlenme deneyinin 5. gününde bakteri (505Y11) ve bakır (1,5 mM) varlığında görünüşleri. A) Mısır kontrolü, B) Bakteri-Mısır, C) Bakır-Mısır, D) Bakteri-Bakır-Mısır.

Çalışmada birçok özelliği ile öne çıkmakta olan, mısır deneyinde ise çimlenme başarısı ilk üç günde % 100 olarak belirlenen 505Y11 suşunun 5 ve 7. günde çimlenme görünümü Şekil 21-22'de verildi. Şekilde görüldüğü gibi bakteri kontrol grubunda gelişmenin iyi olduğu, ancak bakır varlığında gelişmenin çok etkilendiği, bakteri+bakır birlikteliğinde ise bakırın biraz tolera edildiği ve gelişmenin biraz daha iyi olduğu gözlenmektedir.



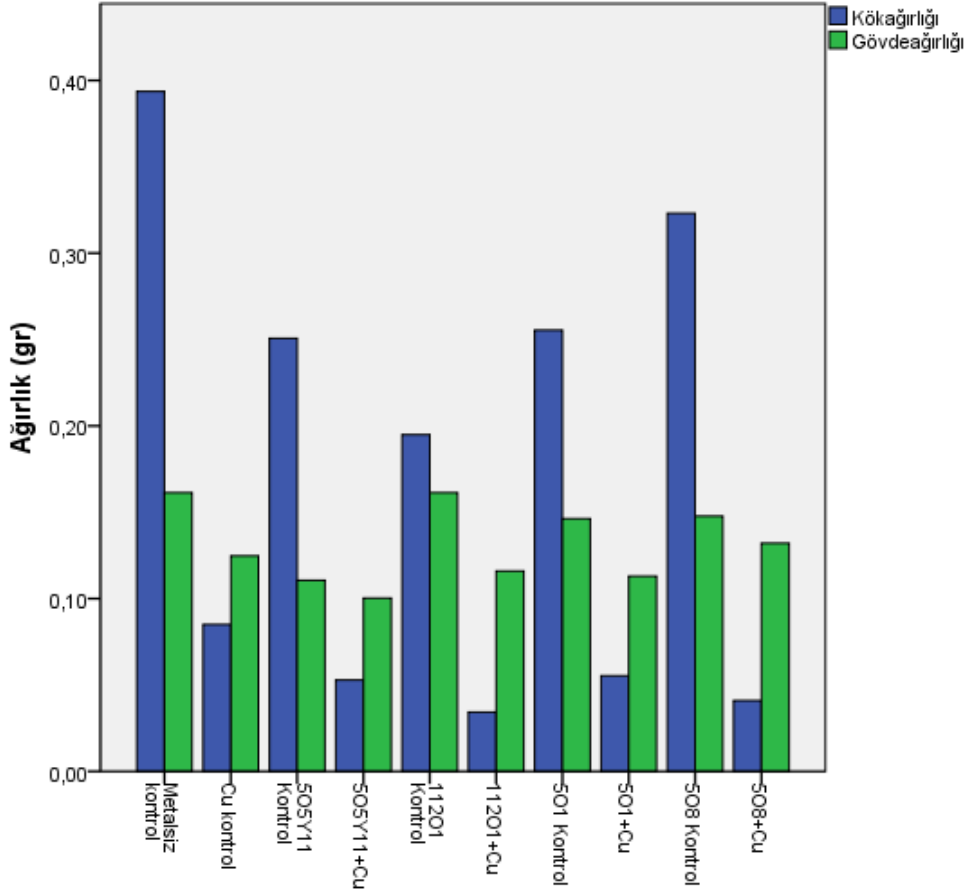
Şekil 22. Mısırın bakterisi (505Y11) ve bakır (1.5 mM) varlığında çimlenme deneyinin son (7.) günü görünümü.

Çimlenen mısırın 7. gününde alınan verilere göre kök ve gövde uzunluğu açısından incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla bakteri uygulandığında kök-gövde gelişimini arttırdığı gözlemlendi. Buradan bakterilerin bitki gelişimini teşvik edici özellikte olduğu düşünülmektedir. Cu ilave edildiğinde ise kontrol ortamına göre azalmanın olduğu, bakteri ilavesiyle bu azalmanın önüne geçildiği gözlemlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Bakterilerin, Cu varlığında ve yokluğunda mısır kök ve gövde uzunluklarına etkisi.

Mısır tohumunun çimlenmenin 7. günündeki kök ve gövde ağırlığı incelendiğinde kontrol grubunda en iyi olduğu, metal varlığında gelişmenin engellendiği gözlemlendi (Tablo 15, Şekil 24).



Şekil 24. Bakteri ile Cu varlığında ve yokluğunda mısır bitkisinin kök ve gövde ağırlıkları.

Bu çalışmada saksı deneyi için kullanılacak suşların sırasıyla 508, 501 ve 505Y11 oldukları belirlendi. Bundan sonraki aşama olan saksı deneyi için diğer parametreler açısından en uygun olan 505Y11 suşu seçilip kullanılmıştır.

3.6. Bakır Varlığında Mısır Bitkisi Gelişimi ve Atomik Absorbsiyon Analizi

3.6.1. Bakır Varlığında Mısır Gelişimi Deneyi

Çalışmada bir dizi parametreleri (bitki gelişimini teşvik etme, geniş pH aralığında ve metal ortamında rahat üreyebilme, çimlenme başarısına etkili olabilme bakımından incelendiğinde 505Y11 suşunun mısır bitkisi saksı deneyinde kullanılması karar verildi. Bu amaçla mısır tohumları tek tek tartılarak 24-26 g olan sağlıklı mısırlar seçildi ve bir dizi işlemlerden geçirilerek steril şartlarda 2 gün çimlendirildi. Sağlıklı çimlenen tohumlar uygun şekilde önceden hazırlanan saksılara yerleştirilerek iklim dolabında

inkübe edildi. Üç tekrarlı (saksı) ve her saksıda 5 adet tohum olmak üzere toplam 15 fidan test edildi (Tablo 16, Şekil 25).

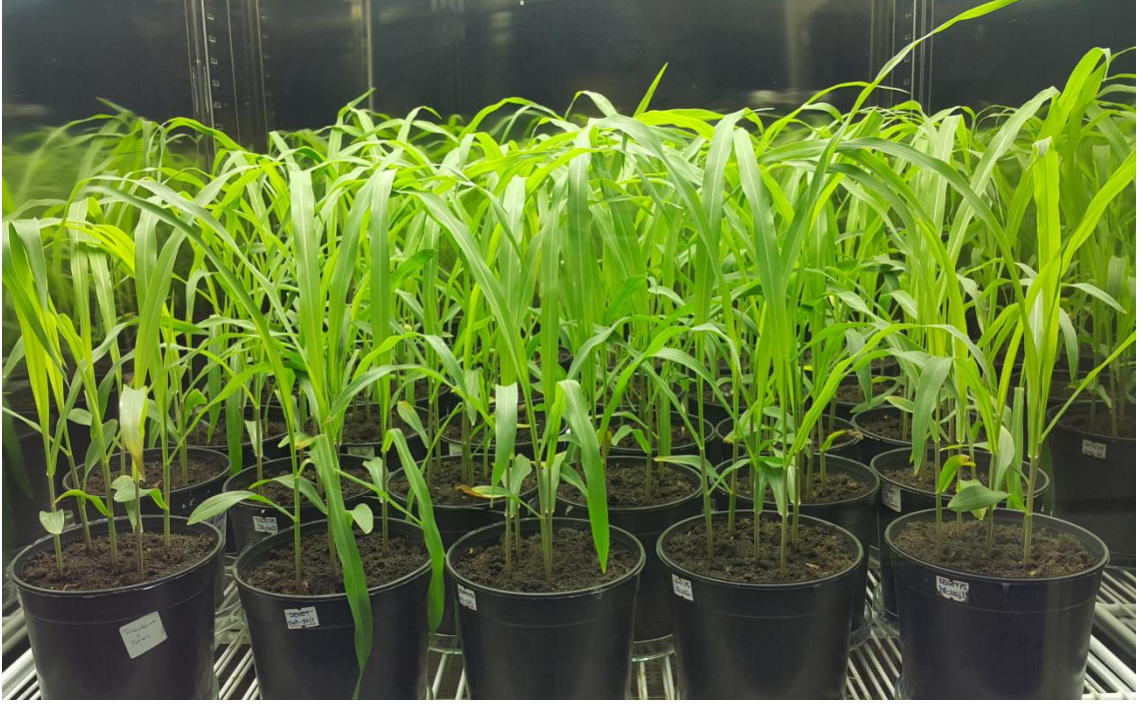
Tablo 16. Mısır gelişimi deney düzeneği.

Denekler	Açıklaması
Kontrol	Mısır
5O5Y11	Mısır - Bakteri
Kontrol Cu 50	Mısır - Cu 50 mg/kg
Cu 50-5O5Y11	Mısır - Cu 50 mg/kg - Bakteri
Kontrol-Cu- 100	Mısır - Cu- 100 mg/kg
Cu 100-5O5Y11	Mısır - Cu- 100 mg/kg - Bakteri

Saksı deneyinde çimlenmenin 10. gününde (2 yapraklı hale geldiğinde) 600 nm'de $OD_{0,530}$ olacak şekilde hazırlanmış bakteri (*Bacillus* sp. 5O5Y11) süspansiyonundan 15 mL alınıp 50 mL'ye steril distile suyla tamamlandı. Kontrol grup dışındaki saksılara, kök dibine gelecek şekilde toprağa bakteri uygulandı. Bakteri uygulamasından 7 gün sonrasında, kontrol grubu hariç diğer saksılara steril distile suda hazırlanan 50 ve 100 mg bakır solüsyonu uygulandı ve 7 gün daha saksılar inkübe edildikten sonra deney sonlandırıldı. Bu esnada mısır bitkisinin görsel değişimleri izlendi ve görüntülendi (Şekil 26).



Şekil 25. Mısır gelişimi deneyinin 7. günlerinden görüntüleri.



Şekil 26. Mısır gelişimi deneyinin 20. günlerinden görünüşleri.

Deney sonlandırıldığında öncelikle her saksıdan toprak örnekleri alındı. Bakteri kolonizasyonunun varlığını belirlemek amacıyla steril şartlarda kültürleri yapıldı. Bakteri uygulanan saksı topraklarına bakterinin kolonize olduğu, bakterinin varlığı ve canlılığı belirlendi. Ayrıca bakterisiz gruplara, bakteri kontaminasyonunun olmadığı belirlendi.

Toprak örneklerinin fiziki şartlarının homojen olup olmadığını belirlemek amacıyla nem oranı tayin edildi (Tablo 17). Toprak nem oranları birbirine yakın olduğu ve tüm saksılarda % 58-59 aralığında olduğu tespit edildi. Bu sonucun saksılarda homojen bir sulamanın olduğunu göstermektedir.

Çalışmada mısır kökleri suda yıkanarak topraktan ayrıldı ve peçete ile kurulandıktan sonra ana kök uzunluğu, saçak kök sayısı, köklerin yaş ağırlıkları tek tek ölçüldü. Kökler 24 saat 105 °C'de bekletilerek kurutuldu ve kuru ağırlıkları tartım yardımıyla hesaplandı. Tüm deneme gruplarının ortalama yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 17'de verildi. Kontrol grubunda ortalama kök kuru ağırlık 0,342 g iken bakteri kontrolünde 0,366 g şeklinde arttığı gözlemlendi (Tablo 17).

Tablo 17. Mısır gelişimi deneyinde toprak nemi ve mısır kökü yaş ve kuru ağırlıkları.

Gruplar	Toprak biyoması (10 g)		Kök biyoması (g)		
	Kuru ağırlık	% Nem	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	% Su içeriği
Konrtol 1	4,02	60	1,81	0,344	81,0
Konrtol 2	4,71	53	2,03	0,410	79,8
Konrtol 3	3,70	63	1,32	0,271	79,5
Genel ort	4,143	59	1,72	0,342	80,1
Std. Sap.	0,516		0,363	0,070	
5O5Y11 - 1	3,72	63	5,72	0,375	93,4
5O5Y11 - 2	4,79	53	5,08	0,372	92,7
5O5Y11 - 3	4,08	60	5,77	0,350	93,9
Genel ort	4,197	58	5,523	0,366	93,4
Std. Sap.	0,544		0,385	0,014	
Kontrol Cu 50- 1	3,67	64	4,5	0,31	93,1
Kontrol Cu-50 -2	4,30	57	5,96	0,39	93,5
Kontrol Cu-50-3	4,02	58	5,02	0,34	93,2
Genel ort	3,996	59	5,16	0,347	93,3
Std. Sap.	0,445		0,74	0,040	
Cu 50-5O5Y11-1	4,09	60	6,18	0,319	95,0
Cu 50-5O5Y11-2	4,19	58	6,80	0,393	94,2
Cu 50-5O5Y11-3	4,09	60	8,02	0,351	95,6
Genel ort	4,123	59	7	0,354	95,0
Std. Sap.	0,058		0,936	0,037	
Kontrol-Cu- 100	3,03		4,01	0,202	95,0
Cu 100-5O5Y11-1	3,88	61	7,61	0,560	92,6
Cu 100-5O5Y11-2	4,05	60	8,54	0,358	95,8
Cu 100-5O5Y11-3	4,48	55	7,45	0,553	92,5
Genel ort	4,137	59	7,867	0,490	93,8
Std. Sap.	0,309		0,589	0,115	

Hasat edilen mısırların kök ve gövde uzunlukları cetvel yardımıyla ölçüldükten sonra kökler bir makas yardımıyla kesilip ayrıldı. Kök kısımlarının yaş ve kuru ağırlıkları belirlendikten sonra numunelerin bakır içeriğinin belirlenmesi için 105 °C’de kurutulup öğütüldü ve stoklandı.

Kontrol grubunda ortalama gövde uzunluğu 10,77 cm, ana kök uzunluğu 32,88 cm bulunurken saçaklanma sayısı 11,67 olarak belirlenmiştir. Ortalama dört yaprak haliyle sonlandırılmış, 3. yaprak en uzun olup ortalama 33,50 cm şeklinde ölçülmüştür (Tablo 18, Şekil 26).

Bakteri (505Y11) varlığında üremelerde de ortalama 4 yaprak oluşmuş, kontrole göre daha uzun yapraklar oluşmuş, en uzun yaprak olan 3. yaprağın ortalama boyu 35 olarak tespit edilmiştir. Gövde uzunluğu 11,10 cm, ana kök uzunluğu 33,03 cm bulunurken saçaklanma sayısı 10,33 olarak belirlenmişti. Bakteri varlığında saçaklanma sayısı dışında ki tüm parametrelerde artış gözlenmiştir (Tablo 19, Şekil 26).

Tablo 18. Mısır kontrol grubunun yaprak, gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.

Parametre	1. Grup Kontrol		2. Grup Kontrol		3. Grup Kontrol		Ortalama	
	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.
1. YU	6,0	0,612	5,8	0,447	5,4	0,962	5,73	0,704
2. YU	17,3	2,820	17,7	1,565	16,3	2,683	17,10	2,324
3. YU	32,0	8,426	35,3	1,643	33,2	4,712	33,50	5,422
4. YU	26,4	4,561	23,8	4,604	22,4	9,343	24,20	6,316
GU	10,6	0,742	11,1	0,652	10,6	1,917	10,77	1,178
KU	33,2	9,418	33,6	0,894	31,7	9,808	32,83	7,333
SS	11,2	1,304	11,8	1,789	12,0	2,121	11,67	1,676

YU; Yaprak uzunluğu, GU; Gövde uzunluğu, KU; Ana kök uzunluğu, SS; Saçak sayısı, Ort. Ortalama, Std. Standart sapma.

Tablo 19. Mısır-Bakteri (505Y11) grubunun yaprak, gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.

Parametre	505Y-11		505Y-11		505Y-11		Genel	
	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.
1. YU	6,3	0,678	6,4	0,418	6,2	0,570	6,3	0,561
2. YU	16,3	4,946	18,9	0,822	17,0	3,102	17,40	3,602
3. YU	36,0	2,608	35,4	1,636	36,5	2,264	35,97	2,208
4. YU	24,6	5,499	24,9	4,722	23,2	2,971	24,23	4,503
GU	11,3	1,208	11,0	0,612	11,0	0,354	11,10	0,828
KU	36,0	6,504	31,8	7,791	31,3	5,404	33,03	6,749
SS	10,8	2,315	10,6	0,548	9,6	1,140	10,33	1,633

Çalışmada 50 mg kurşun uygulamasında yaprakların uzunluğunda 2. ve 4. Yaprak boylarının kontrole göre daha kısa kaldığı gözlenmiştir. Gövde uzunluğunda kontrole göre daha uzun olduğu, kök uzunluğunda ve saçaklanmada azalma gözlenmiştir (Tablo 20, Şekil 27).

Bakteri-Cu50 mg birlikteliğinde yaprak uzunlukları hem kontrole hem de Cu50 tek başına uygulama grubuna göre artmış olduğu gözlemlendi. Gövde uzunluğu diğer (kontrol ve Cu50) verilere göre azalmış, kök uzunluğu ise artmış (36 cm), saçaklanma

sayısında ise kontrole göre azalırken Cu50'ye göre hafif artmış olduğu belirlendi (Tablo 21, Şekil 27).



Şekil 27. Mısır - Bakteri (505Y11) grubundan hasat sonrası bir görünüm.

Tablo 20. Mısır- Cu50 mg grubunun yaprak, gövde ile ana kök uzunlukları (cm).ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.

Parametre	Kontrol Cu 50 - 1		Kontrol Cu 50 - 2		Kontrol Cu 50 - 3		Genel	
	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.
1. YU	6,4	0,224	6,2	0,447	6,3	0,274	6,30	0,316
2. YU	14,4	5,539	18,4	6,814	9,5	3,082	14,10	6,240
3. YU	35,4	2,043	36,5	1,173	33,9	1,673	35,27	1,898
4. YU	16,4	9,390	27,9	3,267	23,9	4,422	22,73	7,627
GU	11,3	0,671	12,1	0,548	11,3	0,758	11,57	0,729
KU	34,0	4,000	30,4	6,465	33,1	1,140	32,50	4,404
SS	10,8	0,837	10,6	1,673	10,6	1,673	10,67	1,345

Tablo 21. Mısır-Bakteri- Cu50 mg grubunun yaprak, gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.

Parametre	Cu 50-505Y11-1		Cu 50-505Y11-2		Cu 50-505Y11-3		Genel	
	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.
1. YU	6,5	0,866	6,0	0	6,0	0	6,17	0,523
2. YU	19,0	1,581	18,2	0,837	17,8	1,095	18,33	1,234
3. YU	36,6	2,074	35,6	1,517	35,4	2,302	35,87	1,922
4. YU	21,8	6,058	25,0	4,743	24,6	2,702	23,80	4,601
GU	9,8	1,304	9,2	0,447	9,6	1,342	9,53	1,060
KU	37,2	3,194	36,4	4,980	34,8	3,114	36,13	3,720
SS	10,8	0,837	10,8	0,837	11,0	1,732	10,87	1,125



Şekil 28. Yukarıdan aşağıya doğru Cu50, Cu50-Bakteri, Cu100 ve Cu100-Bakteri gruplarının hasat sonrası görünüşleri.

Cu100 bakteri birlikteliğine bakıldığında kontrole tüm göre verilerde azalma olduğu, diğer gruplarla kıyaslandığında ise saçaklanma dışında tüm verilerde bariz bir azalmanın var olduğu gözlenmiştir (Tablo 22, Şekil 27).

Tablo 22. Mısır-Bakteri-Cu100 mg grubunun yaprak, gövde ile ana kök uzunlukları (cm) ve saçaklanma sayısı (n) ortalama değerleri.

Parametre	Cu100-505Y11-1		Cu100-505Y11-2		Cu100-505Y11-3		Genel		Cu 100	
	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.	Ort.	Std.
1. YU	6,4	0,548	6,2	0,447	6,7	0,908	6,43	0,651	6,0	0
2. YU	17,0	4,637	17,2	4,604	18,8	1,924	17,67	3,735	17,2	0,837
3. YU	36,8	1,304	36,6	2,191	35,4	0,894	36,27	1,580	31,6	2,074
4. YU	24,8	2,387	24,4	2,881	26,0	4,743	25,07	3,305	15,4	9,762
GU	9,4	0,548	9,2	0,447	11,8	1,095	10,13	1,407	9,0	0,707
KU	33,2	3,033	35,6	4,722	33,2	4,604	34,00	4,053	31,0	7,517
SS	10,8	1,789	10,2	0,447	11,4	1,342	10,80	1,320	11,0	2,345

YU.; Yaprak uzunluğu, GU.; Gövde uzunluğu, KU; Ana kök uzunluğu, SS; Saçak sayısı

Kontrole göre yaprakta gözlenen veriler bakıldığında bakır tekbaşına varlığında yaprak uzunluğunun azalttığı, bakteri birlikteliğinde ise arttırdığı gözlemlendi. Gövde uzunluğuna bakıldığında bakteri ve 50 mg bakır kontrollerinde uzunluğu arttırdığı, diğer parametrelerde ise azadığı gözlenmektedir. Kök uzunluğuna bakıldığında kontrole göre bakır konsantrasyonunu artışına paralel uzunluğun azaldığı, bakteri varlığında ise arttığı gözlenmektedir. Saçaklanma sayısında ise kontrole göre tüm parametrelerde azalmanın olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara bakıldığında bakterinin bitki gelişimini metal varlığında olumlu yönde etkilediği söylenebilmektedir.

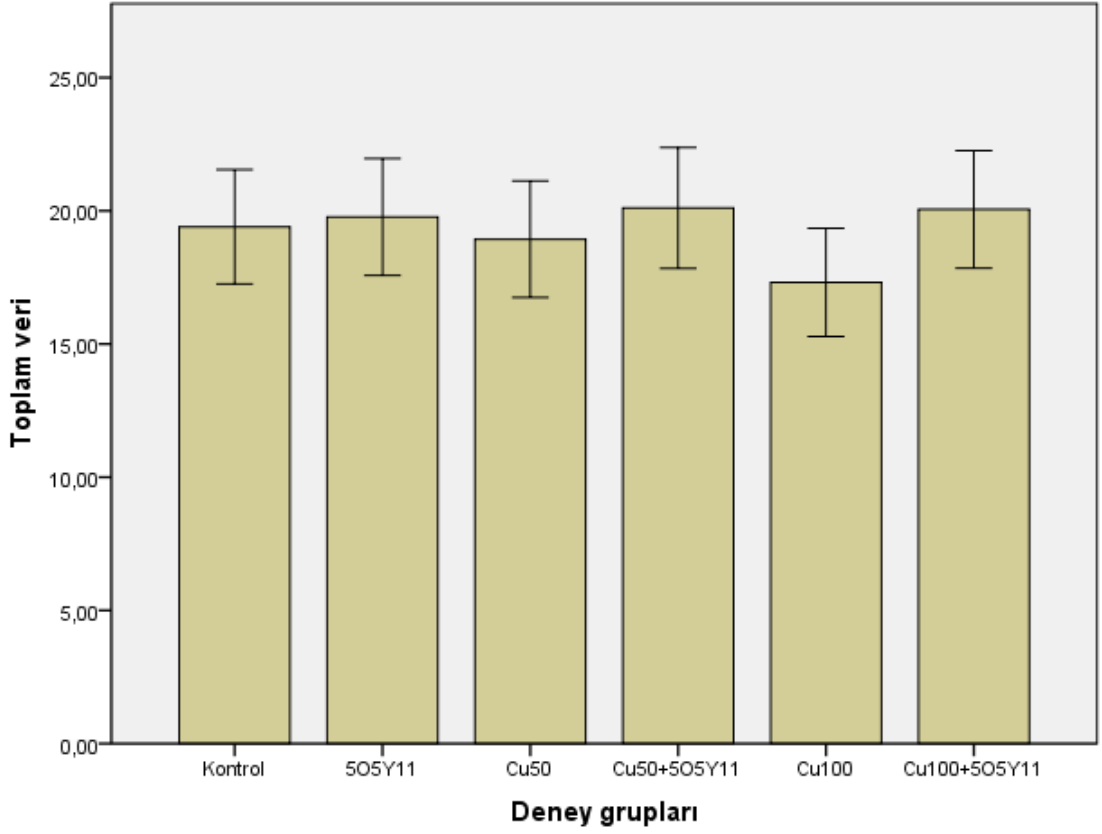
Bakır yönünden kontrol grubu ile diğer faktörler istatistiksel (ANOVA) olarak karşılaştırıldığında tüm test edilen özellikler açısından hepsinde $p < 0,01$ seviyesinde önemli farklılıkların var olduğu belirlendi. Bu değerlerde yapılan korelasyon analizi Tablo 23’de verilmiştir.

Toplam gruplar arasında bakır varlığında ve yokluğunda mısır bitkisi gelişimi üzerine olan total etkinliğine bakıldığı zaman kontrol (19,4000) grubuna göre bakır 50 (18,9333) ve 100 mg (17,3143) kontrollerinde azalma olduğu, bakteri kontrolünde (19,7667) ise kontrole göre artma olduğu gözlemlendi (Şekil 28). Bakteri bakır

birlikteliğinde ise her iki (50 ve 100 mg) konsantrasyonlarda kontrole göre arttırdığı gözlemlendi ($p < 0.01$).

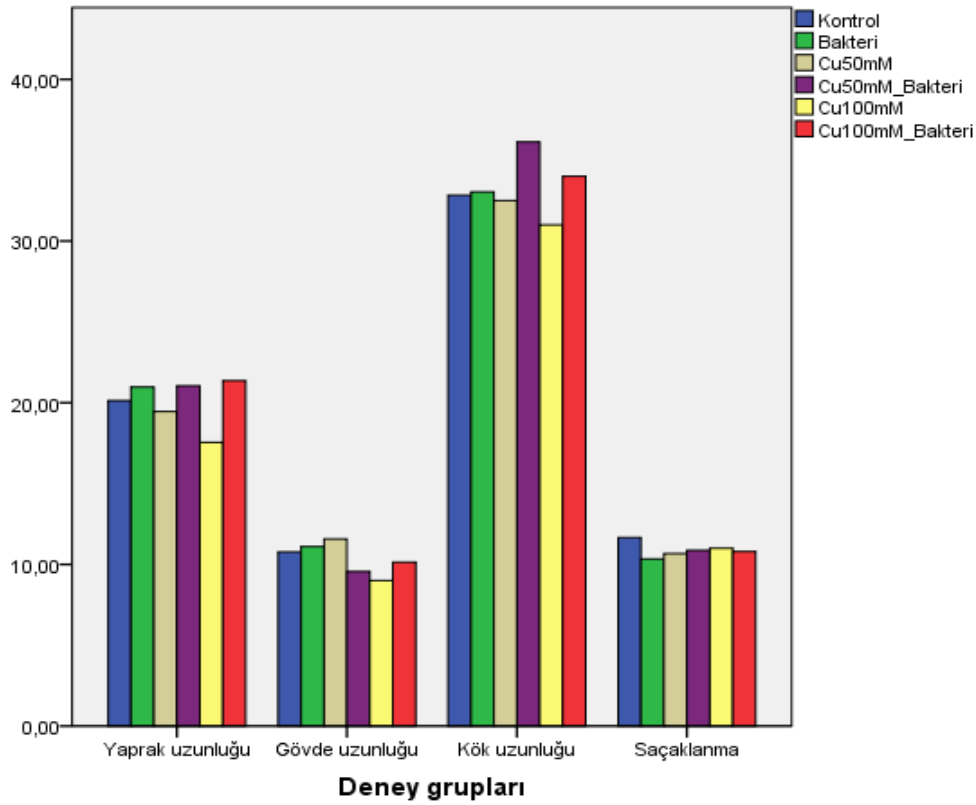
Tablo 23. Mısır gelişimi deneyinde gruplar arasındaki korelasyon ilişkisi.

		Kont- rol	Bakteri Mısır	Cu50 Mısır	Cu100 Mısır	Cu50Bakteri Mısır	Cu100 Bakteri Mısır
Kontrol	Pearson Correlation	1	,902**	,859**	,805**	,905**	,887**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,000
	N	96	96	96	32	96	96
Bakteri Mısır	Pearson Correlation		1	,902**	,855**	,932**	,915**
	Sig. (2-tailed)			,000	,000	,000	,000
	N		96	96	32	96	96
Cu50 Mısır	Pearson Correlation			1	,904**	,893**	,897**
	Sig. (2-tailed)				,000	,000	,000
	N			96	32	96	96
Cu100 Mısır	Pearson Correlation				1	,906**	,844**
	Sig. (2-tailed)					,000	,000
	N				32	32	32
Cu50 Bakteri Mısır	Pearson Correlation					1	,955**
	Sig. (2-tailed)						,000
	N					96	96
Cu100 Bakteri Mısır	Pearson Correlation						1
	Sig. (2-tailed)						
	N						96



Şekil 29. Mısır gelişimi deneyinde, bakır varlığında ve yokluğunda toplam veri analizinin grafikleri.

Grupların veri parametrelerini kendi içinde karşılaştırdığımızda ise genel veriye benzer ilişki olduğu gözlemlendi. Buna göre parametreler arasında kontrole göre 50 mg bakır varlığında gelişimin bir miktar etkilenmediği, 100 mg bakır varlığında daha da düştüğü, bakteri varlığında ise bu verilerin olumlu yönde artış gösterdiği belirlendi.



Şekil 30. Mısır gelişimi deneyinde, bakır varlığında ve yokluğunda tüm grupların toplam veri analizlerine göre oluşturulan grafikleri.

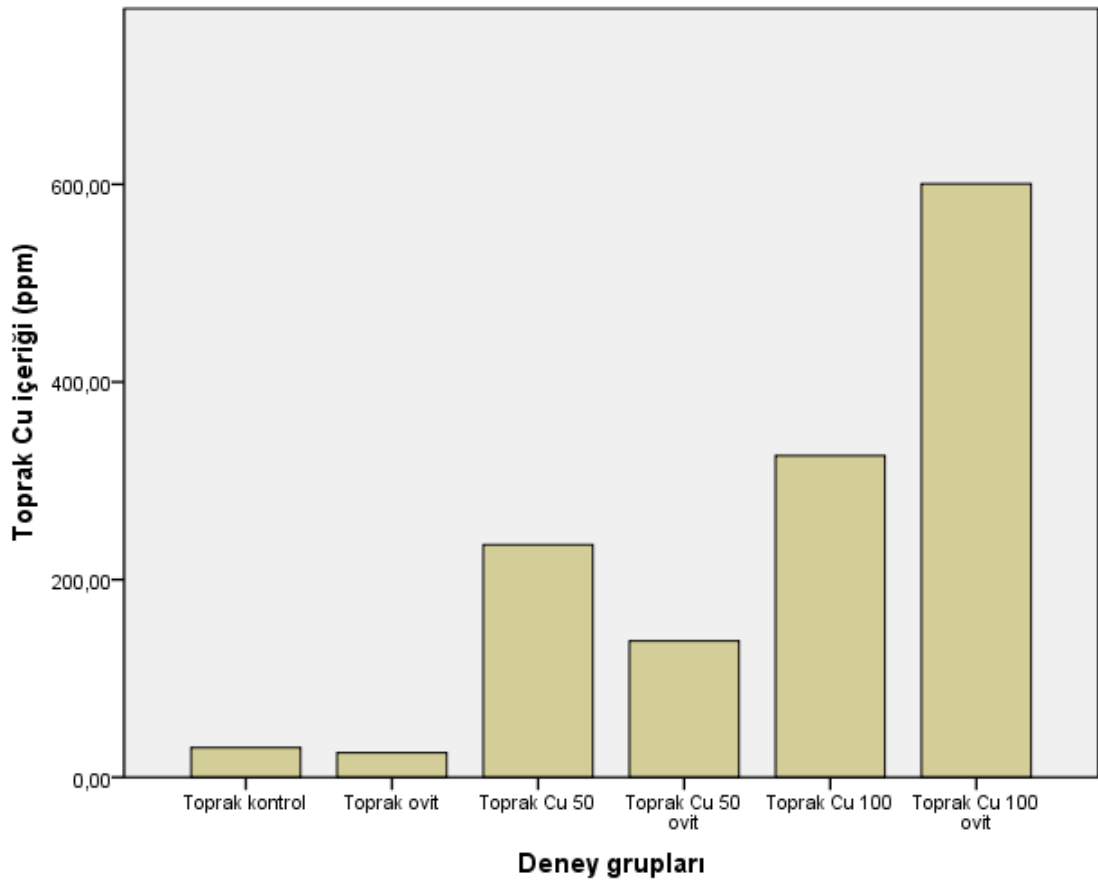
3.7. Mısır ve Bakteri İçeriklerinde Bakır Miktarlarının Analizi

Çalışmada saksı düzeneği gruplarında üretilen mısır bitkisinin bakır uygulaması sonucu toprakta bakırın tespiti, yapraklarına ve gövdesine alınan bakırın bakteri varlığında ve yokluğunda ne miktarda olduğunu belirlenmesi amacıyla yapılan numuneler yaş yakma yöntemi kullanılarak mikrodalgada yapıldı ve atomik absorpsiyon cihazında ölçümleri alındı. Ölçümler 3 tekrarlı yapılmış olup, veriler SPSS 21 istatistik programında değerlendirildi.

Çalışmada toprakta Cu varlığı varyans analizine göre incelendiğinde gruplar arasında anlamlı ($p < 0.05$) fark olduğu, bakteri varlığında kontrolden daha az bakır içerdiği gözlemlendi (Tablo 24, Şekil 31). Topraktaki bakır miktarı konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı belirlendi.

Tablo 24. Mısır gelişimi deneyinde toprak bakır miktarı konsantrasyon değerleri.

	N	Ort.	Std. Sap.	Std. Hata	95 % ort. güven aralığı		Min.	Max.
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Toprak kontrol	3	30,1099	13,57362	7,83674	-3,6088	63,8287	20,67	45,66
Toprak ovit	3	24,7767	4,47305	2,58252	13,6650	35,8883	21,33	29,83
Toprak Cu50	3	235,4350	30,57547	17,65276	159,4813	311,3887	200,16	254,32
Toprak Cu50 ovit	3	137,9389	37,69551	21,76351	44,2980	231,5797	102,66	177,66
Toprak Cu100	3	325,4265	3,19217	1,84300	317,4967	333,3563	322,82	328,99
Toprak Cu100 ovit	3	600,5730	285,60413	164,89362	-108,9070	1310,0530	271,32	781,48
TOPLAM	18	225,7100	227,38574	53,59533	112,6337	338,7863	20,67	781,48



Şekil 31. Mısır gelişimi deneyinde topraktaki bakır miktarlarının değerleri.

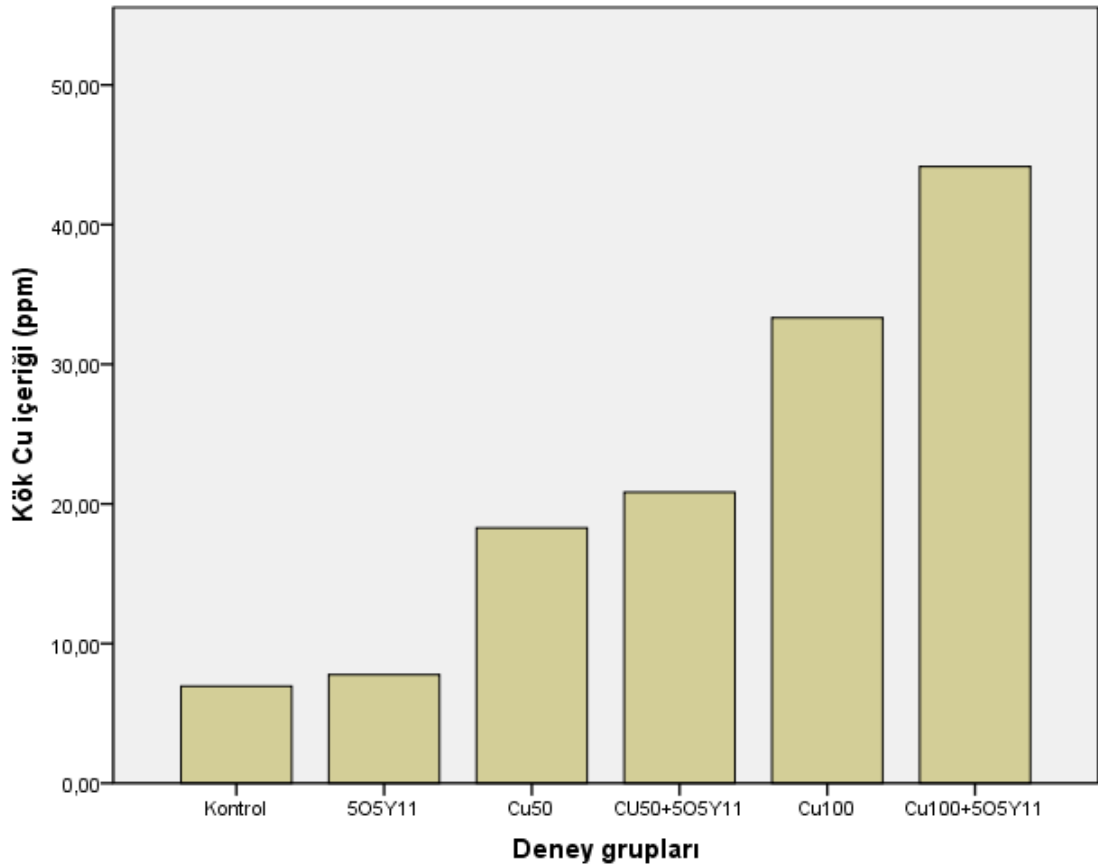
Bacillus sp. 5O5Y11 suşunun topraktaki bakır miktarını kontrolüne göre azaltmıştır. Bakır ilavesi arttıkça deney gruplarında bakır miktarı yüksek belirlenmiştir. Deney grubu olarak 50 mg bakır konsantrasyonuna bakıldığında bakteri varlığında kontrolüne göre aynı şekilde topraktaki bakır miktarını azaltmıştır. Deney grubunun 100 mg'da ise bakteri varlığında ortamda bakır miktarının daha fazla olduğu, kontrolüne göre azalmış

olduğunu, dolayısıyla topraktaki bakır miktarı daha fazla olarak ölçüldüğü düşünülmektedir.

Saksı deneyinde mısır bitkisinin bakteri varlığında ve yokluğunda bakır absorpsiyonunun incelenmesi açısından yapılan çalışmada, köklerdeki varyans analizi sonucunda anlamlı bir farklılığın ($p<0,05$) var olduğu gözlemlendi (Tablo 25, Şekil 32).

Tablo 25. Mısır köklerindeki bakır miktar ortalamaları ve standart sapma değerleri.

	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	95% Ort.Güven Aralığı		Min.	Max.
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Kök kontrol	3	6,9442	1,68593	,97337	2,7561	11,1322	5,00	8,00
Kök ovit	3	7,7773	2,50186	1,44445	1,5624	13,9923	5,33	10,33
Kök bakır 50	3	18,2769	5,07248	2,92860	5,6762	30,8776	14,33	24,00
Kök bakır 50 ovit	3	20,8323	,44074	,25446	19,7374	21,9271	20,50	21,33
Kök bakır 100	3	33,3352	1,09766	,63373	30,6085	36,0619	32,17	34,34
Kök bakır 100 ovit	3	44,9426	23,45726	13,54305	-13,3284	103,2137	22,33	69,16
Total	18	22,0181	16,21557	3,82205	13,9543	30,0819	5,00	69,16



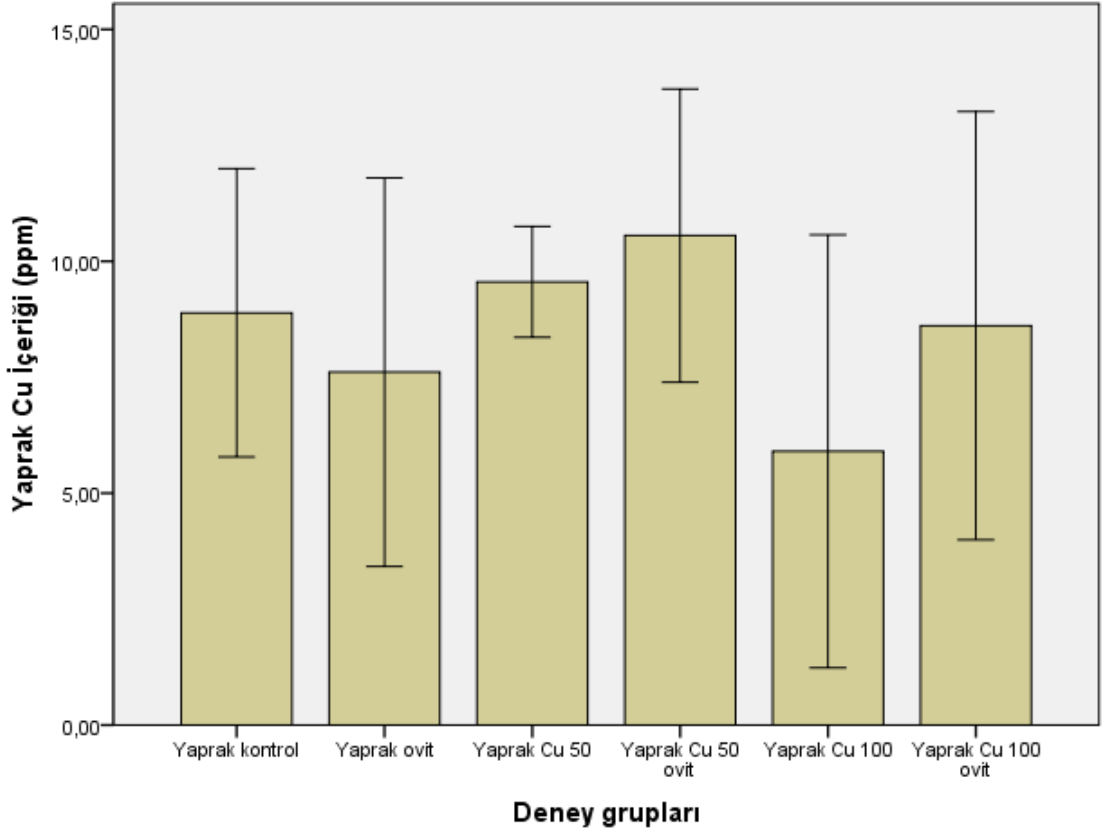
Şekil 32. Mısır gelişimi deneyindeki köklerin bakır miktarlarının değerlendirilmesi.

Genel olarak bakıldığında ortamdaki bakır miktarı arttıkça kökteki birikimin arttığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 mg'lık bakır kontrolün varlığındaki birikimin 50 mg'lık bakır varlığındaki birikime göre daha fazla olduğu gözlemlendi. Bakteri varlığında ise kökteki bakır absorpsiyonunun konsantrasyon arttıkça bakır birikiminin köklerde arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 25, Şekil 32).

Yaprakta en yüksek bakır absorpsiyonu 50 mg bakır ve bakteri varlığında gözlemlendi. En düşük absorpsiyon ise 100 mg bakır kontrol grubunda belirlendi. Bakteri varlığında absorpsiyonun genel olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 26, Şekil 33).

Tablo 26. Mısır yapraklarındaki bakır miktarı konsantrasyon değerleri.

	N	Ort.	Std. Sap.	Std. Hata	95 % Ort. güven Aralığı		Min.	Max.
					Alt Sınır	Üst Sınır		
Yaprak kontrol	3	8,8883	1,25112	0,72233	5,7804	11,9963	8,17	10,33
Yaprak ovit	3	7,6106	1,68616	0,97351	3,4220	11,7993	5,67	8,67
Yaprak Cu 50	3	9,5552	,48116	0,27780	8,3599	10,7505	9,00	9,83
Yaprak Cu 50 ovit	3	10,5551	1,27280	0,73485	7,3933	13,7169	9,17	11,67
Yaprak Cu 100	3	5,9049	1,87933	1,08503	1,2364	10,5734	3,83	7,50
YaprakCu 100 ovit	3	8,6107	1,85835	1,07292	3,9943	13,2271	6,50	10,00
Total	18	8,5208	1,96377	0,46287	7,5442	9,4974	3,83	11,67



Şekil 33. Mısır çimlenme deneyinde tüm gruplarda yapraklardaki Cu değerleri grafiği.

Saksı deneyinde mısır bitkisinin bakteri varlığında ve yokluğunda bakır absorpsiyonunun incelenmesi açısından yapılan çalışmada yapraklardaki absorpsiyonun varyans analizine göre anlamlı olduğu ($p < 0.05$) gözlemlendi. Kontrol grubunda bakır absorpsiyonu, yalnızca bakteri içeren grupla karşılaştırıldığında miktarın düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuç 5O5Y11 suşunun mısır bitkisinin yaprakta bakır birikimini azalttığı veya bakırı kendi içinde absorbe ettiğini ve kökte bakteri ile birlikte kaldığını düşündürmektedir.

Bakırın 50 mg verildiği gruba bakıldığında yaprakta bakır içeriği bir miktar arttığı, 100 mg bakırlı ortamda ise yapraktaki bakır miktarı kontrolüne göre yüksek olmasına rağmen diğer tüm gruplara göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bakteri varlığında kontrol grupta yaprak bakır miktarını azalttığı, 50 ve 100 mg bakır varlığında ise yaprak bakır miktarını arttırdığı belirlendi. Artış 50 mg da daha yüksek olarak tespit edildi genel olarak bakterinin bakır absorpsiyonunu arttırdığı, ancak 50 mg bakır varlığında absorpsiyonun daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bunun nedeni metal toksisitenin arttığında absorpsiyonun azalmış olabileceği şeklinde düşünülmektedir.

Mısır bitkisi için 50 mg bakırın toksik etki göstermediği, yaprakta yüksek konsantrasyonlarda gözlendiği, 100 mg'ın ise toksik etki gösterdiğinden dolayı yaprağa taşınmadığı, bakteri varlığında ise bakır bakteri tarafından absorbe edilip bitkinin kullanabileceği düzeye düşürdüğü düşünülmektedir.

3.8. Bakteri Deneyinde Bakırın Atomik Absorbsiyon Analizi Sonuçları

Çalışmanın bu aşamasında bakterinin ortamdaki Cu'ı ne kadar aldığını belirlemek için yeni bir deney dizayn edildi. Bu amaçla 5O5Y11 suşu, 2,5 mM Cu içeren ve pH 7.0'ye ayarlanmış BHIB besiyerinde 36 °C'de 120 rpm'de 72 saat büyük hacimlerde kültür yapıldı (Tablo 27, Şekil 34). Kültürler inkübasyondan sonra 10 g'de santrifüj ile çöktürüldü. Sedim ve süpernatant kısım ayrılarak atomik absorbsiyon analizi için stoklandı.

Çalışmada Cu ilaveli ve ilavesiz sıvı (BHI besiyeri) ortamda 5O5Y11 suşunun kültürü yapıldığında; kontrol grupta besiyerinin içinde bulunan minimal miktarda bakır varlığından dolayı hem sıvı hem de pellette bakır varlığı düşük olsada gözlenmiştir. Kontrol grubunda *Bacillus sp.* 5O5Y11 suşu besi ortamındaki bakırı kullanmak amacıyla ya da sadece absorbsiyon nedeniyle bünyesine almış olduğu, dolayısıyla pellette ki bakır miktarı daha yüksek gözlendiği belirlenmiştir.

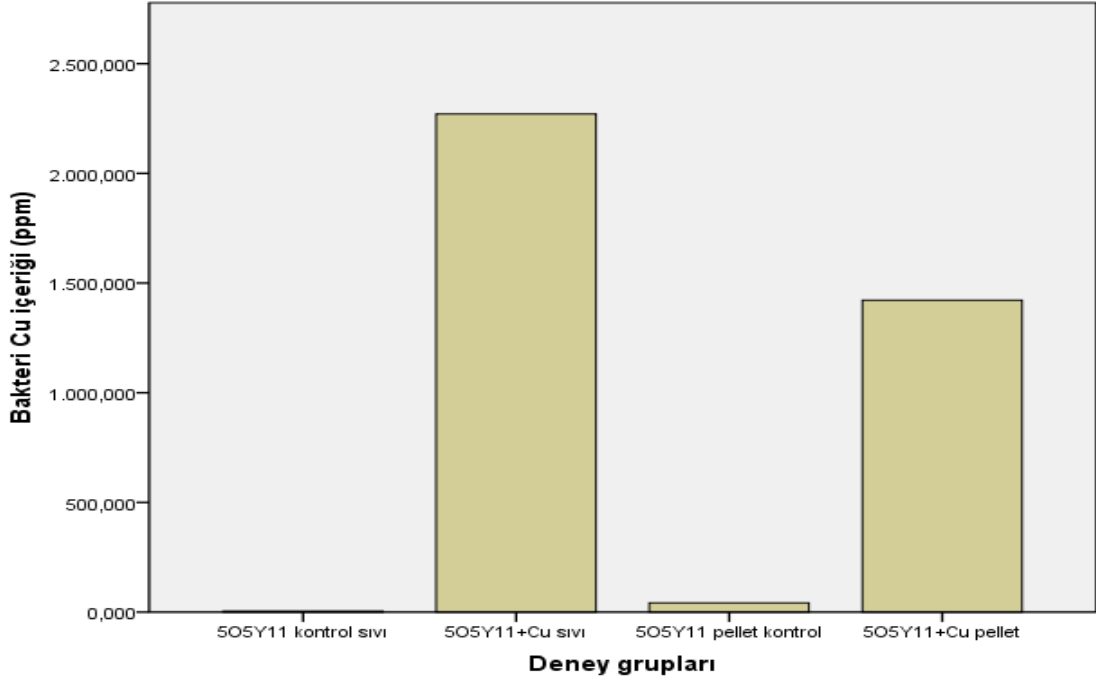
Tablo 27. 5O5Y11'in sıvı ortamda bakır bağlama/indirgeme kapasitesi ve atomik absorbsiyon ölçüm ortalama değerleri.

	N	Ort.	Std. Sap.	Std. Hata	95 % Ort. Güven Aralığı		Min.	Max.
					Alt Sınır	Üst Sınır		
5O5Y11 sıvı	3	4,499	,928	,536	2,195	6,804	3,667	5,500
5O5Y11-Cu sıvı	3	2270,415	442,293	255,358	1171,697	3369,131	1921,13	2767,74
Cu sıvı	3	353,061	33,747	19,484	269,228	436,891	325,61	390,74
5O5Y11 pellet	3	42,099	8,472	4,892	21,054	63,144	36,165	51,801
5O5Y11-Cu pellet	3	1421,859	929,197	536,472	-886,393	3730,112	716,35	2474,68
Total	15	818,386	999,388	258,040	264,944	1371,829	3,667	2767,74

Sıvı; Kültürden sonraki süpernatant kısım, Pellet; Çöken sedim (Bakteri) kısmı

Besiyeri ortamına 2 mM bakır ilave edildiğinde sıvı ortamındaki bakır miktarı ile pelletin bakır miktarı arasında doğru orantılı olarak bakır artışı gözlenmektedir. Bu

sonuç bakterinin ortamdaki bakır konsantrasyonunun artmasıyla bakır bağlama ya da adsorblama kapasitesinin de önemli ölçüde arttığını göstermektedir.



Şekil 34. Bakteri kültürlerinde bakır miktarlarının ISPO ölçüm değeriendirmeş.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Bakterilerin Tanımlanması

Bu çalışma, Ovit yaylasından Ekim 2013 - Mayıs 2014 tarihleri arasında alınan 5 orkide yumrusu toprağından, alınan toplam 20 adet Gram pozitif bakteri ile yapılmıştır (Tablo 9). Örnekler geleneksel yöntemlere göre Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler ve Weiss, 1986) ve The Prokaryotes (Slepecky ve Hemphill, 2006) kaynaklarından yararlanarak karakterize edildi. Örneklerin tümü katalaz üretimi ve Gram özelliğı pozitif bakteri olduğı, oksijen gereksinimine göre aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri oldukları gözlemlendi (Tablo 6). Tüm bu özellikler toprak florasında bulunan gram pozitif bakterilerin genel özellikleri olduğı ve suşlarımızın *Bacillus* cinsine ait bakteriler olduğunu göstermektedir (Coneman vd., 1997).

Bakterilerin karakterizasyonu ve tür tanımlarının yapılabilmesi için biyokimyasal özelliklerine bakıldı. İzole edilen suşların birinde güçlü sitrataz, 2'sinde güçlü üreaz, 3'ünde amilaz, çoğunda güçlü lesitinaz ve jelatinaz enzimlerini üretme aktiviteleri belirlendi (Tablo 7). İzolatların çoğunda bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğı kazandıran triptofanaz, katalaz (hidrojenperosid oksidoredüktase), nitratları redükte edebilme yeteneğini veren nitrojenaz ile glikozun fermentatif yolla organik asitlere metabolize edebilen enzim aktivitelerine sahip oldukları belirlendi. Jelatini hidrolize eden jelatinaz sentez yeteneğı, bakterinin ekstrasellüler protein karakterinde bir madde olan jelatini iki aşamada (önce polipeptide sonra aminoasitlere) parçalamasını sağlar. Lesitinaz ve fosfolipaz enzimleri lipoprotein komplekslerini hidrolize edilebilme yeteneğini kazandırır. Ürenin hidrolizasyonu da spesifik bir enzim olan üreaz tarafından katalize edilerek sonunda 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana getirilir. Sitritaz (sitrat oksalasetat-liyaz) veya sitrat demolaz enzimi aracılığıyla ortamdaki sitratı parçalayarak piruvat oluşturur (Coneman vd., 1997). Dolayısıyla bu enzim aktivitelerinin varlığı bakterinin çevre koşullarında daha kolay yaşamasını sağlar.

Yapılan çalışmaların çoğunda *Bacillus* izolasyonu topraktan, besinsel kaynaklardan ya da bitkisel kaynaklardan elde edilmiştir. Çeşitli sebeplerden dolayı

fungusitlerin kullanımının istenmeyen sonuçlar doğurması ve ekonomik olmaması sebebi ile de alternatif arayışlarına başlanmıştır. Bundan dolayı da biyolojik kontrol cazip bir duruma gelmiştir. Biyolojik kontrolde *Bacillus* genusu bakteriler üzerine dikkatleri yoğunlaştırmıştır. *Bacillus* türlerinin biyolojik kontrol ajanı olarak cazip olmasının sebepleri, toprakta bol miktarda bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formlarını oluşturma yetenekleri olarak rapor edilmiştir (Silo Suh vd., 1994).

İzole edilen bakterilerin farklı fiziksel koşullarda hayatını idame ettirebilme yeteneklerinin belirlenmesi için bir dizi fiziksel özellikleri test edildi (Tablo 8). Bu testlerden NaCl testi bakterilerin ortam tuzluluğuna olan toleransları için incelenmiş ve suşların % 10 tuz varlığında 3 suş (5O6, 5O5Y2 ve 5O5Y13) hariç çoğunun (% 85) üreme yeteneğine sahip oldukları, 5O5Y12 izolatının ise çok iyi ürettiği belirlendi. Ortamda % 15 tuz varlığında ise 10 (% 50) suşun ürettiği, bunlardan 3'ü zayıf, 4'ü iyi üreyebildiği ancak üç suşun (5O8, 5O5Y10 ve 5O5Y11) ise çok iyi ürettiği gözlemlendi. Bu sonuçlar göstermektedir ki özellikle 5O8, 5O5Y10 ve 5O5Y11 nolu suşların tuzlu topraklarda rahatlıkla üreyebileceği ve ortama adapte olabileceği gözlenmektedir. Halofilik ortamda üreyebilen bu bakteriler tuz konsantrasyonunun yoğun olduğu toprakların biyoremediasyonunda başarılı olarak kullanılacakları düşünülmektedir.

İzolatlarımızın büyük çoğunluğu 10 ile 45 °C iyi üreyebilmekte, farklı sıcaklıklarda üreme yetenekleri incelendiğinde ise 4 izolat hariç tümünün geniş bir sıcaklık aralığında üreyebildiği gözlenmektedir. Özellikle 146 ve 5O5Y11 nolu izolatların hem 10 hem de 45 °C sıcaklıklarda çok iyi üreme göstermesi önemli bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda bakterilerin rahat üreyebilmeleri, ekosistemdeki farklı sıcaklıklara kolaylıkla adapte olmalarını ve rahat üreyip çoğalmalarını sağlamaktadır. Genellikle toprak izolatlarında bu özelliğin var olduğu, bakteriye ekolojik koşullarda yaşama şansı kazandırdığı bilinmektedir.

Çalışmamızda bir suş (144) dışında tümünün pH 4.5 ile 8.5 aralığındakiyi, bazı suşların ise çok daha iyi (5O7, 112O1, 1412, 5O5Y12, 142, 5O5Y1 ve 5O5Y13) üreme yeteneklerine sahip oldukları gözlemlendi (Tablo 8). Sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörler; mikrobiyal aktivite üzerine, hedef kimyasalların biyo yararlılımları üzerine olduğu

kadar (Benimeli vd., 2007), onların optimizasyonunda da güçlü etkinliklere sahiptirler ve de kirleticilerin detoksifikasyon maddelerinin elde edilmesi için de zorunludur. pH'nın ve sıcaklığın gelişimi üzerine etkileri laboratuvar ortamından ziyade doğal şartlarda ki toprak ekosisteminde üremeleri üzerine daha etkilidir. Geniş pH aralığında üreyebilen suşların farklı pH'ya sahip ekosistemlere adaptasyonu mümkün klacağı için biyoremediasyonda tercih edilebilirliği arttıran bir özelliktir.

Ağır metallerin biyosorpsiyon üzerine ilk çalışmalar göstermiştir ki pH, biyosorpsiyon işlemlerinde etkili olan önemli faktörlerden biridir. Metal katyonlarla elektronca zengin fonksiyonel grupların biyomasta yer alan etkileşimi, çevrenin pH değerinden güçlü bir şekilde etkilenebilmektedir. Adsorbsiyon besiyerinin pH'sı, adsorbantın hücre duvarı üzerine fonksiyonel grupların iyonizasyon durumuna ve metal iyonlarının çözünürlüğüne etkilidir. Yüksek proton konsantrasyonlarından dolayı aşırı asidik koşullarda, hücre duvarı fonksiyonel grupları protonlar ile yakından ilişkilidir ve bağlanma bölgesinde artan pozitif şarj yoğunluğunun bir sonucu olarak metal iyonlarının yaklaşımı kısıtlanır.

Hafez vd., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* duvar yüzeyi pH 2.0'de negatif elektrostatik yüklü olduğu, hücre duvarı yüzeyi pH 4.5 ve 6.5 aralığında metal iyonlarının pozitif yüklü olanları adsorbe ettiği bildirilmiştir. Böylesi çalışmalar, metallerin uzaklaştırılmasında başlıca mekanizmanın, *Bacillus licheniformis*'de olduğu gibi hücre duvarındaki iyonların adsorbsiyon yeteneği olduğunu göstermektedir.

Çalışmada izole edilen sporlu bakterilerin geleneksel yöntemlere göre tür tanıları yapıldı ve tür dağılımları Tablo 9 ve 10'da verilmiştir. Toplam 20 izolattan 9'u yalnızca cins düzeyinde tanımlanırken 7 farklı tür belirlendi. İzolatların 4'ü *B. mycooides*, 2'si *B. insolitus*, birer adet *B. globisporus*, *B.thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis* ve *B. marinus* olarak tanımlandı. Belirlenen izolatların tümünün beklendiği gibi The Prokaryotes kaynağına göre toprak kökenli bakteriler olduğu gözlemlendi (Slepecky ve Hemphill, 2006).

Bitki gelişimini teşvik eden, bakır toleransı yüksek ve bundan sonraki aşamalarda kullanılması düşünülen üç izolatin (5O1, 5O9 ve 5O5Y11) moleküler (16S rRNA sekans analizi) yöntemler kullanılarak tür tanımlarının doğrulanması hedeflendi. Ancak 5O1 izolatu *B. mycooides* ve 5O9 izolatu *B. thuringiensis* olarak doğrulanırken, 5O5Y11 izolatu *Bacillus* sp. şeklinde türü moleküler yöntemlerde belirlenemedi (Tablo 9 ve 10).

Bazı aerobik spor oluşturan bakterilerin biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılmaları için iyi bir aday oldukları ve birçok avantajlara sahip oldukları bilinmektedir. İlk olarak, bu bakterilerin bir böcek öldürücü ve antimikrobiyal bileşiklerin birkaç farklı türünü üretebilirler. İkincisi olarak konak bitkinin büyüme ve savunma yanıtına neden olurlar. Ayrıca, *Bacillus* türlerinin spor üretebilir olmaları nedeniyle olumsuz çevresel koşullarına direnmeye, kolay formülasyon ve ticari ürünler (Schallmey vd., 2004; Francis vd., 2010) geliştirmeye ve de depolamaya elverişli mikroorganizmalardır. *Bacillus* üyeleri mikrobiyal pestisitler, fungusitler ya da gübreler oluşturabilmeleri açısından yararlı bakteriler arasında yer alırlar. *Bacillus* tabanlı ürünler bitki sağlığı için mikrobiyal ürünlerin en önemli sınıfını temsil ederler ve piyasada kullanları yaygın olarak mevcuttur (Jacobsen vd., 2004; Frave, 2005).

4.2. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özellikler

Çalışmada izole ve identifiye edilen suşların bitki gelişimini teşvik eden bakteri (PGPR) olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla siderofor ile amonyum üretimleri, fosfat çözünürlüğü ve ACC deaminaz aktiviteleri araştırıldı (Tablo 11).

Mikroorganizmalar, pek çok bitki ve bazı yüksek organizmalarını yeterli beslenebilmeleri için gerekli olan demiri karşılamak için siderofor, (demir taşıyıcı) adı verilen düşük molekül ağırlıklı demir şelatörleri üretirler (Neilands, 1995). Bu amaçla bakteriler, siderofor üretim yeteneklerinin belirlenmesi için Chrome azurol-S (CAS) agar metodu ile test edildi. *Bacillus* sp.1412 suşu hariç tümünde siderofor üretimi belirlendi. İzolatların 2'inde düşük (<10), 10'nunda orta (10-20 mm) düzeyde ve 7'inde güçlü siderofor üretimi (≥ 20) yeteneği tespit edildi. En yüksek aktivite sırasıyla *B. mycooides* 5O6, *B. globisporus* 5O5Y13 ve *Bacillus* sp.112O1 suşlarında (sırasıyla 48,

45 ve 43 mm) gözlemlendi (Şekil 2). Toprak mikroorganizmaları tarafından üretilen enzim olan ACC deaminaz, bitki gelişimini teşvik yoluyla bitkinin ürettiği ACC'nin parçalanmasını ve ayrılmasını sağlar. Böylece bitki etilen oranı büyük ölçüde düşürülür. Etilen seviyesinin azalması bitkinin çok çeşitli çevre streslerine karşı daha dayanıklı olmasını sağlar (Glick, 2005).

Toprakta fosfor, genel olarak fazla miktarda (400 – 1200 mg/kg) olmasına rağmen çözünmeyen formda olmasından dolayı bitki gelişimini desteklememektedir. Bu çözünmeyen fosfat hem apatite gibi inorganik mineral olarak hem de inozitol fosfat, fosfomonesterler ve fosfotriesterler gibi çeşitli organik formlardan biri olarak mevcuttur (Khan vd., 2007). Bu nedenle toprakta fosfat çözebilen bakterilerin varlığı, bitki gelişimini teşvik eden mantarlar veya mikorizalar kadar önemlidir (Rodríguez ve Fraga, 1999; Richardson, 2001). Çalışmamızda test edilen suşların % 30'unun (6'sı) 8 ile 14 mm aralığında zon çapı oluşturarak fosfat çözebildiği gözlemlendi. En güçlü aktivite *Bacillus* sp. 112O3 (14 mm) ve *B. mycooides* 144 (12 mm) suşlarında gözlemlenmiş olup diğer suşlarda benzer (8-9 mm zon) olarak (141, 142, 5O5Y10 ve 112O1 suşlar) aktivite gözlemlenmiştir (Tablo 11, Şekil 3).

Kirkby ve Mengel, (1967) bitkiler tarafından alınabilen, bitki gelişimini destekleyici en iyi ve tek azot kaynağının amonyum veya nitrat olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla yapılan amonyum üretim testine göre tüm suşlarda amonyum üretimi varlığı saptanırken, özellikle 6 suşta oldukça güçlü (3+) aktivite var olduğu belirlenmiştir (Tablo 11 ve Şekil 4).

Bitki hormonu olan etilen, antik çağlardan beri tarımsal uygulamada önemli bir role sahiptir. Etilen biyolojik aktivitesi olan basit organik moleküllerden biridir ve çok düşük konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi olarak işlev görebilir. Etilenin 0,05 µL/L gibi düşük konsantrasyonlarda bile atfedilebilen biyolojik etkileri gözlemlenmiştir (Abeles vd., 1992). Toprak mikroorganizmaları tarafından üretilen ACC deaminaz gibi enzimler bitki büyümesini teşvik ederek bitkide şekerleştirici ve ayrıştırıcı ACC üretebilir ve böylece bitkinin etilen seviyesini düşürebilir. Etilen düzeyinin azalması bitkinin çevresel streslerin bir yelpazesine karşı daha dayanıklı olmasını sağlar (Glick, 2005). Suşların birinde zayıf olmakla birlikte toplam 6'sında

ACC deaminaz üretimi belirlenmiştir (Tablo 10, Şekil 6). İndol asetik asit üretim yetenekleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş olup örneklerin 6'sında iyi, üçünde (508, 146 ve 505Y12) ise çok iyi düzeyde aktivite tespit edildi (Tablo 11, Şekil 5).

Bitki gelişimini destekleyen özellikler açısından bakıldığında, dört (fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz, Siderofor ve amonyum üretimi) aktivitede de pozitifliğin gözlemlendiği suş sayısının üç (*Bacillus* sp. 112O1, *B. insolitus* 142 ve *Bacillus* sp. 112O3) olduğu tespit edildi. Genel olarak bakıldığında suşların siderofor (7-43 mm) üretim yetenekleri ve amonyum (1-3+) çözünürlüklerinin iyi olduğu söylenebilir. Bu sonuç göstermektedir ki bu bakterilerin, izole edildikleri yerin de orkide toprağı olduğu düşünülürse, bitki gelişimini teşvik eden bakteriler olan rizoid bakteriler oldukları doğrulanmaktadır.

İnsan nüfusunun dünya çapındaki artışı ile birlikte oluşan nüfus baskısı küresel gıda üretiminin yakında dünyanın tüm insanlarını beslemek için yeterli olmayacağını göstermiştir. Bu nedenle tarımda verimliliği önümüzdeki yıllarda gerekliliğinin yanında önemi daha da artacağı düşünülmektedir. Bu amaçla tarımsal uygulamalar çevre dostu bir yaklaşımla sürdürülebilir olarak ilerlemektedir. Böylece transjenik bitkilerin tarımda kullanımı bitki gelişimini ve ana tarımsal uygulamanın bir parçası olarak bakteri teşviki niteliğini taşımaktadır. Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin kullanımı, tarımda kimyasal gübrelerin ve tarımsal böcek ilaçlarının kullanımı yerine daha ekonomik ve çevre dostu alternatif bir metottur. Bakterilerin, organik ve mineral fosfat çözünürlüğü ile diğer bitki besin maddelerinin mineralizasyonu alımını artırabilmekte (deFreitas vd., 1997; Çakmakçı vd., 1999, 2001; Şahin vd., 2004).

Siderofor, 1,3 glukanaz, kitinaz, antibiyotik ve siyanit üretimiyle patojenik mikroorganizmalara karşıt inhibitör etki göstererek, dolaylı olarak bitki gelişmesini teşvik edebilmektedirler (Dobbelaere vd., 2003). Bakterilerce serbest azot fiksasyonu, indol asetik asit, gibberellik asit ve sitokin gibi hormonların üretimine ilave olarak, bitki taşıma sistemi ve iyon alımının teşvik edilmesi, gelişmeyi artırdığı bildirilmektedir (Dobbelaere vd., 2003; Aslantaş vd., 2007; Çakmakçı vd., 2006, 2007).

Hussen (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *Azotobacter vinelandii* Mac 259 ve *Bacillus cereus* UW85 suşlarının dahil olduğu 14 toprak bakteri izolatında, PGPR özellikleri in vitro olarak incelenmiş 6'sinde güçlü IAA üretimi, 4'ünde fosfat çözündürüllüğü ve 7'sinde siderefor (Fe-III kenetleme maddesi) üretimi belirlenmiştir.

Furnkranz vd., (2009) tarafından Bolivya'da 54 bakteri suşunda yapılan çalışmada % 19'unu diazotrof, % 41'i fosfat çözücü, % 10'u etilen öncülü madesi olan ACC üretebilen ve % 17'sinin fitohormon (IAA) sentez özelliğini sergileyen bakteri olarak tanımlamıştır. Rizoid bakteriyal suşların sadece küçük bir kısmının in vitro deneylerde bitki patojen özelliği göstermiştir. Diğer büyük kısmı ise bitkiye katkı sağlayan ya da herhangi bir olumsuz etkinlik göstermediği bildirilmektedir.

Bitki bakteri ilişkilerinin değerlendirilmesi ve PGPB özellik veren suşların seçilmesi tarımsal amaçlı yeni mikrobiyal aşuların geliştirilmesi için emsal sağlayabileceğini düşünüyoruz. Bu açıdan çalışma sonuçlarımızın önemli olduğu ve bu suşlardan bir veya bir kaçının PGPR olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

4.3. Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Çalışmada mikroorganizmaların metal toleransları araştırılması hedeflendi. Bu amaçla 5 farklı metal (Ag, Fe, Cu, Pb ve Zn) varlığında üreyebilme yetenekleri, katı agar ortamında araştırıldı (Tablo 11). Test edilen bakterilerin tümünün demir varlığında ve 10 mM gibi yüksek konsantrasyonlarında etkilenmediği hatta daha iyi geliştikleri gözlemlendi. Bilindiği üzere demirin bakteriler için zorunlu element olup, test edilen konsantrasyonların çok çok üzerinde ancak toksik etki yapabileceği görülmektedir.

Çalışmada toplam 11 suşun katı agar ortamındaki gümüş varlığında üreyebildikleri, 5O8, 146, 141, 5O5Y11, 142, 5O5Y1 ve 5O9 nolu suşların ise yüksek konsantrasyonlarda da (10 mM) iyi üredikleri gözlemlendi. Gümüş varlığında kültür edilmiş petri kapları oda ısısında bekletildiklerinde ise büyük çoğunluğunda tüm konsantrasyonlarda olmak üzere kırmızıdan berrak açılmaya kadar değişen renk değişimi ve zon oluşumları gözlemlendi (Tablo 13, Şekil 7). Bu renk değişimini muhtemelen bakırı indirgemiş formundan kaynaklanmış olabileceği, açılma olmanın ise

besiyerine renk veren bakırlı bileşiğin bakteri tarafından adsorbe edilmesinden dolayı oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kefeng ve Ramakrishna (2011) yaptıkları çalışmada, mısır ve ayçiçeği bitkisini bakır varlığında bakteri inokülasyonu ile birlikte üretmişler ve her iki bitkinin bakır alımı bakteri birlikteliğinde önemli düzeyde ($p < 0.05$) artış olduğu bildirilmektedir. Belirli bitki türleri üzerinde rhizoremediasyon etkinliği, topraktaki ağır metallerin biyoyararlanımlarına ve bitki kök rizosferinde bitki ve metal dirençli mikroorganizmalar arasındaki etkileşimine bağlıdır. Mısır bir dereceye kadar bakır toleransına sahip ve diğer araştırmacılar tarafından da, bakırla kirlenmiş toprakların fitoremediasyonunda kullanılmaktadır (Chiu vd., 2005; Murakami ve Ae, 2009).

Katı agar ortamında yapılan bakır tolerans testinde suşların tümünde, genel olarak en az bir konsantrasyonda üreme gösterdiği, 15 suşun ise 5 mM ve üzeri konsantrasyonlarda iyi üreme gösterdiği belirlendi. Özellikle 5O3, 5O5Y13 ve 5O9 nolu suşların yüksek konsantrasyonlarda çok iyi (2-3+) ürettiği belirlendi. Bakır varlığında üreyen kolonilerin oda ısısında bekletildiğinde, besiyerinin maviden şeffafa değiştiği, kültürün renginde bariz olarak renk değişiminin olmadığı gözlemlendi (Tablo 13, Şekil 7). Ancak oda ısısında plaklar 30-40 gün gibi uzun süre bekletilmesi sonucunda ise kolonilerin bariz olarak karardıkları izlendi (Şekil 8). Bu durumun muhtemelen metal tuzları bekledikçe bakteri yüzeyinde birikerek ya da bakteri metalleri yüzeyine adsorbe ederek indirgenmiş ve renk değişiminin oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Katı agar ortamında kurşun varlığında üremeye bakıldığında, suşların tümünün üreyebildiği, büyük çoğunluğunun (15 suş) ise 5 mM ve üzeri konsantrasyonlarında iyi üreme yeteneğine sahip oldukları belirlendi (Tablo 13, Şekil 7). Kurşunlu besiyerinin renginde değişim olmazken oda ısısında bekletilme esnasında bazı suşlarda bakteri kolonilerinde kararmaların varlığı tespit edildi. Bu muhtemelen metal ve bakteri etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sidduquee vd. (2013) çalışmalarında, 3 farklı *Trichoderma* türünün farklı metallere olan dirençleri test edilmiş, Ni ve Pb'de 1200 mg/L tolere edebildikleri, diğer

funguslarla karşılaştırıldığında ise sıvı ortamda *Trichoderma harzianum* suşunun Ni, Pb ve Cu maksimum toplayabilme özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Katı agar ortamında çinko varlığında yapılan ekimlerde suşların çinko toleranslarının diğer metallere göre daha düşük olduğu, suşların çoğunluğu en iyi üreme 2.5 mM'da gösterdikleri izlendi. Üreme en fazla 5 mM (8 adet suşta) Zn varlığında gözlenirken 10 mM'da konsantrasyonlarında üreyebilen suşların olmadığı belirlendi (Tablo 13, Şekil 7). Bu sonuç bakterilerin Zn toleransının düşük olduğunu göstermektedir.

Katı ortamda yapılan Cu dilüsyonunda suşların tümü 3,12 mM konsantrasyonlarda üreyebildikleri, 12,25 mM konsantrasyonlarda etkilenmeye başladıkları ve 50-100 mM konsantrasyonlarda ciddi (10-16 mm) olarak inhibe oldukları gözlemlendi. Test edilen 6 adet suştan en duyarlısı 5O1, en dirençlisi 112O1 ve 5O5Y11 suşları olduğu gözlemlendi. Bakır MIC konsantrasyonları incelendiğinde 112O1 suşunun bakıra en dirençli (25 mM/L) suş olduğu, kontrol suş olarak kullanılan *B. subtilis* W168'in 6,3 mM/L'de etkilendiği, ancak diğer tüm suşların ise 12,5 mM/L konsantrasyona dirençli oldukları belirlendi. Suşlarda bakırın bakterisit konsantrasyon (MBC) değerlerine bakıldığında ise, 5O5Y1 suşu hariç diğer suşların birbirine benzer olarak 50 mM/mL konsantrasyonlarında olduğu gözlemlendi (Tablo 14). Tablo sonucuna genel olarak bakıldığında seçilen suşların tümünün mevcut kaynaklardaki Cu tolerans değerleriyle kıyaslandığında daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir.

Malkoç vd. (2009)'ın yaptığı çalışmada, seramik endüstrisi arıtma suyu çamurundan *Bacillus megaterium* ve *Bacillus cereus*'unda bulunduğu metale dirençli (87,9 µg/g Cr, 14,6 µg/g Cu, 9,7 µg/g Hg) toplam 13 tür bakteri saflaştırmışlar. Metaller çeşitli mekanizmalar yoluyla mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkilerini ortaya koysalar bile metale dayanıklı bakteriler kirlenmiş alanlardan hayatta kalabilir ve biyoremediasyon uygulamalar için kullanılabilir oldukları tespit edilmiştir.

Selvi vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada, Güney Hindistan'da, ağır metal (Zn, Cu, Cr, Hg ve Pb) dirençli bakterileri izole ederek tanımlanması ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu çalışmada BHIA besi ortamında toplam 50 adet izolattan 10-80 ppm

aralığında metal direnci araştırılmış, içinde *Bacillus* sp. nin de bulunduğu 5 adet çoklu ağır metallere dirençli suş bildirmişlerdir.

Chihomvu vd. (2014) tarafından nehir sularından izole edilen *Bacillus* genusunun da dahil olduğu 16 suşun 0.2-4 mM konsantrasyonlarındaki Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb ve Zn metallerine karşı toleranslarını MIC yöntemiyle çalışmışlardır. Bu çalışmada suşların üçünde Fe MIC değeri 4 mM, birinde tolerans gözlenmezken 11 suşta 0,2-1,2 mM aralığında bildirilmektedir. Aynı çalışmada suşların bakır MIC değerleri 0,2-0,8 mM aralığında bildirilmektedir. Bakterilerin en çok çinkoya duyarlı oldukları (yanlızca 5 suşun 0,2-0,8 mM) en yüksek direncin ise kurşuna karşı taşıdıkları (10 suşun 4 mM kurşun varlığında ürediği) bildirilmektedir. Çalışmamızda suşların büyük çoğunluğu çoklu metal direncine sahip oldukları tespit edildi. Özellikle 5O5Y11, 146, 141, 142, 144, 5O5Y1 ve 5O9 suşlarının test edilen metallerin tümüne karşı yüksek düzeyde dirence sahip oldukları belirlendi (Tablo 13).

Bakterilerdeki metallere karşı olan bu değişik direnç cevabı direnç mekanizmalarındaki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır (Abou Zeid vd., 2009). Bu ağır metallere dirençlilikteki değişiklikler kromozomal, plazmid ya da transpozonlar aracılı olmaktadır (Gupta vd., 1999; Tenover ve McGowan, 1996; Ghosh vd., 200). Ancak özellikle plazmid aracılı direncin daha yaygın olduğu (Zolgharnein vd., 2007) çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir.

Çalışmamızda bakır MIC ve MBC testi yapılan 6 suşun (Tablo 14) bakır varlığında, yokluğunda ve pH 5.0-7.5 aralığında 48 saat boyunca üreme yetenekleri incelendi ve grafik oluşturuldu (Şekil 11-16). Metal varlığından en az etkilenen suşun 5O5Y11 olduğu, bunu 5O5Y1 suşunun izlediği gözlenmektedir. İlginç bir şekilde suşların tümünde orta asitli pH olan 6.0-6.5'da üremenin metalsiz şartlardakine göre daha düşük olduğu, düşük ve yüksek pH değerlerinde daha iyi üreme yeteneklerine sahip oldukları gözlenmiştir. Özellikle pH 5.5'de ikinci bir logaritmik evrenin oluştuğu izlendi. Metal varlığında suşların genel olarak etkilendiği, düşük pH değerlerinde daha çok etkilendiği, bununla birlikte yüksek pH değerlerinde iyi üredikleri tespit edildi. İlginç bir sonuç ise metalsiz ortamda düşük pH'da (pH 5.0) iyi üreme gösterirken, metalli ortamda yüksek pH'da daha iyi bir üreme gösterdikleri bulgusudur.

Sulu ortamlarda metal iyonlarının uzaklaştırılmasında, bakteri hücrelerin kapasitesini; sıcaklık, pH ve biyomas konsantrasyonu gibi çevresel gelişme koşulları oldukça fazla etkili olmaktadır (Chen ve Ting, 1995). Mevcut çalışmamızda da optimum üreme ısıda üretilen bakterilerin (Tablo 8), Cu varlığında ve yokluğunda pH ve zaman faktörüne bakıldığında bakterilerin gelişmesinde önemli değişikliklerin oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 11-16). Bu sonuçlar literatür bilgisiyle uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak metal ve farklı pH parametrelerinde en iyi üreme gösteren suşun 5O5Y11 olduğu ancak diğer suşlarında uygulanan fiziksel (pH, sıcaklık, besi ortamı) şartlardan çok fazla etkilenmedikleri ve de biyoremediasyon çalışmalarında kullanım potansiyelleri olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu konuda daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bakır varlığında farklı pH aralıklarında en iyi üreme yeteneğine sahip olduğu gözlenen *Bacillus* sp. 5O5Y11 suşu bundan sonraki denemelerde kullanılmak üzere seçildi. Bakterinin bakırı absorblama yeteneğinin de ortam sıvısının ne kadar etkili olabileceğinin belirlenmesi amacıyla; su, MHB ve BHIB besi ortamlarında çalışıldı ve de kontrolleri yapılarak standart eğrileri oluşturuldu (Şekil 16).

Su ortamında çözülen Cu'nun 1-10 mM konsantrasyonlarında düzgün bir grafik oluştururken, MHB sıvı besiyerinde bu absorbansın hafif arttığı, ancak BHI sıvı besiyerinde doğrusal artan bir grafik olduğu belirlendi. Bu sonuç ise literatürler de belirtildiği gibi BHI sıvı besiyerinin Cu'yu daha çok absorbe ettiğini doğrulamıştır. Kaynaklarda Cu'nun 580-620 nm aralığında absorbans verdiği, grafiklerimizde de bu aralıkta bariz bir pikin var olduğu gözlenmiştir. Kontrol besiyerinde (Cu'suz ancak bakterili ve bakterisiz) elde edilen grafiklerde bu piklerin olmayışı bu öngörülerimizi doğruladığı düşünülmektedir (Şekil 17). Sonuç olarak bakteri kültür ortamının Cu absorpsiyonunda önemli olduğu, özellikle protein içeriği yüksek olan besi ortamları absorbansı arttırdığını gözlemledik. Çalışmalarda bu hususun dikkat edilmesi gerekmektedir.

Farklı besiyerlerinde 5O5Y11 suşunun BHI besi ortamında Cu yokluğunda (Tablo 18) ve varlığında (Tablo 19) pH 7.0'de kültür süresi uzadıkça absorbans değerlerinin de arttığı dolayısıyla kültür süresinin Cu absorpsiyonunda pH gibi önemli bir faktör olduğu belirlenmiş oldu. Çalışmamızda da Cu absorpsiyonu zamana bağlı olarak değiştiği, süre uzadıkça absorpsiyonun arttığı, dolayısıyla literatür çalışmalarıyla uyumlu olarak zaman faktörünün önemi bir kez daha ortaya çıkmış olmaktadır.

Bacillus sp. 5O5Y11 suşunun (3 mM) varlığında farklı pH değerlerinde alınan spektrumlarda 550-600 nm spktrum aralığında bir pik oluştuğu ve bu pikin bakıra ait olduğu, inkübasyon süresi uzadıkça belirlenen pikin daha da arttığı belirlendi (Şekil 19). Bu sonuç sıvı kültür ortamında 5O5Y11 suşunun genel olarak geniş pH aralığında Cu'ı absorbe edebildiği ancak en iyi absorbansın pH 7.0'de yapabildiği, inkübasyon süresiyle de ilişkili olarak absorbansın arttığı tespit edilmiştir.

pH değeri biyosorpsiyonun etkinliğinde ve mikroorganizmalara bağlanabilmesinde başlıca faktörlerden biridir (Babich ve Stotzky, 1985; Lopez vd., 2000; Pardo vd., 2003). Elsilik vd. (2014) yaptığı çalışmada *B. anthracis* PS2010 suşunun bakırın alımını pH 5.0 den 7.0'ye doğru gidildikçe arttığı, en iyi alımın pH 7.0-8.0 aralığında olduğu bildirilmektedir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki suşlarla elde edilen sonuçlara uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bakır ve diğer metallerin alınımında zamanla olan ilişkisini incelediğinde maksimum alımın Cu, Cd ve Zn'nin 24 saat sonra olduğu, Co ve Pb'nin ise 18-24 saat aralığında en yüksek olduğu bildirilmektedir.

Sonuç olarak 5O5Y11 suşunun bakırı absorbladığı, absorblama pH değeri yukarıda verilen çalışmalarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

4.4. Bakır ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı

Bitki gelişimini teşvik eden özellikleri iyi, metal toleransı yüksek ve metal varlığında farklı pH aralıklarında iyi üreyebilen 4 adet suşun (112O1, 5O1, 5O8 ve 5O5Y11) mısır çimlenmesi üzerine olan etkileri, Cu (1,5 mM) varlığında ve yokluğunda test edildi (Tablo 13). Mısır bitkisinin çimlenme başarısına bakıldığında kontrol grubunda 3. günde % 87,5. günde % 100 olarak belirlendi. Bakteri varlığında

çimlenme başarısı en yüksek 3. günde 5O8, 5. günde 5O5Y11, 7. günde ise 112O1 nolu suşlarda tespit edildi. Bakır kontrol grubunda negatif kontrole göre çimlenme başarısı daha yüksek olduğu, 3. günde % 96,7 ve 5. günde % 100 çimlenmenin gerçekleştiği tespit edildi. Bakır varlığında deney gruplarında en iyi çimlenme 3. günde % 100 olarak 5O5Y11 nolu suşunda gözlemlendi (Tablo 15).

Toksik seviyedeki kirleticilerin polen çimlenmesi ve tüp gelişimi üzerinde önemli etkileri vardır. Cd, Co, Cu, Zn, Pb, Fe ve Hg gibi ağır metal iyonlarının polen çimlenmesi ve tüp büyümesini engellediği, polen tüpünün ultra yapısını bozduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Munzuroğlu vd., 2000).

Genel olarak çimlenme başarısına bakıldığında bakteri varlığında çimlenmenin kontrole göre azaldığı, yalnızca bakır varlığında çimlenmenin kontrole göre daha iyi olduğu, bakır ve bakteri birliklerinde ise çimlenme başarısının kontrollerine göre arttığı belirlendi. En etkili bakterinin ise 5O5Y11 nolu suşun olduğu gözlemlendi (Tablo 15). Bu sonuçtan 1,5 mM bakırın varlığı çimlenme hızını arttırdığı, bakterinin tek başına çimlenme hızını azalttığı, bakteri +bakır birlikteliğinde bakteri suşun özelliklerine göre tohumun çimlenme hızını arttırabileceği gözlemlenmiştir.

En yüksek saçaklanma sırasıyla Cu'suz 5O8 (% 8,9) suşu, Cu'lu 5O1 (% 8,1), Cu kontrol (% 8,3) ve Cu'lu 5O5Y11(% 8,1) suşlarında gözlemlendi (Tablo 15, Şekil 20). Bakırlı ortamda bitkinin metal stresine uğradığı, bakırsız ortamda ise 5O8 suşundan kaynaklı strese girdiği ve saçaklanma sayısını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bakırlı ortamlarda bakteri birlikteliğiyle saçaklanmanın daha da arttığı (5O1 suşu hariç) gözlemlenmiş olup bu durumun bakteri suşunun özelliklerine bağlı olmakla birlikte saçaklanmayı arttırdığı düşünülmektedir. Bunun nedenlerini, daha kapsamlı çalışmalar yapılarak ortaya konması gerekmektedir. Çalışmamızda bu durumun bakteri tek başına bir faktör olduğunda bitki için bir stres unsuru olabileceği düşüncesini ortaya koymuştur.

Bacillus sp. 5O5Y11 varlığında saçaklanmanın kontrole göre arttığı, bakırla birliktelikte bu artışın daha yüksek olduğu ancak metal kontrollerinde daha az olduğu gözlemlendi. Bu sonuç ise bakteri varlığında metal stresinin azalmış olabileceği ya da

bakterinin bakırı adsorbe ederek bitki alımını azaltmış olabileceği düşünöldü (Tablo 15, Şekil 21).

5O5Y11 suşunun kök boyu ve ağırlığına bakıldığında bakır ve bakır mısır kontrollerine göre kök ağırlığını arttırdığı, ancak uzunluklarını azalttığı belirlendi (Tablo 15, Şekil 23-24). Bunun nedeni kökün su tutma kapasitesini arttırmış olabileceği düşünölmektedir.

Kontrol mısır gövde ağırlığını ve uzunluğunun (0,119 g ve 3,625 mm) bakteri varlığında (0,208 g ve 4,41 mm) ve bakır varlığında (mısır bakırda sırasıyla 0,12g ve 2,6 mm iken 5O5Y11+Cu'da 0,371 ve 3,88 mm) şeklinde arttırdığı dolayısıyla bakırın toksik etkisini nötralize ettiği düşünölmektedir (Şekil 24).

112O1 suşunda ise bakır varlığında ve yokluğunda saçaklanmanın aynı seviyelerde olduğu, metalsiz kontrole göre daha yüksek, ancak metalli kontrole göre daha düşük olduğu izlendi. Bu sonuç bakterinin ortamdaki bakırın etkinliğini baskılamış olduğu diğer parametreler açısından değerlendirilmekle birlikte bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünölmektedir (Tablo 15, Şekil 20).

Kök ile gövde uzunluğunun (Şekil 23) ve kök ile gövde ağırlığı (Şekil 24) verilerine bakıldığında, tek bakteri varlığında (Cu'suz) gövde uzunluğu dışındaki tüm parametrelerde kontrole göre azalma var olduğu, bakır-bakteri birlikteliğinde ise bakır kontrole göre gövde ve kök uzunluklarının daha yüksek olduğu gözlemlendi.

5O1 suşunda benzer şekilde bakır varlığında daha yüksek olmakla birlikte, yokluğunda da saçaklanmanın yüksek olduğu, dolayısıyla bu suşun bakırı tolere edemediği hatta bakterinin kendisi de tohumda stres unsuru olabileceği düşünölmektedir (Tablo 15, Şekil 20).

5O1 suşunun kök ve gövde gelişimi açısından bakıldığında bakırsız ortamda, mısır kontrole göre gövde uzunluğu ile radikul ağırlığının daha iyi olduğu, bakır varlığında da benzer durum söz konusu olduğu gözlemlendi. Farklı olarak bakır varlığında 5O1'in kök ağırlığı diğerlerine göre yüksek olduğu izlendi (Şekil 23-24).

508 suşunda ise bakteri varlığında saçaklanmanın tüm test edilen bakteriler arasında en yüksek saçaklanma gözlenmesi ve bakır varlığında bu saçaklanmanın azalması ilginç olarak değerlendirilmiş, bu suş üzerinde daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Tablo 15, şekil 20).

508 suşunun tohum gelişimi üzerine en etkili suş olduğu gövde gelişimi açısından incelendiğinde kontrole en yakın veri elde edilen suş olduğu gözlemlendi. 508 bakırsız ortam mısır kontrole göre gövde uzunluğu radikül ağırlığı ve uzunluğunun daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bakır bakteri birlikteliğinde ise bakır kontrole göre gövde ağırlığı, uzunluğu ve radikül uzunluğunun daha iyi olduğu gözlemlendi (Şekil 23, 24, Tablo 15).

Mısır bitkisinin çimlenmesi ve gelişimini bakırın varlığı etkilediği yani gelişimini engellediği gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda mısır kök ve gövde gelişimi yüksek iken, Cu varlığında düşük olduğu izlendi. Hem bakteri varlığında hemde metal bakteri birlikteliğinde gelişimin en iyi olduğu suşlar sırasıyla 505Y11, 508, 501ve 11201 gelmektedir (Tablo 15, Şekil 23).

Sonuç olarak bakır varlığı, mısırın çimlenme hızını arttırdığını, ancak çimlendikten sonraki aşamasında gelişmeyi engellediği sonucuna varıldı. Bakteri varlığı çimlenmeyi bakırlı ve bakırsız ortamda kontrollerine göre bir kısım parametreler açısından olumlu yönde etkilediği gözlemlendi.

Çalışmamızın şu ana kadar olan kısmı göz önüne alınarak tüm elde edilen veriler doğrultusunda 505Y11 suşunun mısır bitkisi gelişimi (saksı deneyi) üzerine etkinliğinin test edilmesi için en uygun suş olduğu sonucuna varıldı. Bununla birlikte diğer suşlarında kullanılabileceği, çünkü petri ortamıyla toprak ortamı arasında çimlenmede önemli farkların olması muhtemeldir.

4.5. Bakır Varlığında Mısır Gelişimi (Saksı Deneyi) ve Atomik Absorbsiyon Analizi

Çimlenme deneyi diğer bakterilerle birlikte toprak ortamında da farklı faktörlerle birlikte denenmesi ve bu sonuçlara göre suşların özelliklerinin incelenmesi, durumunda daha iyi sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

4.5.1. Bakır Varlığında Mısır Gelişimi Deneyi Sonuçları

Çalışmanın şu ana kadar olan verileri gözden geçirilecek olursa belli özellikleri açısından önemli bulunan suşların bazıları moleküler olarak karakterize edildi. Bu suşlar belirlenirken dikkat edilen bazı özellikler; sırası ile amonyum ve siderofor (*B. mycoides* 5O1, *B. thuringiensis* 5O9, *Bacillus* sp. 5O5Y11) ve IAA üretimleri (5O9) açısından en iyi olan suşlar belirlendi. Ayrıca bu suşların tümünün güçlü lesitinaz (5O5Y11 ve 5O9), azot fikse etme ve jelatinaz aktivitelerine sahip olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak 5O5Y11 suşunun test edilen tüm fiziksel parametrelerde çok iyi özellikler gösterdiği için potansiyel suş olarak seçilip sonraki çalışmalarda değerlendirildi (Tablo 16).

Metal toleransı araştırıldığında (5O5Y11) suşu test edilen tüm metallerin 5-10 mM konsantrasyonlarında üreyebildiği, 5O9 nolu suşun çinko hariç (2,5 mM) diğer tüm metallerde 10 mM'da çok iyi ürediği, 5O1 suşu ise gümüş hariç diğer metallerin varlığında iyi üreyebildiği belirlendi. Bakır (3mM) varlığında BHIB sıvı besiyerinde pH 5.0-7.5 aralığında 48 saat yapılan inkübasyonda 5O1 ve 5O9 suşlarını pH 7.0 ve 7.5'de, 5O5Y11 suşunun ise genel olarak pH 5.5-7.5 aralığında iyi ürediği ancak optimum üreme pH 7.0 - 7.5'de olduğu dolayısıyla bu durumun biyoremidasyonda bir avantaj olabileceği düşünüldü. Ve tüm bu parametreler ele alındığında tohum çimlenme deneyinde, çimlenme hızını en fazla arttıran suşun 5O5Y11 olduğu belirlendikten sonra bu suşun bitki gelişiminde kullanılabileceği dolayısıyla biyoremidant suş olabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmada mısır bitkisinin yetiştirildiği toprak ortamın su içeriği açısından homolojisini göstermek istendi ve toprak kuru ağırlığı ile nem oranı ölçüldü. Tüm deneme saksılarında aynı toprak kullanıldığından dolayı verilerin homojen olduğu, su içeriğinin % 58-59 aralığında benzer olduğu gözlemlendi (Tablo 17).

Kök biyomasının yaş ve kuru ağırlık yönünden incelendiğinde ise kontrol grubunda düşük olduğu metal ve bakteri uygulamalarında ise yaş ve kuru ağırlığın arttığı (kontrol Cu 100 kuru ağırlık hariç) gözlemlendi. En düşük yaş ve kuru ağırlık kontrol Cu-100 (sırasıyla 1,72 g ve 0,342 g) belirlendi. Bu sonuca paralel olarak köklerin % su içeriği en düşük olarak kontrol (% 80,1) grubunda belirlenirken diğer tüm denemelerde % 93,3 ile % 95 aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek su içeriği % 95 ile Cu-505Y11'de ve kontrol Cu100'de gözlemlendi. Tüm bu verilere bakıldığında bakteri ya da bakır varlığında strese giren köklerin strese karşı cevap olarak su tutma kapasitesilerini arttırdığı kanısına varıldı.

Mısır gelişimi takip edildiğinde 4 hafta boyunca mısırlara uygulanan parametrelerde görsel açıdan önemli bir fark izlenmediği gözlemlendi (Şekil 26a, 26b, 27 ve 28). Hasat sonunda tüm mısır fidanlarında 4 yaprak oluştuğu, bazen emin olunmamakla birlikte bakır miktarı arttıkça rengin hafif sarardığı, kök ve gövde boyunun azaldığı gözlemlendi.

Mısır gruplarının verilerine genel olarak bakıldığında (Tablo 18-22) en uzun yaprağın tümünde 3. yaprak olduğu, kontrol grubunda 33,50 cm iken en düşük bakır 100 kontrolde (31,6 cm) ölçüldü. Bakteri kontrolde 35,97 cm ölçülürken bakır 50-bakteri birlikteliğinde 35,27 cm, bakır 100-bakteri birlikteliğinde ise en yüksek (36,27 cm) olarak ölçüldü.

Bu sonuçlar göstermektedir ki bakteri varlığında yaprak uzunluğunun kontrole göre daha iyi olduğu, bakır varlığında (50 mg'da) yaprak uzunluğunu arttırdığı, 100 mg da ise (31,6 cm) çok etkileyip azalttığı, bakteri bakır birlikteliklerinde kontrole göre arttığı gözlemlendi. 100 mg bakır tek başına bitki gelişimini engellediği ancak bakteri bu gelişimi olumlu yönde arttırdığı tespit edildi.

Ana kök uzunluğu bakımından incelendiğinde kontrolde 32,83 cm ölçülmüş, bakteri varlığında artmış (33,03 cm), bakır kontrolde (50 mg) azalmış (32,50 cm), bakır 50-bakteri birlikteliğinde ise en yüksek seviyelere ulaşmış olduğu gözlemlendi. Bu sonuç bakırın bu konsantrasyonu bitkiyi tek başına etkilerken bakteri varlığında olumlu sonuç verdiğini göstermektedir. 100 mg Cu varlığında kök uzunluğu en düşük (31,0 cm) iken,

bakteri birlikteliğinde kontrolden de daha fazla (34,0 cm) arttığı tespit edildi. Bu durum ise bakterinin bakır varlığını tolere etmekle kalmadığı, kök uzamasına olumlu etki yaptığını düşündürmektedir (Tablo 18-22).

Saçak kök sayısı açısından incelendiğinde ise kontrolde ortalama sayı 11,67 belirlenirken bakteri kontrolde 10,3, Cu50 mg da 10,67, Cu50 mg-bakteri birlikteliğinde 10,87, Cu100 mg- bakteri birlikteliğinde 10,80 ve Cu100 kontrolde 11 olarak belirlendi. Saçaklanma sayısı mısır çimlendirme deneyinde stres ortamında arttığı, ancak toprak ortamında uygulandığında ise azaldığı gözlemlendi (Tablo 18-22). Bunun nedeni toprak ekosistemi doğal koşullara daha yakın olduğu için farklı sonuç vermiş olacağı düşünülmektedir. Bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Gövde uzunluğu açısından bakıldığında ise en uzun ölçüm sırasıyla 11,57 cm ile Cu50 mg'da ve 11,10 ile bakteri kontrolde gözlenirken üçüncü sırada mısır kontrol (10,77 cm) gelmektedir. Bakır (50) ve bakteri tek başına varlığında gövde uzunluğunu arttırırken birlikteliğinde 9,53 cm şeklinde önemsiz bir azalma olduğu gözlemlendi (Tablo 18-22).

Toplam mısır gelişimi verilerine bakıldığında kontrol grubuna göre Cu50 ve 100 mg konsantrasyonların gelişimi azalttığı bakteri varlığında kontrole göre daha iyi olduğu gözlemlendi (Şekil 29). Bakır-bakteri birlikteliğinde total olarak mısır gelişimi parametrelerini benzer şekilde arttırdığı izlendi. İstatistiksel analiz verilerine bakıldığında ise tüm test edilen özellikler açısından $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark olduğu belirlendi.

Çoklu varyans analizine (Multivaryete testi) göre bakır için 5O5Y11 grubu ve Cu100-5O5Y11 grubu arasında $p < 0,05$ seviyesinde, Cu50, Cu100 ve Cu50-5O5Y11 arasında ise $p < 0,01$ seviyesinde önemli farklılıklar vardı. R^2 (R square) değerleri 0,92'in üzerinde bulundu. Korelasyon değerlerine göre tüm gruplar arasında $p < 0,01$ seviyesinde ilişki belirlendi.

Bacillus cinsi PGPR ırkları ile yapılan çalışmalarda, *Bacillus amyloliquefaciens* 937a, *B. subtilis* 937b ve *B. pumilus* SE34 gibi birçok PGPR ırkını içeren spor

formulasyonları karışımı arazi şartlarında domates bitkilerine uygulanmış, uygulama yapılan tüm bitkilerde 40 gün boyunca Tomato mottle virus (ToMoV) DNA'sının varlığı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda PGPR'lerin domateslerde sistemik dayanıklılık sağlayarak, ToMoV yoğunluğunu ve hastalık şiddetini azaltarak verimde artış sağladığı gözlemlenmiştir (Murphy vd., 2000). Aynı şekilde bitkilerde CMV ve ToMV'ye karşı ISR için 6 yıl boyunca (*B. amyloliquefaciens* 937a, *B. subtilis* 937b ve *B. Pumilus* SE34) PGPR ırkları sera ve arazi denemeleri ile incelenmiştir. Çalışmamızda da birçok özellikleri açısından iyi olarak belirlenen 5O5Y11 suşunun arazi koşullarında da denenerek biyopreparat olabilme özelliği araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

4.5.2. Mısır Gelişimi Deneyinde Bakırın Atomik Absorbsiyonla Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan 5O5Y11 suşunun Cu varlığında ortamda ki Cu'yu ne derece alabildiğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada önce yetiştirme toprağında, daha sonra mısır kök ve yaprak kısımlarında depolanan bakır miktarları ölçüldü (Tablo 24-26). Mısır bitkisinin geliştirildiği toprak ortamında varolan bakırı ve Cu uygulama sonrasında kalan bakırın belirlenmesi bakteri ve mısırın ortamdan aldığı bakır miktarının hesaplanması açısından önemlidir. Bu amaçla öncelikle mısırın geliştirildiği toprak ortamındaki Cu miktarı belirlendi (Tablo 24, Şekil 29). Kontrol gruplarında toprak kontrol ve toprak ovit (bakteri) gruplarında birbirine yakın değerlerde olup sırasıyla 30 ve 24 ppm şeklinde Cu ölçüldü. Aralarında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark olup bakteri varlığında topraktaki bakır miktarının ortalama 6 ppm kadar azaldığı izlendi. Bu durum bakteri varlığında bakırın azalmış olduğunu, bakterinin biyoremedie etmiş olabileceğini göstermektedir.

Toprağa 50 ve 100 mg Cu uygulandığında doğal olarak analiz değerlerinin artmış (137 - 600 ppm) olduğu belirlendi. Kontrol grubunda olduğu gibi toprağa Cu50 mg ve Cu100 mg uygulamalarında da bakteri varlığında yaklaşık % 100'e varan oranlarda azalma olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar bakteri (5O5Y11) varlığında topraktaki bakır miktarı normale göre % 100'e varan oranda elemine edebilmekte olduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla 5O5Y11 suşunun iyi bir biyoremidant suş olduğuna işaret etmektedir.

Bunun nedeni muhtemelen bitki tarafından Cu alımının bakteri varlığında artırılmış olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Zira mısır bitkisi de doğal olarak fitoremidant bir bitkidir. Cu stresinde ortamdaki Cu'yu daha iyi remide ettiği gözlenmektedir. Bakırlı ve bakırsız ortamda büyütülen mısır bitkisinin Cu alımı incelenmesinde iki parametre seçilmiş olup bunlar mısır kök veyaprak kısımlarıdır.

Kök kısmında Cu birikimi ile alınan verilerin istatistiksel analizinde $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılığın olduğu gözlemlendi (Tablo 25, Şekil 30). Bakır ilave edilmeyen kontrol gruplarına bakıldığında toprakta olduğu gibi Cu oranının köklerde az olduğu gözlenmektedir. Ancak topraktakinden ters bir ilişki bulunmakta olup bu sefer kontrol toprakta yetişen mısır kökünde Cu az (6,94 ppm) olduğu bakteri birlikteliğinde ise daha fazla (7,77 ppm) olduğu gözlenmektedir. Bu durumun, Cu50 ve Cu100 uygulamalarında da benzer şekilde görülmekte olup bakterinin güçlü biyoremidant özelliğe sahip olduğunu gösterdiği sonucuna varıldı. Ayrıca ortamdaki bakır miktarı arttıkça bakterinin biyoremidasyon oranında arttığı; kontrol grubunda % 11,997, Cu50 mg grubunda % 13,98 ve Cu100 mg grubunda ise % 34,8 oranında bakır miktarı kökte artış olduğu gözlemlendi (Tablo 25, Şekil 30).

Mısır bitkisinin en fazla bakır biriktirdiği ikinci kısmı olan yapraklarda ki bakır miktarına bakıldığında ise biraz farklılıkların olduğu ve bunların da istatistiksel açıdan $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlemlendi. Yaprak ölçümlerinde ilk 3 yaprak değerlendirmeye katılmış olup, 4. yaprak ise işleme alınmadı. Yaprakta ki Cu varlığı gövdeye göre çok daha düşük olduğu, minimum 5,90 ppm ile Cu100 kontrolde gözlenirken, maksimum değer Cu50-bakteri birlikteliğinde 10,55 ppm olarak ölçüldü. Bu sonuç ortamdaki Cu konsantrasyonu ne olursa olsun yaprağa taşınan oranın sabit değer aralığında olduğunu göstermektedir (Tablo 26, Şekil 31). Bakteri varlığında kontrol grubu yaprakları hariç diğer yapraklarda Cu oranının daha yüksek olduğu belirlendi. Tüm bu sonuçlara bakıldığında 505Y11 suşunun mısır bitkisinin kök ve yapraklarında bakır alımını arttırdığı; mısırla birlikte kullanımlarında iyi bir biyo ve fito remidant ajan olabileceği sonucuna varıldı.

Ores vd. (2013) *Bacillus thuringiensis* OSM29 suşunda yaptıkları bir çalışmada pH 1 ile 10 arasında bakır absorpsiyonu çalışılmış, pH 4.5- 8.0 aralığında absorpsiyonun

iyi olduğu, en iyi absorpsiyonun pH 6.0'da gerçekleştiği bildirilmiştir. Yaşayan organizmaların büyük çoğunluğu Cd ve Cu gibi ağır metalleri düşük pH'da fizyolojik özellikleri sayesinde metalleri absorblayabildiği bildirilmektedir (Sar vd., 1999; Ok vd., 2007). Çalışma sonuçlarımız da bu verilerle uyum göstermekte olup bakteri mısır birlikteliğinde metal absorpsiyonunun en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.5.3. 5O5Y11 Suşunun Sıvı Besiyerinde (BHIB) Bakır Absorpsiyonu

Bakterinin sıvı ortamda Cu'yu absorblama yeteneğinin belirlenmesi için analiz yapıldı. Bu amaçla 5O5Y11 suşu en iyi ürediği pH (7.0), sıcaklık (36 °C) ve besiyeri (BHIB) ortamı seçilerek yüksek hacimde üretildi. Besiyerinde eser element olarak bulunan bakırın var olduğu, bakteri kültür edildiğinde (72 saat) pellet uzaklaştırıldığında sıvıda kalan bakır miktarı 4,49 ppm/5 mL şeklinde hesaplandı. Bu ortamdan alınan bakteri pelletinde ise (300 mg bakteride) 42,09 ppm olarak yaklaşık 10 katı daha fazla ölçüldü. Bu sonuç bakterinin biyoremidant suş olduğunu, ortamda eser miktardaki bakırı yoğun bir şekilde absorbe edebildiğini göstermektedir (Tablo 27, şekil 32). Ortalama 2,5 mM Cu ilave edildiğinde kültür filtratında kalan bakırın 227,41 ppm gibi yüksek seviyelerde gözlenirken bakır pelletinde de buna paralel olarak 1421,86 ppm düzeyinde bakır ölçüldü.

Metal biyosorpsiyonunda etkin olarak kullanılacak biyolojik moleküller oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Özellikle mikroorganizma grubu içerisinde algler de dahil olmak üzere çeşitli bakteri, maya ve küf mantarı türlerini saymak mümkündür (Sağlam ve Cihangir, 1995).

Yüzey adsorpsiyonun fizikokimyasal bir olay olduğu, hücre duvarı bileşenleri olan birçok biyolojik moleküllerin (polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipidlerin) sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile gerçekleştiği belirtilmektedir (Ting vd., 1991; HoIan, 1993). Bu fonksiyonel grupların (amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve thiol grupları) metalleri bağlamada farklı affinite ve özgüllüğe sahip oldukları bildirilmektedir (Ting vd., 1991).

Diğer yandan hücre duvarının içeriği olan proteinler, metalleri bağlamak için aktif bölgeler oluşturmakta ve metale karşı affinitelerini arttırmaktadırlar. Yüzeysel alımda bazı mikroorganizmalar, yüzeylerinde yüksek moleküler ağırlıklı polifosfatlara benzeyen grupları ile metallerle kompleks oluşturarak, metali bağlayabildikleri bildirilmektedir (Ting vd., 1991; Scott ve Karonjkar, 1992; HoIan, 1993).

Elsilk vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Cd, Cu, Co, Zn ve Pb metallerine değişik oranlarda dirençli olan *B. anthracis* PS2010 suşunun MIC değeri sırasıyla 0,6, 2,0, 0,8, 4,0 ve 3,0 mM olarak bildirilmiştir. Optimum koşullarda bakterinin bakır absorpsiyon değeri 2,03 mg/g kuru ağırlık olarak bildirilmektedir.

Bazı metallerin örneğin bakırın hücre büyümesini belli bir derişimden sonra inhibe ettiği, buna karşın metal bağlayıcı proteinlerin (MTs) sentezini artırdığı deneysel olarak saptanmıştır. Bu ise, metal bağlayıcı proteinlerin yapısına, bu gibi metallerin yapısal bileşen olarak girdiğini göstermektedir (Yazgan vd., 1993; Huang vd., 1990; Mowil ve Gadd, 1984).

Sonuç olarak; metallerin biyolojik yöntemlerle uzaklaştırılması ve geri kazanımı, kullanılan klasik fiziksel ve kimyasal arıtım yöntemlerine kıyasla ekonomik, pratik olması; yüksek verimlilik içermesi nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda biyosorpsiyon özelliği güçlü bakteri ve diğer mikroorganizmalar araştırılmaktadır.

Çalışmamız da, biyosorpsiyon özelliği güçlü olan yeni bakterilerin belirlenmesi sağlanmış olup, bilime bu alanda da katkı sağlandığı, ülkemiz ve bölgemiz biyolojik kaynaklarından izole edilen potansiyel biyoabsorblayıcı bakteri suşlarının bilim dünyasına sunulması açısından da ayrıca bir önem taşımakta olduğu düşünülmektedir.

Bu sonuçlar göstermektedir ki 505Y11 suşunun ortamdaki bakırı yüksek oranda adsorbe/biyoremedide edebilmekte olduğu bitki kökünde ki Cu'nun yaprakta fazla olması doğal olmasına rağmen, köke ataç olmuş bakterininde kökteki Cu oranı artışında payı olduğu sonucuna varılmaktadır. Dolayısıyla 505Y11 suşunun iyi bir biyoremidant ajan olduğu, bu alanda daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

5. ÖNERİLER

Çalışmada 20 adet rizoit bakteri araştırılıp, geleneksel yöntemlerle fiziksel ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Bölgemiz orkide topraklarından elde edilen suşlarda yapılan ilk çalışma olması, potansiyel biyokontrol, bitki gelişimini teşvik edebilen ve ağır metal direncine sahip biyoremidant suşların belirlenmesi açısından önemli olup, bu amaçla yapılan yeni çalışmalara örnek teşkil edeceği düşünülmektedir.

Bu suşlarda çalışılması gereken daha fazla sayıda aktivite (antibiyotiklere duyarlılığı, direnç genleri, plazmitleri, antimikrobiyal madde, bakteriyosin ve bakteriyofaj içerikleri ve bir dizi enzim aktiviteleri gibi) var ve bunların yapılacak yeni çalışmalarda incelenmesi gerekmektedir.

Bakterilerin bitki gelişimini teşvik eden özellikleri metal yokluğunda araştırıldı. Bu deneylerin farklı metallerin varlığında siderofor, IAA, fosfat çözünürlüğü, amonyum üretimi ve ACC deaminaz aktivitelerinin varlığı ve şiddeti araştırılmalıdır.

Çalışmada bitki gelişimini teşvik eden sadece 5 özellik incelendi. Ancak başka faktörlerin de olduğu ve bu faktörlerin de hem metal varlığında hem de yokluğunda çalışılmasının yararlı olacağı kanısındayız.

Çalışmada yalnızca 5 ağır metal test edildi. Oysaki insan ve diğer canlılar için toksik olan çok sayıda ağır metal bulunmaktadır. Bakterilerin diğer metallere karşı etkinlikleri de test edilmelidir.

Çalışma, mevcut imkanlarla gerçekleştirildiği için 20 suşun da moleküler karakterizasyonu yapılamamış, sadece incelenen özellikler açısından en iyi olan 3 suşta moleküler karakterizasyon yapılmıştır. BAP veya TÜBİTAK projeleri ile desteklenerek daha ileri araştırmaların yapılması ve tüm suşların moleküler olarak karakterizasyonu yapılması önerilmektedir.

Bitki çimlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda sadece mısır bitkisi test edilmiştir. Bu çalışmaların farklı tür bitkiler üzerinde de hatta hibrit ya da genetiği değiştirilmiş bitkilerde de test edilmelidir.

Mısır çimlenmesine ve gelişimine olan etkinliği sadece bakır varlığında test edilmiş olup diğer ağır metallerin de varlığında bu çalışmaların laboratuvar şartlarında test edilmesi gerekmektedir.

Bitki çimlenmesi ve gelişimi üzerine yapılan çalışmaların daha da geliştirilerek ve optimize edilerek aynı veya diğer suşların da kullanılarak tekrardan test edilmelidir. Aynı sonuçlar alınan suşların ise arazi koşullarında test edilmesi gerekmektedir.

Bakterilerden sadece 5O5Y11 suşu bakır varlığında mısır gelişimine olan etkinliği test edilmiştir. Oysaki ön çalışmalarda bu suş kadar hatta daha iyi olan suşların bulunduğu ve bu suşların da aynı testlere tabi tutulup etkinliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bitki bakteri ve bakır birlikteliği çalışmaları laboratuvar şartlarında test edilmiştir. Bilindiği üzere invitro ve invivo çalışmaların sonuçları her zaman her suşta paralel olmayabilir. Bu nedenle bu suşların sera vedaha sonra arazi şartlarında da etkinlikleri test edilmelidir.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda uygun bulunan suşların; geniş çevre (farklı pH, sıcaklık ve tuz varlığında) koşullarında rahatça üreyebilen, bitki gelişimini teşvik eden rizoit bakteri (PGPR), ağır metalleri zararsız forma dönüştüren biyoremidant veya biyoabsorbant özelliklere sahip suşlar olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Böylece bu suşların yerli suş ve ticatri preparat olarak biyogübre üretiminde kullanılması sağlanmış olacağı düşünülmektedir.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda uygun bulunan suşların; geniş çevre (farklı pH, sıcaklık ve tuz varlığında) koşullarında rahatça üreyebilen, bitki gelişimini teşvik eden rizoit bakteri (PGPR), ağır metalleri zararsız forma dönüştüren biyoremidant veya biyoabsorbant özelliklere sahip suşlar olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Böylece bu suşların yerli suş ve ticatri preparat olarak biyogübre üretiminde kullanılması sağlanmış olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E., 1992.** Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, New York, ISBN: 978-0-08-091628-6.
- Abou Zeid, A, Hassanein, W, Salama, H. and Faht, G., 2009.** Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in egypt. Journal of Applied Sciences Research, 5(4), 372-383.
- Adesemoyel, A.O., Obini, M. and Ugoji, E.O., 2008.** Comparison of plant growth promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 423-426, DOI: 10.1590/S1517-83822008000300003
- Aksu, E. ve Yıldız, N., 2004.** Heavy Metal Stress and Tolerance of Plants. International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development. International Soil Congress on Natural Resource Management for Sustainable Development, 7-10 June, Erzurum, Turkey.
- Albarracin, V.G., Amoroso, M.J. and Abate, C.M., 2010.** Bioaugmentation of copper polluted soil microcosms with *Amycolatopsis tucumanensis* to diminish phytoavailable copper for *Zea mays* plants. Contents lists available at Science Direct Chemosphere, 79, 131-137.
- Alexander, M. 1999.** Biodegradation and bioremediation second edition. Academic Press New York., ISBN-13:978-0120498611.
- Altın, N. ve Bora, T. 2005.** Bitki gelişimini uyarıcı kök bakterilerinin genel özellikleri ve etkileri, Anadolu, Journal of Aarı 15 (2) 2005, 87-103.
- Antoun, H. and Prévost, Danielle., 2006.** Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Chapter 1. Canada.
- Aslantas, R., Cakmakci, R. ve Sahin, F., 2007.** Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Scientia Horticulturae, 111, 371-377.
- Aydoğan, M.N., Algur, Ö.M. ve Özdemir, M., 2013.** Isolation and Characterisation of Some bacteria and microfungus solving tricalcium phosphate. Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, 1(1), 11-20.
- Aygan, A., 2008.** Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, s.,186, 81.

- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Pukushima, K. and Campos-Takaki, G.M., 1993.** Bactericin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Applied Biochemistry and Biotechnology., 42, 1-7.
- Babalola, O.O., Osir, E.O., Sanni, A.I., Odhaimbo, G.D and Bulimo, W.D., 2003.** Amplification of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. African J. Biotechnol, 2, 157-160.
- Babich, H. and Stotzky, G., 1985.** Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. Environ Res., 36(1), 11-37.
- Baker, K.H. and Herson, D.S., 1994.** Bioremediation. McGraw - Hill, New York
Vida, Bioremediation an overview. Pure Applied Chemistry, 73, 1163-1172.
- Bakker, A.W. and Schippers, B., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield Reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growthstimulation. Soil Biology and Biochemistry, 19 (4), 451-457.
- Beauchamp, C.J., 1993.** Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. Phytoprotection, 71, 19–27.
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K.J. and Stepanok, V.V., 2001.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can. Journal Microbiol., 47, 642–652.
- Benimeli, C.S., Gonzales, A.J., Chaile, A.P. and Amoroso, M.J., 2007.** Temperature and pH effect on lindane removal by *Streptomyces* sp. M7 in soil extract. J. Basic Microbial, 47,468-473.
- Bergeron, L., and Burne, R.A., 2001.** Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. Infect. Immun, 69, 5395-5402. DOI:10.1128/IAI.69.9.5395-5402.200.
- Bergeron, R.J., Brittenham, G.M., Peter, H.H., Bergeron, R.J., Streiff, R.R., Wiegand, J., 1994.** A Comparative Evaluation of Iron Chelators in A Primate Model PERIOD. Bergeron, R.J. and Brittenham, G.M., Ed. The Development of Iron Chelators for Clinical Use. CRC Press. Boca Raton,. p. 373.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. and Samiyappan, R., 2004.** Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. Crop Prot., 23, 835-843. DOI:10.1016/j.cropro.
- Bilgehan, H., 2004.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 4. Baskı, İzmir.

- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2001.** Molecular Basis of Plant Growth Promotion and Biocontrol by *Rhizobacteria*. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 4, 343-350.
- Boukhalfa, H. and Crumbliss, A.L., 2002.** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Bio Metals*, 15, 325-339. DOI:10.1023/A:1020218608266.
- Boyer, JS., 1982.** Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-448.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme., F.W., 2000.** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974,** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore.
- Ceyhan, N. ve Esmeray, E., 2012.** Petrol Kirliliği ve Biyoremediasyon, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1), 95-101.
- Chen, P and Ting, Y.P., 1995.** Effect of heavy metal uptake on the electrokinetic properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 17(1), 107-12.
- Chihomvu, P., Stegmann, P. and Pillay, M., 2014.** Identification and Characterization of Heavy Metal Resistant Bacteria from the Klip Reaver. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8 (11), 1130-1140.
- Chiu, K.K., Ye, Z.H. and Wong, M.H., 2005.** Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. *Chemosphere*, 60, 1365-1375.
- Coneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenber P.C. and Winn, W.C., 1997.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott, Fifty ed., pp. 651-688 ve 1295-1395. ISBN. 0-397-51529-4.
- Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M. and Thamaraiselvi, K., 2007.** Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Matter*, 146, 270-277.
- Çakmakçı, R., Kantar, F Ve Algur, Ö.F., 1999.** Sugar beet and barley yield in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium*, Phosphaticum inoculation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162, 437-442.
- Çakmakçı, R., Kantar, F Ve Şahin, F., 2001.** Effect of N₂- fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 164(5), 527-531.

- Çakmakçı, R., Erdoğan, Ü.G., 2005.** Organik Tarım. Atatürk Üniversitesi İspir ,Yayın No: 2, 214s, Erzurum.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A ve Şahin, F., 2006.** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology Biochemistry*, 38, 1482-1487, DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.09.019
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F ve Erdoğan, Ü., 2007a.** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal Agriculture For*, 31, 189-199.
- Das, N. and Chandran, P., 2011.** Biodegradation of petroleum sludge and microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, review article, SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International, 13 p. Article ID 941810.
- De Freitas, J.R. Banerjee M.R and Germida, J.J., 1997.** Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but no phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology Fertility of. Soils*, 24, 358-364, DOI 10.1007/s003740050258.
- Demeyer, G., Audenaert, K. and Hofte, M., 1999.** *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 513-517, DOI:10.1023/A:1008741015912.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M., 2004.** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Aracishypoggaea* L.) by application of plant growth promoting Rhizobacteria. *Microbiol Res*, 159:371-394. DOI:10.1016/j.micres.
- Diaz., V. and Elena, M., 2007.** Biotechnological Production of Siderophores. *Soil Biology*, 12, 199-231, DOI:10.1007/978-3-540-71160-5-11.
- Dindar, E., Şağban, T. ve Başkaya, H.S., 2010.** Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, (15)2, 123-137.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S and Okon, Y., 2001.** Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust Journal Plant Physiol.*, 28, 871-879. DOI:10.1071/PP01074.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J.and Okon, Y., 2003.** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 107-149, DOI:10.1080/713610853

- Doğan M., 2003.** Şanlıurfa'da karakoyun deresi atık suları ile sulanan soğanda (*Allium cepa* L.) Toksik element birikimi üzerine bir araştırma. Ekoloji Çevre Dergisi, 12(48), 1-3. DOI:10.1094/PHYTO.1998.88.7.678.
- Dürüst, N., Dürüst, Y., Tuğrul, D.ve Zengin, M., 2004.** Heavy metal contents of pinus radiata trees of İzmit (Turkey). Asian Journal of Chemistry, 16(2), 1129-1134.
- Dworken, M. and J. Foster., 1958.** Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. Journal of Bacteriology, 75, 592-601.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G. and Nies, D.H., 2005.** Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 187, 2297-2307.
- El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A. and El-Yousser, A., 2003.** Evaluation of cytological effects of Zn⁺² in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. And *Triticum aestivum* L., Mutation Research, 537:29-41.
- Elsilk, S, El-shanshoury, A. and Ateya, S., 2014.** Accumulation of some heavy metals by metal resistant avirulent *Bacillus antracis* PS2010 isolat from Egypt. African Journal of Microbiology Research, 8(12), 1266-1276. DOI:10.5897/AJMR2013.6551.
- Erdem, B., 2013.** Mikrobiyal sideroforlar ve biyoteknolojideki uygulama alanları. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 3(8),77-88.
- Francis, I., Holsters, M. and Vereecke, D., 2010.** The Gram-positive side of plant-microbe interactions. Environ Microbiol., 1,1-12.
- Fürnkranz, M., Müller, H. and Berg, G., 2009.** Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. Journal of Plant Diseases and Protection, 116 (4), 149-155. ISSN 1861-3829.
- Gaur, A.C. and Ostwal, K.P., 1972.** Influence of phosphate dissolving *Bacilli* on yield and phosphate Uptake of wheat crop. Indian Journal Exp. Biology, 10: 393-394.
- Glick, B.R., 2005.** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters, 251, 1-7. DOI:10.1016/j.femsle.
- Gordon, R. E., 1973.** The genus *Bacillus*. In Handbook of Microbiology, vol. 1, Organismic Microbiology. Ed. Laskin, A.I. and Lechevalier, H. A., The Chemical Rubber Co. Press. Cleveland, pp. 71-88.
- Gupta, A, Phung LT, Chakravarty, L. and Silver, S., 1999.** Mercury resistance in *Bacillus cereus* RC607: transcriptional organization and two new open reading frames. Journal Bacterial.,181(22),7080-7086.

- Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., ve Çobanoğlu, D., 2004.** Ağır metal iyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia sp.* Bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri. F.Ü. Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi, 16(2), 177-182.
- H. Rodríguez and R. Fraga.,1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Haktanır, K. and Arcaç, S., 1998.** Çevre Kirliliği. Ankara Üni. Ziraat Fak. Toprak Bölümü, Ankara Üni. Yayın No: 1503, Ders Kitabı: Ankara. 457s.
- Hammer, N.D. and Skaar, E.P., 2011.** Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65, 129-147. DOI:10.1146/annurev-micro-090110-102851, DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102851.
- Holan, Z.R., Volesky, B. and Prasetyo, I., 1993.** Biosorption of cadmium by biomass of marine algae, *Biotechnol.Bioeng.*, 41, 819-825.
- Huang, C.P., Huang, C.P. and Mürehart, A.L., 1990.** The removal of Cu (II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Water Research*, 24, 433-439, DOI:10.1016/0043-1354(90)90225-U.
- Jacobsen BJ, Zidack N.K. and Larson, B.J., 2004.** The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology*, 94, 1272-1275.
- Jacobsen, C.S., 1997.** Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil*, 189, 139-144.
- Jia,Y.J., Kakuta, Y., Sugawara, M., Igarashi, T., Oki, N., Kisaki, M., Shoji, T., Kanetuna, Y., Horita, T., Matsui, H. and Honma, M., 1999.** Synthesis and degradation of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicilliumcitrinum*. *Biosci Biotechnol Biochemistry.*, 63, 542-549. DOI:10.1271/bbb.63.542.
- Jiang, Y., Zhuang, Q.L., Zhang, Y.G. and Liang, W.J., 2008.** Distribution characteristics of soil phosphorus in maize belt farmlands of Northeast China. *Article in Chinese*. 19(9), 1931-1936.
- Kacar, B. and Katkat, V., 2006.** Bitki Besleme. Nobel Yayınları, No:849.
- Kacar, B. 2012.** Bitki, toprak ve gübre analizleri, Nobel Kitap, Ankara, 200-290.
- Kandan A., Commare R.R., Nandakumar R., Ramiah M., Raguchander T. and Samiyappan R., 2002.** Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against tomato spotted wilt virus in tomato. *Folia Microbiologica*, 47, 121- 129. DOI:10.1007/BF02817669.

- Kandan, A., Ramiah, M., Vasanthi, V.J., Radjacommare, R., Nandakumar, R., Ramanathan, A. and Samiyappan, R., 2005.** Use of *Pseudomonas fluorescens* based formulations for management of tomato spotted wilt virus (TSWV) and enhanced yield in tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 15 (6), 553-569. DOI:10.1080/09583150500088546.
- Kandler, O. and Weiss, N., 1986.** Regular, nonsporing gram positive rods, in: P.H.A Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1259.
- Kapulnik, Y., 1996.** Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria. In Waisel, Y., Marcel Dekker, N.Y. Eshel, A. and Kafkafi, U., (Ed.). *Plant Roots The Hidden Half*, pp. 769-781, 1002.
- Karapire M. and Özgönen H., 2013.** Doğada yararlı mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler ve tarımsal üretimde önemi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 149-157.
- Karthikeyan, G., Doraisamy, S. and Rabindran, R., 2009.** *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance against urdbean leaf crinkle virus in blackgram (*Vigna mungo*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(3), 201-212. DOI:10.1080/03235400600982519.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Damodaran, T., and Soorianathasundaram, K., 2007.** Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1087-1098. DOI:10.1016/j.soilbio.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Ramasamy, S., Damodaran, T. and Soorianathasundaram, K., 2008.** Induction of systemic resistance in banana (*Musa spp.*) against Banana bunchy top virus (BBTV) by combining chitin with root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *European Journal Plant Pathology*, 120, 353-362. DOI: 10.1007/s10658-007-9223-8.
- Kefeng, L. and Ramakrishna, W., 2011.** Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1-2), 531-539. DOI:10.1016/j.jhazmat.
- Kennedy, C.D. and Gonsalves, F.A.N., 1987.** The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38, 800-817.
- Khan, M. H., 2007.** Governance, Economic Growth and Development since the 1960s DESA. Working Paper No. 54 ST/ESA/2007/DWP/54.
- Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P.A., 2007.** Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review. *Agronomy for Sustainable Development*, (27)1, 29-43.

- Kılıç, K.N. ve Dönmez, G., 2008.** Mikroorganizmalarda ağır metal stresine yanıtın proteom analizi ile araştırılması. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 6(2), 27-33.
- Kır, İ., Özcan, S.T. ve Tuncay, Y., 2007.** Kovada Gölü'nün su ve sedimentindeki bazı ağır metallerin mevsimsel değişimi. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 24,1-2.
- Kirkby, E.A. and Mengel, K., 1967.** Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. Plant Phys., 42, 6-14.
- Kloepper, J.W., 1993.** Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In Metting, F.B., Marcel Dekker, N.Y. (Ed). Soil Microbial Ecology, 646, 255-273. ISBN:0-8247-8737-4.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, K. and Schroth, M.N., 1988.** *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences, 60-64.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R.M., 1989.** Free-living bacterial inoculants for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol., 7, 39-44.
- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H., and Leggett, M.E., 1989.** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. Advances in Agronomy, 42, 199-228.
- Kumar, R.N. and Nagendran, R., 2009.** Fractionation behavior of heavy metals in soil during bioleaching with *Acidithiobacillus thiooxidans*. Journal Hazardous Materials, 169, 111-926.
- Lasat, M.M., 2002.** Phyto extraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. Journal of Environmental Quality, 31, 109-120.
- Lazarovits, G. and Nowak, J., 1997.** *Rhizobacteria* for improvement of plant growth and establishment. Horticultural Science, 32, 188-192.
- Logan, N. A., 1988,** *Bacillus* species of medical and veterinary importance. Journal of Medical Microbiology, 25, 157-165.
- Lopez, A, Lazaro, N, Priego, J M and Marques, A. M., 2000.** Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24,146-151.
- Lynch, J.M. and Bragg, E., 1985.** Microorganisms and soil aggregate stability. Advances in Soil Science, (2), 287-297.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.R., 2004.** Application of Free Living Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*. Antonie van Leeuwenhoek. Kluwer Academic Publishers, Printed in Netherlands. 86, 1-25,

- Ma., W., Sebastianova., S., Sebastian., J., Burd., G.I., Guinel, F. and Glick, B.R., 2003a.** Prevalence of 1-aminocyclopropa-1- carboxylate in deaminase in *Rhizobia* spp., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 285–291.
- Mahaian, S. and Tuteja, N., 2005.** Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Malik, A., 2004.** Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International*, 30, 261-278.
- Malkoç, S., Güven, K. ve Koparal, A.S., 2009.** Metal-tolerant bacteria from the ceramic industry wastewater treatment plant sludge. *Microbiologia BALKANICA 2009, 6th Balkan Congress of Microbiology, Ohrid, Macedonia, Abstract Book* p. 166.
- Mallawatantri, A.P., Mcconkey, B.G. and Mulla, D.J., 1996.** Characterization of pesticide sorption and degradation in macropore linings and soil horizons of thatuna silt loam. *Journal of. Environmental Quality*, 25, 227-235.
- Mark, G.L., Morrissey, J.P., Higgins, P. and O'gara, F., 2006.** Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 167-177.
- Martinez, J.S., Franklin, J.N.C., Mann, E.L., Martin, J.D., Raymond, K.M. and Denz, E., 2004.** Biochemical and Physical Properties of Siderophores. In: J.H. Crosa, A.R. Mey, S.M. Payne (Eds.), *Iron Transport in Bacteria*, ASM Press, Washington. pp.3-17.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Defago, G. 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the rootcolonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84, 139-146.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Defago, G., 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the rootcolonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84, 139-146.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. and Defago, G., 1998.** Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88, 678-684.
- Miethke, M. and Marahiel, M., 2007.** Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Molecular Biology Reviews*, 71, 413-451. DOI:10.1128/MMBR.00012-07.
- Minami, R., Uchiyama, K., Murakami, T., Kawai, J., Mikami, K., Yamada, T., Yokoi, D., Ito, H., Matsui, H. and Honma, M., 1998.** Properties, sequence, and

- synthesis in *Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *Journal Biochemistry*, 123, 1112–1118.
- Mittler, R., 2006.** Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11, 15-18.
- Mowil, L. and Gadd, G.M., 1984.** Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*. *J. General. Mikrobiology*, 130, 277-284.
- Munzuroğlu, Ö. Ve Karataş, F., 2000.** Kayısı çeşitlerindeki A, E ve C vitaminleri ile B-karoten ve selenyum düzeylerinin araştırılması. XV. Ulusal Biyoloji Kongresi Uuslararası Katılımlı, Ankara, Eylül.
- Murakami, M. and Ae, N., 2009.** Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 162, 1185– 1192.
- Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster D.J., Sikora, E.J., Polston J.E. and Kloepper, J.W., 2000.** Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against Tomato mottle virus. *Plant Disease*, 84, 779-784. DOI:10.1094/PDIS.2000.84.7.779.
- Nies, D.H., 2003.** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313-339.
- Ok, Y.S., Yang, J.E., Zhang, Y.S., Kim, S.J. and Chung, D.Y., 2007.** Heavy metal adsorption by a formulated zeolite-Portland cement mixture. *Journal Hazardous Materials*, 147, 91–96.
- Oves, M., Khan, M.S. and Zaidi, A., 2013.** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20, 121–129.
- Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K., 2005.** Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science*, 89, 170-180.
- Pardo, R., Hergedas, M, Barrado, E. and Vega, M.,2003.** Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 26-32.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R., 2001.** Levels of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Canadian Journal Microbiology*, 47, 368-372.
- Podile, A.R. and Kishore, K.G. 2007.** Plant Growth- Prompting Rhizobacteria. In *Plant-Associated Bacteria*. Ed. Gnanamanickam, S.S.. Dordrecht, S., The Netherlands, pp. 195-230.

- Ratledge, C. and Dover, L.G., 2000.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 54, 881-941. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.881
- Raupach, G.S., Liu, L. , Murphy, J.F., Tuzun, S. and Kloepper, J.W., 1996.** Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*, 80, 891-894.
- Raupach, G.S. and Kloepper, J.W., 1998.** Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88, 1158-1164.
- Reeves, R. D. and Baker, A.J.M., 1999.** Metal-accumulating plants. In *Phytoremediation of toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, Eds, Raskin, I., Ensley, B.D., pp 193-229, John Wiley and Sons Inc, New York, NY.
- Resca, R., Basaglia, M., Poggiolini, S., Vian, P., Bardin, S., Walsh, U.F., Enriquez, C.M., O'gara, F., Nuti, M.P., Casella, S. and Peruch, U., 2001.** An integrated approach for the evaluation of biological control of the complex *Polymixa betae*/Beat necrotic yellow vein virus, by means of seed inoculations. *Plant and Soil*, 232, 215-226.
- Richardson, A.E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9),. 897-906.
- Rodriguez, H. and Fraga, R., 1999.** Phosphate solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339. DOI:10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- Rout, G.R. and Das, P., 2003.** Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23, 3-11.
- Ryu C.M., Murphy, J.F., Mysore K.S. and Kloepper, J.W., 2004.** Plant growth promoting *Rhizobacteria* systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal*, 39: 381–392. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02142.x
- Ryu, C.M., Kang, B.R., Han S.H., Cho S.M., Kloepper J.W., Anderson A.J. and Andkim, Y.C., 2007.** Tobacco cultivars vary in induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus and growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* O6 and its *gacS* mutant. *European Journal Plant Pathology*, 119, 383-390.
- Sağlam, N. ve Cihangir, N., 1995.** Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbsiyonu Çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*. 11, 157-161.

- Sar, P., Kazy, S.K., Asthana, R.K. and Singh, S.P., 1999.** Metal adsorption and desorption by lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 44, 101-110.
- Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O.P., 2004.** Developments in the use of *Bacillus species* for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1-17.
- Scott, A. and Karonjkar, A.M., 1992:** Repeated cadmium biosorption by regenerated *Enterobacter aerogenes* biofilm attached to activated carbon. *Biotechnology Letters*, 14, 8, 737-740.
- Selvi, A.T., Anjugam, E., Devi, R.A., Madhan, B., Kannappan, S. and Chandrasekaran, B., 2012.** Isolation and characterization of bacteria from tannery effluent treatment plant and their tolerance to heavy metals and antibiotics. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 3(1), 34-41. ISSN: 09755845.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E., Wang-Pruski, G., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R. and Nowak, J., 2005.** *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1187–1192.
- Sharma, P. and Dubey, R.S., 2005.** Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 35-52.
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J., 1994,** Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6), 2023-2030.
- Singh A. and Ward, O.P., 2004** *Soil Biology. Volume 2, Biodegradation And Bioremediation* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 213-234.
- Skaar, E.P., 2010.** The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens*, 6, 949-1000.
- Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E. 2006.** The genus *Bacillus* nonmedical, In: Drowkin, M. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stachkeprandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*, 3th ed., Springer-Science-Business Media LLC, Singapore, Volume 4, pp. 530–654.
- Sonnleitner R., Lorbeer, E. and Schinner, F., 2003b.** Effects of straw, vegetable oil, and whey on physical and microbiological properties of a chernozem. *Applied Soil Ecology*, 22, 195-204.
- Sossé, B.A., Genet, P., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L.M., Epron, D. and Badot, P.M., 2004.** Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, (166), 1213-1218.

- Sönmez, S., Kaplan, M., Sönmez, N.K. ve Kaya, H., 2006.** Topraktan yapılan bakır uygulamalarının toprak pH'sı ve bitki besin maddesi içerikleri üzerine etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(1), 151-158.
- Sönmez, İ., Kaplan, M. ve Sönmez, S., 2008.** Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri. Batı Akdeniz ve Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 25(2), 40-50.
- Sturz, A.V. and Nowak, J., 2000.** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops, Applied Soil Ecology, 15, 183-190. DOI:10.1016/S0929-1393(00)00094-9.
- Subba, R.N.S., 1982.** Advances in agricultural microbiology. In: Subba Rao, N.S., Ed. Studies in the Agriculture and Food Sciences. London: Butterworth Scientific, pp. 295-303.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G.N., Gangwar, S.K. and Ghosh, J.K., 2000.** Effect of Foliar Application of Azotobacter, Azospirillum and Beijerinckia on Leaf Yield and Quality of Mulberry (*Morus Alba*). Journal of Agricultural Science, Cambridge, 134, 227-234.
- Şahin, F., Çakmakçı, R. ve Kantar, F., 2004.** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant and Soil, 265, 123-129.
- Şahinkaya H., 1967.** Toprak Mikrobiyolojisi ve Memleketimiz İçin Mikrobiyal Gübrelemenin Önemi. Mikrobiyoloji Bülteni, 2, 234-245.
- Taubman, S., 1992,** Genus *Bacillus*, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356.
- Tenover, F.C. and Gowan, J.E., 1996.** Reasons for the emergence of antibiotic resistance. The American Journal of the Medical Sciences, 311(1), 9-16.
- Thomashow, L.S. ve Weller, D.M., 1995.** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey G, Keen N (eds) Plant Microbe Interactions, vol 1. pp. 187-235. Chapman and Hall, New York, DOI:10.1007/978-1-4613-1213-0-6.
- Ting, YP., F. Lawson, and Prince, L.G., 1991.** Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: II Multi-ion stiation, Biotechnol. Bioeng., 37, 445-455.
- Tisdall, J.M., Smith, S.E. ve Rengasamy, P., 1997.** Aggregation of soil by fungal hyphae. Australian Journal of Soil Research, 35, 55-60.
- Tunalı, S., Çabuk, A. ve Akar, T., 2006.** Removal of lead ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. Chemical Engineering Journal, 115, 203-211.

- Tunalı, S., Akar, T., Özcan, A.S., Kiran, I. Ve Özcan, A., 2006.** Equilibrium and kinetics of biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Cephalosporium aphidicola*. Separation and Purification Technology, 47(3), 105-112. DOI:10.1016/j.seppur.06.009.
- Turnbell, P.C.B. and Kramer, J. M., 1991,** *Bacillus*: Manual of clinical Microbiology. Fifth Edition, Balows, A., Hauster, J. R., Herman, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J., American Society of Microbiology, Washington D. C., pp. 296-303.
- Tünger A., Çavuşoğlu C. ve Korkmaz, M., 2005.** Asya Mikrobiyoloji, Asya Tıp Kitabevi, 4. Baskı, 321-356s.
- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H. and Coudret, A., 2005.** Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. Chemosphere, 59, 1005-1013.
- Van Assche, F.V. and Clijsters, H., 1990.** Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environment 13, 95-206.
- Vessey, J.K., 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil, 255, 571–586.
- Wang, C., Knill, E., Glick, B.R. and Défago, G., 2000.** Effect of transferring 1-aminocyclopropane -1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. Canadian Journal of Microbiology., 46, 898-907.
- Wani, A.P., Khan, S.M. and Zaidi, A., 2008.** Impact of zinc-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on lentil grown in zinc-amended soil. Agronomy for Sustainable Development. 28(3), 449-455. DOI:10.1051/agro:2007048.
- Weckhuysen, B. M., 2004.** In-situ Spectroscopy of Catalysts. Weckhuysen, B.M., Ultraviolet-Visible Spectroscopy, Chapter 9 ve 12. Department of Inorganic Chemistry and Catalysis, Debye Institute, Utrecht University, Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht, The Netherlands. American Scientific Publishers, p. 255-270. ISBN: 1-58883-026-8
- Winkelmann, G., 2002.** Microbial siderophore mediated transport. Biochemical Society Transactions, 30, 691-696. DOI:10.1042/BST030069.
- Yaldız, G. ve Şekeroğlu, N., 2013.** Tıbbi ve aromatik bitkilerin bazı ağır metalleretepkisi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(1), 80-84.
- Yazgan, A., Özcengiz, G. and Alaeddinoğlu, G., 1993.** Studies on metal resistance system in *Kluyveromyces marxianus*, Biological Trace Element Research, 38, 117-127.

Zheng, G. and Slavik, M. F., 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Letters in Applied Microbiology, 28, 363-367.

Zolgharnein, H., Azmi, M., Saad, M., Mutalib, A. and Mohamed, C.,2007. Detection of plasmids in heavy metal resistance bacteria isolated from the Persian Gulf and enclosed industrial areas. Iranian Journal of biotechnology. 5, 232-239.

URL-1 2015 <http://www.food-info.net/tr/bact/bacer.htm>(24.12.2014).

URL-2 2015

https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=22&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjABOBQ&url=http%3A%2F%2Fwww.cilginbiyologlar.com%2Fforum%2Fattachments%2Ftoprakmikrobiyolojisi.doc&ei=1UYvU_XfHIGVyAOSs4CADA&usg=AFQjCNH1LQZXTxH84QON1i_kR2u3sOArDA(13.05.2015).

URL-3 2015 http://www.dersdoktoru.com/ders_notu_gosterB.asp?id=143(25.05.2015).

URL-4 2015 http://www.dersdoktoru.com/ders_notu_gosterB.asp?id=143(13.06.2015).

URL-5 2015 <http://umitkaradeli.blogcu.com/aktinomisetler/2078348>(16.06.2015).

EKLER

Ek 1. 505Y11 nolu suşun sekans analizinden gelen baz dizini

GTCGAGCGAATGGATTAAGAAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAG
GCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCT
AGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
GAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGG
GCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG
TTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCT
AATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT
GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGTCGGTGGGGTAACCTTTAT

EK 2. 501 nolu suşun sekans analizinden gelen baz dizini

CATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATT
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT

ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGA
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTCTA
GAGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGA
GGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
CGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT
AACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCC

EK 3. 509 nolu suşun sekans analizinden gelen baz dizini

TGCAAGTTCGAGCGAATGGATAAGAAGCTTGCTTTTATGAATTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTG
AAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTTTGATGTGAA
AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC
AGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTCTAGAGA
TAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGAT
CTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGG
AGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGAACACC
CGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAGAAGCCAGCCGC

ÖZGEÇMİŞ

Ülkü Zeynep ÜREYEN, 15.01.1989 tarihinde Antalya ili Manavgat ilçesinde dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Serik/Antalya Kazım Karabekir ilköğretim okulunda lise eğitimini yine Serik/Antalya'da Serik Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında başladığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji Lisans'ını 2012 yılında tamamladı. 2012 yılında başladığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Dalı "Yüksek Lisans" eğitimini halen sürdürmektedir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

1. Bozdeveci, A., Uzunalioglu, E., Yılmaz, Y., Üreyen, Ü.Z., Alpay Karaoğlu Ş. Toprağın Gübreleme Öncesi ve Sonrası Mikroflorası ve Floranın Antimikrobiyal Özellikleri. Eskişehir/Türkiye, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014. M-P2-6, p1375
2. Üreyen, Ü.Z., Uzunalioglu, E., Bozdeveci, A., Alpay Karaoğlu, Ş. Toprak Kökenli Bakterilerde Metal Toleransı ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Faktörlerin Araştırılması. Eskişehir/Türkiye, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014. M-P3-39, p: 1453
3. Uzunalioglu, E., Bozdeveci, A., Ayhan, E. Çilingir, G., Üreyen, Ü Z., Alpay Karaoğlu, Ş. Meyvelerden İzole Edilen *Bacillus*'ların Tanımlanması ve Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. 22 Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, TÜRKİYE.
4. Alpay Karaoğlu, Ş., Üreyen, Ü.Z., Uzunalioglu, E., Güzel, Ş., Bozdeveci, A., Bilgin, A. Determination of soil borne *Bacillus* sp. 5O5Y11 strain's bioremediation features and effect on growth of *Zea Mays* in the presence of copper 1st Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015), 01-05 June 2015, Baku, Azerbaijan. Oral Presentation-3
5. Üreyen, Ü.Z., Yeşilyurt, A.M., Uzunalioglu, E., Güzel, Ş., Alpay Karaoğlu, Ş. *Bacillus* sp. 5O5Y11 strain ameliorates copper stress induced damages in maize seedlings 1st Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015), 01-05 June 2015, Baku, Azerbaijan. PP-94