

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİ KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve KURŞUN VARLIĞINDA
ZEA MAYS'İN GELİŞİMİNE ETKİSİ**

EMEL UZUNALIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU

TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. ALİ BİLGİN
DOÇ. DR. RABİYE TERZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2015

Her Hakkı Saklıdır

T.C
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE KURŞUN VARLIĞINDA *ZEA*
***MAYS*'İN GELİŞİMİNE ETKİSİ**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Emel UZUNALIOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09/07/2015 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Ali BİLGİN	
Üye	: Doç. Dr. Rabiye TERZİ	



Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarlarında 2013-2015 yılları arasında yapılmıştır. Çalışma Pazar MYO bahçesindeki hastalıklı meyvelerden izole edilen, geleneksel ve moleküler metotlarla tanımlanan, bazı enzim aktiviteleri belirlenen, bitki gelişimini teşvik eden özellikleri ve ağır metallere karşı toleransları araştırılan 34 adet *Bacillus* suşunu kapsamaktadır. En iyi özelliklere sahip olan suşların biyoremediasyonda ve bitki gelişiminde teşvik edici ajan olarak kullanımları muhtemel olacağı düşünülmektedir.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca hiçbir şekilde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, değerli bilgi birikimiyle sürekli bizlere bir şeyler sunmaya çalışan, sabrı ve anlayışıyla her zaman yanımda olan, zor günlerimde bana kol kanat veren çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ali BİLGİN, Prof. Dr. Turan YÜKSEK ve Doç. Dr. Elif SEVİM'e, başta Şule GÜZEL olmak üzere her zaman desteklerini gördüğüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, olmaya çalışan başta tez arkadaşım Ülkü Zeynep ÜREYEN ve Yıldız YILMAZ olmak üzere yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma en içten sevgilerimi sunarım. Bu aşamaya gelinceye kadar bana destek olmaya çalışan her zaman yanımda olan öncelikle annem olmak üzere aileme çok teşekkür ediyorum.

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi 2015.53002.102.03.01 numaralı proje olarak RTEÜ-BAP tarafından desteklenmiştir. RTEÜ-BAP birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Emel UZUNALIOĞLU

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Bitki Kökenli *Bacillus*’ların Biyoremidant Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kurşun 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. 09/07/2015

Emel UZUNALIOĞLU

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

ÖZET

BİTKİ KÖKENLİ *BACILLUS*'LARIN BİYOREMİDANT ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve KURŞUN VARLIĞINDA *ZEA MAYS*'İN GELİŞİMİNE ETKİSİ

Emel UZUNALIOĞLU

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

Çalışmada Pazar MYO bahçesindeki meyvelerden izole edilen 34 izolatın tanımlanması, bitki gelişimini teşvik eden özelliklerinin belirlenmesi, metal toleransları (Pb, Cu, Ag, Zn), kurşun varlığında mısır bitkisinin çimlenmesine ve gelişmesine olan katkısının araştırılması planlandı. İzolatların tümünün Gram pozitif sporlu (*Bacillus* sp.) bakteri oldukları, tümünün geniş sıcaklık ile pH aralığında, % 85'inin % 10 tuz varlığında iyi üreyebildikleri, amilaz, nitrat ve güçlü lesitinaz aktivitesine sahip oldukları belirlendi. Bitki gelişimini teşvik eden özellikleri incelendiğinde çoğunun güçlü siderofor üretimi, fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz ve iyi düzeyde indol asetik asit aktivitesi gözlemlendi. Ağır metallerin 1 mM konsantrasyonlarında tümü çinko ve kurşun, 29'unun gümüş ve bakır varlığında ürettiği, 10 mM kurşun varlığında ise yalnızca 10 suşun üreyebildiği belirlendi. Tüm özellikler açısından en uygun 3 suşun (MP6A, MP7B ve MP9D), kurşun MIC ve MBC değerleri sırasıyla 12,5-25 ile >100 mM aralığında belirlendi. Kurşun varlığında geniş pH aralığında üreyebildikleri ancak logaritmik sürenin uzadığı gözlemlendi. Suşların kurşun varlığında mısır çimlenme başarısına etkisi araştırıldı ve en uygun suş olarak MP7B seçildi. Seçilen bu suş geleneksel ve moleküler yöntemlerle *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı. Kurşun varlığında ve yokluğunda mısır bitkisinin gelişimine etkinliği ile biyoremidant/adsorbsiyon özelliği ICP-OES analizi ile araştırıldı. MP7B (*Bacillus thuringiensis*) suşunun kurşunu absorbe ederek mısır bitkisinin gelişimini teşvik edebildiği, dolayısıyla potansiyel biyoremidant suş olabileceği belirlendi.

2015, 156 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoremidasyon, *Bacillus*, Ağır Metal, Bitki gelişimi, Mısır.

ABSTRACT

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

Emel UZUNALIOĞLU

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

In this study it was planned to investigate the identification of the 34 isolated strains that isolated from Pazar vocational school garden, fruit, determination of the features that promotes the growth of plants, metal tolerances (Pb, Fe, Cu, Ag, Zn), contribution to the germination and growth of corn plants in the presence of lead. 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, amylase, nitrate and strong cithinase activity. When the features that promote the growth of plants were analyzed, strong siderophore production, phosphate solubility, ACC deminase and good level of indole asetic acid were observed at most of them. Heavy metals 1 mM concentration zinc and lead increased all isolates, 29 strains increased in the presence silver and copper, In the presence of 10 mm lead it was identified could only grow 10 strains. For all features, the most appropriate 3 strains, were defined as lead MIC and MBC respectively valued between 12.15- 25 and >100 mM. It is observed that in the presence of lead 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 lead was investigated and the most suitable strain was choosen as MP7B. By the traditional and moleculer methods, it was defined as *Bacillus thuringiensis*. The effectiveness of the presence and absence of lead to the growth of corn plant and the features of bioremidant/absorption was investigated by ICP-OES analysis. MP7B strains that can promote the growth of maize plants by absorbing lead therefore, may were identified potential biyoremidant strains.

2015, 156 pages

Keywords: Bioremediation, *Bacillus*, Heavy metal, Lead, Maize.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLULAR DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler.....	3
1.2.1. <i>Bacillus</i> 'ların habitatı.....	5
1.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri.....	6
1.3. Ağır Metal Kirliliği.....	7
1.4. Ağır metallerin Çevreye Bulaşma Yolları.....	9
1.5. Kurşun (Pb).....	11
1.6. Bitkilerin Ağır Metal Toksikitesine Tolerans Mekanizmaları.....	13
1.7. Biyoremidasyon ve Fitoremidasyon	14
1.8. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (PGPR).....	17
1.9. Bitki Gelişimini Teşvik Edici <i>Bacillus</i> 'ların Özellikleri.....	18
1.10. Siderofor ve Metal Toleranslı Siderofor Üreten Bakteriler.....	19
1.11. Literatür Özeti.....	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1. Materyal.....	28
2.1.1. Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri.....	28
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Suşlar	29
2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı	30
2.2.1. Müller Hinton Agar (MHA) Katı ve Sıvı Besiyerleri.....	30
2.2.2. Leura-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri.....	30
2.2.3. Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) Besiyeri.....	30
2.2.4. İndol Besiyeri.....	31
2.2.5. Metil Red-Voges Proskauer Besiyeri.....	31

2.2.6.	Nitrat Besiyeri.....	31
2.2.7.	İki Şeker (KIA) Besiyeri.....	31
2.2.8.	Sitrat Besiyeri.....	31
2.2.9.	Lesitinaz Besiyeri.....	32
2.2.10.	Üreaz Besiyeri	32
2.2.11.	Karboksil Metil Selülaz (CMC) Besiyeri	32
2.2.12.	Proteaz Besiyeri	32
2.2.13.	Amilaz Besiyeri	32
2.2.14.	Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri	33
2.2.15.	Hareket Besiyeri	33
2.2.16.	Tuz Tolerans Besiyeri	33
2.2.17.	Fosfat Besiyeri	33
2.2.18.	ACC (1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat) Deaminaz Besiyeri.....	33
2.2.19.	Siderofor Besiyeri.....	34
2.2.20.	IAA (İndol Asetik Asit) Besiyeri.....	35
2.2.21.	Amonyum Üretim Besiyeri.....	35
2.2.22.	Metal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	35
2.2.23.	Farklı pH Aralıklarında Pb'li ve Pb'siz MHB Besiyerlerinin Hazırlanışı ...	36
2.2.24.	Spektrofotometrik Ölçümler	36
2.2.25.	Çalışmada Kullanılan Mısır Tohumu ve Toprak İçeriği	36
2.3.	Çalışmada Kullanılan Ayıraçlar, Solüsyonlar ve Boyalar	37
2.4.	Yöntem	38
2.4.1.	Mikroorganizma Karakterizasyon Çalışmaları.....	38
2.4.1.1.	Mikroorganizmaların Canlandırılması.....	38
2.4.2.	İdentifikasyon İçin Uygulanan Biyokimyasal Testler.....	39
2.4.2.1.	İndol Deneyi.....	39
2.4.2.2.	Metil Red-Voges Proskauer Deneyi.....	39
2.4.2.3.	Nitrat Deneyi.....	40
2.4.2.4.	İki Şeker (KIA) Testi.....	40
2.4.2.5.	Sitrat Testi	40
2.4.2.6.	Oksidaz Testi	41
2.4.2.7.	Katalaz Testi	41
2.4.2.8.	Sıcaklık Üreme Aralığının Saptanması	41

2.4.2.9.	pH Üreme Aralığının Saptanması	41
2.4.2.10.	Tuz Tolerans Testi	42
2.4.2.11.	Hareket Testi	42
2.4.3.	<i>Bacillus</i> Suşlarının Enzim Aktivitelerilerinin Belirlenmesi	42
2.4.3.1.	Lesitinaz Testi	42
2.4.3.2.	Üreaz Testi	43
2.4.3.3.	Karboksil Metil Selüloz (CMC) Testi	43
2.4.3.4.	Proteaz Testi	43
2.4.3.5.	Amilaz Testi	43
2.4.3.6.	Jelatin Hidrolizasyon Testi	44
2.4.4.	Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu	44
2.4.4.1.	Genomik DNA İzolasyonu	44
2.4.4.2.	16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	45
2.4.5.	Bakterilerin Bitki Gelişimine Etki Eden Faktörlerin Araştırılması	46
2.4.5.1.	Fosfat Çözünürlüğü Testi	46
2.4.5.2.	ACC (1-Aminosiklopropan-1-Karboksilat) Deaminaz Testi.....	46
2.4.5.3.	Siderofor Üretimi Testi.....	46
2.4.5.4.	IAA (İndol Asetik Asit) Testi.....	46
2.4.5.5.	Amonyum Üretim Testi	47
2.4.6.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Araştırılması	47
2.4.6.1.	Bakterilerin Metalli Katı Besiyeri Ortamında Üretimleri.....	47
2.4.6.2.	Sıvı Besiyeri Ortamında Kurşun Toleransının Araştırılması.....	48
2.4.6.3.	Bakterilerde Kurşun Minimum İnhibisyon (MIC) ve Minimum Bakterisit (MBC) Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	48
2.4.6.4.	Bakterilerin Pb'li ve Pb'siz MHB Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	49
2.4.6.5.	Spektrofotometrik Yöntemlerle Belirlenmesi.....	49
2.4.7.	Bitki Denemeleri.....	50
2.4.7.1.	Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumlarında Çimlenme Deneyi.....	50
2.4.7.2.	Saksı Deneyi.....	51
2.4.7.3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> MP7B Suşunun Metal Absorbsiyonunun Belirlenmesi.....	53
2.4.7.4.	ICP-OES'de Kurşun Metal Ölçümü için Yakma İşlemlerinin Yapılışı.....	54
2.4.8.	İstatistik Analizler.....	55
3.	BULGULAR.....	56

3.1.	Bakterilerin Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	56
3.2.	Suşların Bazı Enzim Aktiviteleri ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özellikleri	61
3.3.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi	66
3.4.	Kurşun Varlığında ve Yokluğunda Farklı pH'larda Bakterilerin Üreme Eğrisi	70
3.5.	MP7B Suşunun Kurşun Adsorbsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi	72
3.6.	Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı.....	75
3.7.	Kurşun Varlığında Mısır Bitkisi Gelişimi ve ICP-OES Analizi.....	81
3.7.1.	Kurşun Varlığında Mısır Saksı Deneyi Sonuçları.....	81
3.8.	Saksı Deneyinde Kurşunun ICP-OES Analizi Sonuçları.....	90
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	96
4.1.	Bakterilerin Tanımlanması	96
4.2.	Suşların Enzim Aktiviteleri ve Bitki Gelişimini Teşvik Edici Özellikleri ...	98
4.3.	Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi.....	103
4.4.	MP7B Suşunun Kurşun Absorbsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	108
4.5.	Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı.....	110
4.6.	Kurşun Varlığında Mısır (Saksı Deneyi) Bitkisi Gelişimi ve ICP-OES Analiz.....	113
4.6.1.	Kurşun Varlığında Mısır Saksı Deneyi Sonuçları	113
5.	ÖNERİLER.....	121
	KAYNAKLAR.....	123
	EKLER.....	141
	ÖZGEÇMİŞ.....	143

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Ağır metalle kirlenmiş toprakların fitoekstraksiyonu için siderofor üreten bakterilerin rolü	20
Şekil 2.	Bitki-mikroorganizma etkileşimi	21
Şekil 3.	Bazı izolatların MHA besiyerinde koloni morfolojileri ve mikroskopileri	57
Şekil 4.	Bakterilerde lesitinaz ve proteaz testi görüntüsü	63
Şekil 5.	Demir içeren besiyerinde siderofor üretiminin belirlenmesi	63
Şekil 6.	Fosfat içeren besiyerinde fosfataz enzimi aktivitesi	64
Şekil 7.	Amonyum sülfat çözünürlüğü aktivitesinin belirlenmesi	64
Şekil 8.	Bakterilerde ACC deaminaz aktivitesinin varlığı	64
Şekil 9.	IAA aktivitesinin belirlenmesinde eliza plakalarından bir görünüm.	65
Şekil 10.	Farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat, bakır sülfat, çinko klorür ve kurşun nitrat varlığında üreme.....	66
Şekil 11.	Kurşun içeren MHA besi ortamında kültür edilen şuşlarda zon oluşumu (5 mM) ve kremden kahverengi-siyaha dönüşen renklenmeler (1 mM)	68
Şekil 12.	Kurşun içeren MHB besi ortamında kültür edilen MP4A şuşunun 2,5 mM ve 5 mM ortamlarında ki renk değişimleri.	69
Şekil 13.	MP7B ve MP9D şuşlarının kurşun toleransının MBC sonuçları.....	70
Şekil 14.	MP6A şuşunun farklı pH'larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi	70
Şekil 15.	MP7B şuşunun farklı pH'larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi.....	71
Şekil 16.	MP9D şuşunun farklı pH'larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi	72
Şekil 17.	Kurşunun MHB besiyeri ve su ortamındaki standart eğrisi.....	72
Şekil 18.	Kurşunun MHB besiyeri ve su ortamındaki absorbans eğrisi	73
Şekil 19.	MP7B şuşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36°C'de 48 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.....	74
Şekil 20.	MP7B şuşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36°C'de 72 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.....	75
Şekil 21.	MP7B şuşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36°C'de 96 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.....	75
Şekil 22.	Mısırın çimlenme deneyinin 5. gününde MP9D ve MP7B izolatlarının hem kurşunlu (3 mM) hem de kurşunsuz ortamlarda çimlenme görünüşleri.	76
Şekil 23.	Çimlenme deneyinin kurşun varlığında ve yokluğunda genel sonuçları	77
Şekil 24.	Kurşun varlığında ve yokluğunda şuşların mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları.	78

Şekil 25.	Pb varlığında ve yokluğunda suşları mısır bitkisinin kök ve gövde ağırlıkları.	79
Şekil 26.	Çimlenme deneyinin kurşun varlığında ve yokluğunda saçaklanma sonuçları	80
Şekil 27.	MP6A ve MP7B izolatlarının filogenetik ağacı.....	81
Şekil 28.	Saksı deneyi 1. hafta görünümü ve 2. hafta deney düzeneği görüntüleri	82
Şekil 29.	Saksı deneyinin 3. ve 4. hafta gelişim görünümü.....	83
Şekil 30.	Mısır bitkisinin saksı deneyi tüm verilerinin genel görünümü	84
Şekil 31.	Kontrol grubu 4. Hafta saksı deneyi görünümü	86
Şekil 32.	Bakteri (MP7B) grubu 4. hafta görünümü.....	87
Şekil 33.	100 mg Kurşun uygulanmış kontrol grubunun 4. hafta görünümü	87
Şekil 34.	100 mg Pb+MP7B birlikte uygulanmış grubunun 4. hafta görünümü	88
Şekil 35.	200 mg Pb+MP7B uygulanmış grubu ile 200 mg Pb uygulanmış grubunun 4. hafta görünümü.....	89
Şekil 36.	Mısır bitkisinin kurşun varlığında ve yokluğunda gelişiminin toplam veri analizine göre oluşturulan grafik.	89
Şekil 37.	Deneme grupları arasında yaprakta absorblanan kurşun miktarları	91
Şekil 38.	Deneme grupları arasında kökte absorblanan kurşun miktarları	92
Şekil 39.	Deneme grupları arasında toprakta kalan kurşun miktarları.....	93
Şekil 40.	Bakterinin absorpladığı kurşun miktarı	94
Şekil 41.	Bakterinin absorplayamayıp besiyerinde kalan kurşun miktarının verileri	95

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan cihazlar.	28
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.	29
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan suşların izole edildiği meyveler.	30
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan toprağın içeriği.	37
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan izolatlar ve numaraları.	56
Tablo 6.	İzolatların bazı morfolojik özellikleri.	58
Tablo 7.	İzolatların fizyolojik özellikleri.	59
Tablo 8.	İzole edilen kültürlerin biyokimyasal test sonuçları.	60
Tablo 9.	Geleneksel tanı metotlarına göre tür dağılımları.	61
Tablo 10.	Tanımlanan bakterilerin bazı enzim aktiviteleri ve bitki gelişimini teşvik edici özellikleri.....	62
Tablo 11.	Mikroorganizmaların indol asetik asit aktiviteleri.....	65
Tablo 12.	Bakterilerin MHA ortamında, metal tuzlarının farklı (1, 2.5, 5 ve 10 mM) konsantrasyonlarında üreyebilme ve zon çapları.	67
Tablo 13.	Bakterilerin kurşun toleransının sıvı dilüsyon yöntemiyle MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi.	69
Tablo 14.	Mısır bitkisinin çimlenmesi üzerine Kurşun (3 mM) tuzunun etkinliğinin belirlenmesi.....	76
Tablo 15.	Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen benzerlikleri.....	80
Tablo 16.	Mısır saksı deney düzeneği.....	81
Tablo 17.	Torak nemi ve mısır kökü yaş ve kuru ağırlıkları.....	84
Tablo 18.	Saksı deneyi istatistiksel verileri.....	85
Tablo 19.	Saksı deneyi korelasyon tablosu.....	86
Tablo 20.	ICP-OES yaprak verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.....	90
Tablo 21.	ICP-OES kök verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.....	91
Tablo 22.	ICP-OES toprak verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.	93
Tablo 23.	Bakterinin absorpladığı kurşun miktarına ait verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları.	94
Tablo 24.	ICP-OES bakteri sıvı ortamda kalan kurşun miktarı verilerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları.	95

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BHIA	Brain Heart İnfusion Agar
BHIB	Brain Heart İnfusion Broth
EMB	Eosine Metilen Blue
MHA	Müller Hilton Agar
MHB	Müller Hilton Broth
NA	Nutrient Agar
NaCl	Tuz
İMVİC	İndol, Metil Red, Voges-Proskauer ve Sitrat
KIA	Kligler İron Agar
LB	Luria Bertani Broth
PDA	Patoto Dekstroz Agar
IAA	İndol Asetik Asit
HDTMA	Hexa dieyl trimethyl ammonium
SDS	Sodium dodecyl sulfat
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma/Optik Emisyon Spektrometresi
MP	Meyve Pazar
MYO	Meslek Yüksek Okulu
MBC	Minimal bakterisit konsantrasyonu
MIC	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
PGPR	Planth Growth Promoting Rhizobacteria
SPB	Siderofor üreten bakteri
ACCD	Aminosiklopropan karboksilat deaminaze
TCA	Trikorboksilik asit döngüsü
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
CAS	Chrome azurol-S
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
vd	Ve diğerleri
mL	Mililitre

dk.	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
μ L	Mikrolitre
Pb	Kurşun
Hg	Cıva
Cr	Krom
Ni	Nikel
Cd	Kadmiyum
Br	Brom
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Zn	Çinko
Se	Selenyum

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son yüzyıl içinde tarımsal alanda insanlığın en büyük başarılarından biri “yeşil devrim”dir. Bu gelişme önemli verim artışı sağlamış olmasına rağmen, bu artışın sürekli artan dünya nüfusunu dengelemesi söz konusu değildir ve gelecekte toplumların gıda güvenliği bulunmamaktadır. Dünyada mevcut nüfus artışı son 20 yıl içindeki gibi devam ederse, gıda üretimini % 50 oranında artırılması dolayısıyla ikinci bir “yeşil devrim”in gerçekleştirilmesi gerekliliği öne sürülmektedir (Vasil, 1998; Leisinger, 1999). Kimyasal gübreler, tarımsal üretimin artışında önemli rol oynamış olmasına rağmen, aşırı kullanım toprak verimliliğinde azalma ve çevresel bozulmalara neden olmaktadır. Kimyasal gübrelerin, teorik olarak en yüksek verim düzeyine ulaşılmış olup, daha fazla kullanımları verim artışı herhangi bir katkı sağlamaları söz konusu değildir.

Ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi cansız öğeleri, başta insan faaliyetleri olmak üzere birçok etkenle kirlenmektedir. Çeşitli doğa olayları bu kirlenmeyi artırmaktadır. 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren endüstriyel gelişmeye paralel olarak artan kirlilik günümüzde bütün canlıları tehdit eder bir duruma gelmiştir. Bu tehditler ana üretici konumunda olan bitkiler üzerinde çok daha ciddi boyutlara ulaşmıştır (Zengin ve Munzuroğlu, 2004). Özellikle de biyokimyasal reaksiyonlarda yer almayan bir ağır metal ve nörotoksin olan kurşun, sürdürülebilir yaşam ve çevre bilincinden yoksun sanayileşme anlayışının bir sonucu olarak bugün yaşamı kuşatmış olup küresel bir probleme neden olmaktadır. Kurşun gibi ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla havyan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Bitki bünyesine ulaşan ağır metaller bitkilerin fizyolojik aktivitelerini engellemekte, verimliliklerini azaltmakta ve ölümlerine neden olmakta, 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, yayırlılığı, zararın şiddeti ve türü ayrıca zarar oluşum sürecinin bilinmesi bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından oldukça önemlidir.

Antik çağlarda metallerin cevherleri işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimler dışında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamışlardır. Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metalleri etkilerini bilmeden takı, silah, su borusu vb. çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması, endüstri bölgelerde ağır metal kirliliğinin aşırı boyutlara ulaşmasına, su kaynaklarının ve toprağın kirlenmesine neden olmuştur.

Mikrobesin elementi olsun veya olmasın ağır metallerin bitkide aşırı birikimi fizyolojik strese, büyüme ve gelişmede azalmaya sebep olmaktadır (Ouzounidou, 1994). Bitki dokularında ağır metal birikimi fazla olursa mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi çok sayıda olay olumsuz yönde etkilenmektedir (Ouzounidou vd., 1992; Poschenrieder vd., 1989; Lidon ve Ramalho, 1993; Van assche ve Ceulemans, 1980; Lidon ve Henriques, 1991; Munzuroğlu ve Geçkil, 2002). Bunlara membranlarda hasar, hormon dengesinin bozulması, su ilişkisinin değişmesi gibi fizyolojik olaylar da eklenebilir.

Toksik metallerin birikimindeki artış, ekosistemde dengesizliğe neden olmaktadır. Bu toksik metaller, biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte, birikimlere neden olmakta, insan ve hayvan sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmektedir (Çepel, 1997; Rai vd., 2002). Essensiyal olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir (Taboada Castro vd., 2002; Rai vd., 2002).

Fosfat çözücü mikroorganizmalar fosfor alımını artırmak ve bitki gelişmesini teşvik etmek suretiyle, bitki beslenmesinde önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların tarımda biyolojik gübre olarak kullanımı için yeni kombinasyonların ortaya konulması, çok önemli ve ümitvar sonuçlar doğurmaktadır.

Ancak ileri araştırmalarla çoklu interaksiyonların biyokimyasal temellerinin tamamen ortaya konulması gerekmektedir.

Bu çalışmada özellikle bölge topraklarında ekosistemi değiştirmeden güvenilir olabilecek ve biyogübre uygulamalarında kullanımı için uygun, tarımsal verimi artıracak suşların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bölgede meyvelerden izole edilen 34 adet *Bacillus* suşlarının tür tanıları, fiziksel/biyokimyasal özellikleri, bitki gelişimini teşvik eden aktiviteleri, ağır metallere toleransları, kurşun elementi varlığında ve yokluğunda mısır bitkisinin çimlenmesi/gelişmesine olan etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Hakkında Genel Bilgiler

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin, 1997). *Bacillus* cinsi bakteriler çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğu zor şartlara dirençlidir. Peritriş flagellalı ve flagellaları hareketlidir. Aerobik ve fakültatif anaerob olup endospor oluştururlar. Tek ya da gruplar halinde gelişebilen, çift veya zincir şeklinde dirler (Zemek vd., 1981). Vejetatif hücreler 0.5x1.2 m ile 2.5x10 m çapındadır. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanır.

Bacillaceae familyası spor yapan bakterileri içinde toplayan tek familyadır. Bakteri hücrelerinin devamı olarak spor denilen form ortaya çıkmaktadır. Elliye yakın türü bulunan *Bacillus*'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklıdır. Spor, hücre merkezinde veya uçta, ayrıca, vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. şekerleri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı % 32-62'dir (on ve Gökalp, 1997).

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 C de ve pH 7.0 civarında ürerler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart İnfusion ve Kanlı

Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Bacillaceae familyası içerisinde iki önemli bakteri grubu yer alır; *Bacillus* ve *Clostridium* türleri. *Bacillus* grubu 50 tür ile en büyük grubu oluşturmaktadır. Burada en iyi bilinen türler; *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*'dir. Bunların rRNA dizilerine bakılarak üç tür grupları belirlenmiştir; “*Bacillus subtilis* grup”, “*Bacillus cereus* grup” ve “*Bacillus circulans* grup” (Logan ve Turnbull, 1999).

Bacillus cinsi bakteriler; antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz vd., 1998; Wipat ve Harwood, 1999). *Bacillus*'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra geniş fizyolojik yetenekleri ile de psikrofilikten termofiliğe; asidofilikten alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir (Rosovitz vd., 1998; Sneath, 1986).

Bacillus'lar genelde Embden-Meyerhof metabolik yolunu kullanırlar. Bunun yanı sıra heterolaktik (fosfoketolaz) yolunu kullananları (*B. subtilis*) da vardır (Mignone ve Avignone Rossa, 1996).

Terminal elektron alıcıları genelde oksijendir, ancak bazı türlerin elektron alıcısı NO_3 'de olabilir, denitrifikasyon yapan türleri de (*B. azotoformans*, *B. licheniformis*) vardır. Bazı türler (*B. polymyxa*, *B. macerans*) ise azotu fiske ederler. O_2 - CO_2 - H_2 veya O_2 - CO ortamlarında ototrofik yaşayan türlere (*B. schlegelii*) de rastlanabilir (Rosovitz vd., 1998; Sneath, 1986). Aerobik ortamlarda karbon kaynağı olarak organik asitleri (asetik asit, süksinik asit, laktik asit veya pirüvik asit) kullanarak heterotrofik olarak yaşayabilirler. Kemoorganotrofiklerdir. Sadece bir tür fakültatif kemolitotroftur. Bazı türler aromatik veya hidroksi aromatik bileşenleri metabolize edebilirler ve bu nedenle benzin gibi maddelerin biyoremediasyonunda kullanılabilirler (Ediz ve Beyatlı, 2005).

Bacillus 'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilirler. Bazı *Bacillus* 'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir. *Bacillus* 'ların birkaç türü polipeptit sınıfından antibiyotik üretir (Bonwart, 1986). Bazı türleri de böcek patojenidir. Bu cins içindeki bakterilerin çoğu patojen değildir. İki adedi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar da *B. anthracis* ve *B. cereus*'tur. Bu bakterilerin yağları ve proteinleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Bu nedenle de basiller, sürekli çürüme ve bozulma ortamında bulunurlar (Ediz ve Beyatlı, 2005).

Bacillus türleri doğada geniş bir şekilde yayılmaktadır, çünkü bu mikropların sporları zor şartlarda hep hayatta kalırlar, laboratuvar kültürlerinde yaygın kontaminantlardandır (Kayın, 2001). Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak ve böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus* 'ların hücre duvarını, hücre yüzeyini tamamıyla örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* 'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundurlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak süt ve süt ürünlerinden, hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilirler (Taubman, 1992).

1.2.1. *Bacillus*'ların Habitatı

Bacillus türleri doğada çürüyen organik materyalde, toz, toprak, yeşil sebze, su ve bazı türlerde de normal vücut florasında bulunur. Çoğu türleri tabiatta saprofit olarak bulunmaktadır. Bazı türler; insanlarda, hayvanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (Logan ve Turnbull, 1999; Berkeley ve Logan, 1997).

Endospor yapan *Bacillus* türleri toprak, bitki rizosferi, gıda ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler. Birçok mikroorganizma çeşidi gibi *Bacillus* 'lar içinde önemli bir habitat olan topraktaki farklı ortam şartları, mikroorganizma çeşidinin de artmasına yol açar. Genel olarak iyi havalanmış, nemli ve yüksek organik materyal içeren toprakları seçen mikroorganizmalar, toprağın ilk 10 cm'lik üst kısmında yüksek sayıda bulunurlar. Topraktaki popülasyon yoğunluğunun büyük bir kısmını bakteriler (10^6 - 10^9 bakteri/1 gr toprak) oluşturur (Yılmaz, 2003).

Bacillus türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularda, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus*'lar ise ekstrem şartlarda büyüebilme kapasitesindedirler ve üre içeren, uç pH değeri olan, asitli veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilirler (Rosovitz vd., 1998).

Birçok türü bulunan *Bacillus*'lar toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına neden olur. *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus*'un bazı türleri böcek patojenidir ve *B. thuringiensis* biyoinsektisit olarak kullanılmaktadır. *B. cereus*'un bazı suşları insanlarda gıda zehirlenmesine neden olur. *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* 4.2 gibi oldukça düşük pH değerlerinde gelişebilirler ve özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. stearothermophilus* sporları, bakteri sporları arasında sıcaklığa en dirençli sporlardır. *B. coagulans* (*B. thermoacidurans*) sıcaklığa daha az, ancak asitliğe daha fazla dayanıklıdır. *B. subtilis*, subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. licheniformis* basitrasin, *B. polymyxa* ise polimiksin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup amilaz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalar (Ayhan, 2000).

1.2.2. *Bacillus thuringiensis*' in Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis heterotrof, Gram pozitif özellikte, endospor oluşturan, fakültatif anaerob gelişme özelliğine sahip, toprak kökenli bir bakteridir. İlk defa 1901 yılında Ishiwata tarafından ölü ipekböceği larvasından izole edilmiştir. Bu bakteriler tarafından üretilen protein yapıdaki parasporal kristallerin insektisidal aktivitelerini, böcek larvalarının alkali pH'ya sahip bağırsak sistemlerinde kazandığı ve bu protein yapının alkali pH'da bir kaç oligopeptide ayrılarak çeşitli bağırsak proteazları tarafından insektisidal aktivite gösteren toksine dönüştürüldüğü bulunmuştur (Lacey ve Undeen, 1986; Porter vd., 1993).

Bacillus thuringiensis toprakta sıkça rastlanan bir bakteri olup bazen de çeşitli bitkilerin yaprak yüzeylerinde, özellikle iğne yapraklı ağaç türlerinin yapraklarında görülebilir. Toprak ve bitki yüzeylerinde bulunursa da tohum siloları gibi böcek

larvalarının bol olduğu, iklimatik koşulların sabit olduğu karanlık ortamlarda kitlesel üreme yapar. Böcekler arası kanibalizmin olması *Bacillus thuringiensis*'in yayılışını kolaylaştırır (Lamberti ve Perferoen, 1992).

B. thuringiensis suşlarının alfa ekzotoksin, beta ekzotoksin ve delta endotoksin olmak üzere temelde üç tip toksini sentezlediği ve toksin tiplerinin her birinin biyokimyasal yapısının ve aktivitesinin suştan suşa değişebildiği bulunmuştur. Bununla birlikte şimdiye kadar izole edilen *B. thuringiensis* alttürlerine ait suşların her birinin, farklı böcek türlerine patojen olabildiği de gösterilmiştir *Bacillus thuringiensis* serotiplerinin toksin bileşimlerinin farklı böcek türlerinde farklı şekilde reaksiyonlar verdiği ve bu durumun böceğin bağırsak kimyası ile de ilgili olduğu belirlenmiştir (Porter vd., 1993). *B. thuringiensis*'in hayvan ve insan sağlığı açısından güvenilirliğinin test edildiği çalışmalarda hedefin dışındaki canlılara toksik olmadığı belirlenmiştir.

Dash vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, Odisha kıyılarından *Bacillus thuringiensis* PW-05 izole edilmiş ve 50 ppm HgCl₂'e dirençli olduğu, bunu yanı sıra daha yüksek konsantrasyonlarda CdCl₂, ZnSO₄, PbNO₃ ve Na₂HAsO₄ ağır metallerine direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Mer operonuna sahip cıvaya en dirençli bakteri izolatu olarak bulunmuştur. İzolatın atomik absorpsiyon spektroskopisi ile inorganik cıvanın % 90'ından fazlasını buharlaştırdığını belirlemişlerdir.

1.3. Ağır Metal Kirliliği

Çevre kirliliği konusunda en çok kullanılan terimlerden biri ağır metallerdir. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer alır (Zengin ve Munzuroğlu, 2004).

Ağır metallere, özgül ağırlıkları 5 gr/cm³'den, atom numarası 20'den fazla olan elementler olup periyodik cetvelin geçiş elementleri olarak da tanımlanan geniş bir grubuna aittirler. Ağır metalin tanımı daha çok çevresel problemler olduğunda ortaya çıkmakta ve "nispeten yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal" olarak tarif edilmektedir. Kirlenme ve toksite bakımından

bir yan anlam olarak kullanılmaktadır. Bu grubun içine 70 kadar element girmekle birlikte ekolojik bakımdan önemli 20 element dikkati çekmektedir (Fe, Mn, Zn, Cu, V, Mo, Co, Ni, Cr, Pb, Be, Cd, Tl, Sb, Se, Sn, Ag, As, Hg, Al). Metaller doğal olarak meydana gelir ve bazıları küresel ekosistemlerin gerçek parçalarıdır (Yıldız, 2004).

Ağır metaller arasında yer alan Mn, Fe, Cu, Zn, Ni ve Mo gibi elementler yüksek bitkiler için esansiyel besinlerdir, izin verilebilir sınırı aşmadığı sürece toksik olmamaktadırlar (Nedelkoska ve Doran, 2000). Bakır (Cu) ve çinko (Zn) gibi metaller yaşam için gereklidir. Bakır ve çinko gibi ağır metallerin normal konsantrasyonları bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan protein ve enzimlerin yapısı için gerekli kofaktör olarak görev alırlar (Steffens, 1990). Ancak kurşun (Pb) ve cıva (Hg) gibi diğer metallerin faydalı bir biyokimyasal fonksiyon yerine getirdiği bilinmemektedir (Allan, 1997). Yüksek yoğunluklarda zehirli olmalarına rağmen, Cu ve Zn, zehirli fakat gerekli olmayan elementlerden olan Hg ve Pb'den ayrı olarak fotosentetik elektron naklinde anahtar rol oynayan moleküllerin parçası ve çoğu enzim aktivitesi için gerekli mikro besin elementleridir (Raven vd., 1999).

Yüksek konsantrasyonlardaki bazı ağır metaller, bitkileri ve bitkilerle beslenen insan ve hayvanları olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Krom (Cr), Nikel (Ni) ve Pb topraklarda 10-100 mg/kg arasında, kadmiyum ise 1 mg/kg'ın altında bulunuyorsa bu miktarlar normal seviyeler olarak kabul edilmektedir. Kadmiyum ve kurşun çevresel kirleticiler olarak insanlar ve hayvanlarda ciddi sağlık sorunları yaratmaktadırlar; Cr esansiyel bir mikroelementdir. Yüksek konsantrasyonlarda memeliler ve diğer hayvanlar için toksik bir element iken, Ni ise aynı grup canlılar için olası kanserojen bir elementtir. Bununla beraber, nikel yüksek bitkiler için esansiyel besin elementi olarak kabul edilmektedir. Topraklarda ekstrakte edilebilir ağır metal konsantrasyonları: bakır için 0,1 mg/kg, selenyum için 10 mg/kg, vanadyum için 0,5-1 mg/kg, nikel için 100 mg/kg in üzerinde olduğu durumlarda toksik etkiler ortaya çıkabildiği bildirilmektedir (Yıldız, 2001). Ağır metaller içinde en şiddetli zehir etkisi olanların Cd, Pb ve Hg olduğu ifade edilmektedir (Çepel, 1997).

1.4. Ağır metallerin Çevreye Bulaşma Yolları

Son zamanlarda ağır metal tanımı ile kimyasal maddelerin ekolojik sisteme verdikleri zarar genelleştirilerek günlük yaşantımızda alışıla gelmiş bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yaygın kaniya, ağır metallerin belirli bir zaman aralığında canlı organizmada diğer metallere kıyasla akümülyasyonunun fazla olması ve bunun sonucu negatif etkinin giderek artması yol açmaktadır. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde bağlı olarak bulunurlar. Her ne kadar metallerin yoğunluk değeri üzerinden hareketle ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya/gruplandırılmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri onların biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır. Örneğin yoğunluğu $3,65 \text{ g/cm}^3$ olan baryumun veya $4,51 \text{ g/cm}^3$ olan titanyumun biyolojik sistemlere kadmiyum ($8,65 \text{ g/cm}^3$), kurşun ($11,34 \text{ g/cm}^3$) veya lantanit grubu metallere ($5,25 - 9,84 \text{ g/cm}^3$) çok farklı etkide bulunduğu kesindir. Bir elementin yoğunluğu aslında periyodik sistemdeki (grup ve gruptaki sıra) yerinin, kimyasal özellikleri de elementin ait olduğu grubun fonksiyonudur. Metallerin ekolojik sistem üzerine etkilerinden bahsederken aslında metalin ait olduğu grubun ele alınması ve bu özelliğın vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır (Kahvecioğlu vd., 2004).

Ağır metaller, su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarınının toprağı ve dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının adsorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir (Rether, 2002).

Ağır metallerin ekolojik sistemde yayınımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayınımlı söz konusu olduğu görölmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayınımlı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton Cd, 18800 ton arsen, 3600 ton cıva 332000 ton

kurşun atmosfere atılmakta iken, insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selenyum (19 kat), kadmiyum (8 kat), cıva, kurşun, kalay (6 kat), arsenik, nikel ve krom (3 kat) daha fazladır (Rether, 2002).

Ağır metallerin çevreye yayınının da etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar ve aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar (Korentajar, 1991). Ağır metaller, endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkili olurlar (Dökmeci ve Dökmeci, 2005). Özellikle kurşun, kadmiyum, krom, bakır, nikel, cıva ve çinko belli başlı metaller olup; toprağın doğal karakterlerini değıştirebilmekte ve mikroorganizmaları etkileyebilmektedir. Ağır metallerin toprağına karışmasının nedenlerinin başlıcaları:

- Tarım alanlarının amacına uygun olmayan faaliyetler için kullanımı,
- Şehir çöplerinin verimli tarım arazilerinde depolanması,
- Sanayi bölgelerindeki katı ve sıvı atıkların toprağına bırakılması,
- Maden yataklarının toprak üzerinde bırakılması ile radyoaktif atıkların toprağına verilmesi gibi.

Şimdiye kadar yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre, toprağına gelmiş ve birikmiş olan ağır metallerin ve bileşiklerin çevreye yapabileceğı zararlar hakkında, kesin bir yargıya varmak çok güçtür. Çünkü bunların bir kısmı, bitkiler için gerekli besin maddeleridir. Bu maddelerin bitki tarafından alınan miktarları ve bitkiler için zararlı olabilecek sınır değerleri, bitki türüne göre değışmektedir. Ayrıca, bunların zararlı hale dönüşmelerinde, toprak asitliğı, toprağın organik madde içeriğı, diğer elementlerin birlikte bulunup bulunmadığı gibi çok çeşitli etmenler rol oynamaktadır.

Toprağına girmiş bulunan ağır metallerin en tehlikeli yanı, bunların bitki yapısına girmeleri, buradan besin zinciriyle diğer canlılara geçmeleridir. Ayrıca bu ağır metaller serbest iyon haline geçtiklerinde, taban suyuna kadar sızarak buradan elde edilecek

kullanma ve içme sularının niteliğini bozmaktadır. Bunun dışında, toprak canlılarını zarara uğratarak işlevlerine engel olmakta, dolayısıyla ekolojik döngüyü olumsuz yönde etkilemektedir (Yıldız, 2004).

Ağır metallere karşı bitki türlerinin toleransı değişir. Bazı bitki türleri, çok az yoğunluktaki ağır metallere zarar gördükleri halde, bazıları hiç zarar görmeden bünyelerinde bol miktarda ağır metal biriktirebilir. Ağır metaller içinde en şiddetli zehir etkisi olanlar, kadmiyum, kurşun ve cıvadır. Toprakta asitlik derecesi artınca, hareketli hale gelen ağır metal iyonlarının miktarı da artar. Bu durum toprakta iyon dengesini bozacağından, bitkiler için mutlaka gerekli besin elementlerinden, potasyum, kalsiyum ve magnezyum ile beslenme dengesi bozulur. Tarım alanlarına depo ve deşarj yapanların toprağın taşıyabileceği ağır metal yüklerini dikkate alarak arıtma ve iyileştirme yapımları gerekir. Ağır metaller üç grup altında toplanabilir:

- Bitki gelişimi için mutlak gerekli olanlar (Fe, Cu, Zn, Mn ve Mo)
- Bitki gelişimini teşvik edici olanlar (V, Co ve Ni)
- Bitkiye direkt toksik etki yapanlar (As, Pb, Cd, Cr ve Hg)

Toprak kirliliğinin tarımsal açıdan çevre sağlığına en önemli etkisi, topraktaki kirleticilerin bitki bünyesine geçerek bu bitkilerin ya doğrudan ya da bu bitkilerle beslenen hayvanların besin olarak tüketilmesi sonucu insan bünyesine geçmesidir. Bundan başka özellikle çiftçi (üretici) sağlığı açısından kirlenmiş toprakla derinin (el, ayak) temas etmesi, kirlenmiş toprak tozlarının yutulması, topraktan özellikle kuruma esnasında buharlaşan cıva vb. kirleticilerin teneffüs edilmesi gibi tam olarak boyutları ve sonuçları yeterince araştırılmamış birçok olası sağlık sorunu vardır (Kahvecioğlu vd., 2004).

1.5. Kurşun (Pb)

Kurşun endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerde yaygın olarak kullanılması nedeniyle çevrede sık rastlanılan bir elementtir. Kurşun, hava, su ve topraktan solunum yoluyla ve besinlere karışarak biyolojik sistemlere giren son derece zehirleyici özelliklere sahip bir metaldir. Antik uygarlıklardan itibaren özellikle su sistemlerinde yoğun olarak

kullanılmış ve kurşuna bağlı zararlı etkiler o günlerden fark edilmeye başlamıştır. Ekolojik sistemde metal ve bileşik hallerinde bulunur ve her durumda toksik özellik taşır. (Dökmeci ve Dökmeci, 2005; Sienko, 1983; Klaassen, 2009). Kurşun madenleri ve metal endüstriler, akü ve pil fabrikaları, petrol rafinerileri, boya endüstrisi ve patlayıcı sanayii atık suları kurşun kirliliğine neden olur. Otomobil endüstrisi, batarya ve benzin katkısı olarak tetraetil ve tetrametil olarak kullanılmasının yanı sıra kurşun içeren pestisidlerin kullanılmasıyla da topraklara bulaşabilmektedir.

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 tehlike oluşturduğu bildirilmektedir (Dürüst vd., 2004). Kurşun gastrointestinal ya da solunum yolu ile hatta deriden de hızlıca emilir. Hızla kana geçer, % 90'ı eritrositlere bağlanır, daha sonra kemiklerde depolanır. Ana atılım yolu idrar ile olmakla beraber anne sütü, tükürük, saç ve tırnaklarda da bulunur. Kurşun toksisitesi hücre zarlarına ve mitokondrilere olan afinitesinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak oksidatif fosforilasyon ve ATPazlar üzerine etkileri ortaya çıkmaktadır. Ek olarak kurşun gen ekspresyonunu etkileyebilecek şekilde nükleuslar içine girmesini sağlayacak şekilde inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır (Kahvecioğlu vd., 2009; Dökmeci ve Dökmeci, 2005; Howard, 2001; Klaassen, 2009).

Kurşunun bitkilerdeki zehir etkisinin nedenleri üzerinde bilinenler sınırlıdır. Kurşun bitkilerde çoğu enzimlerin aktivitesini ve metabolik işlevleri olumsuz şekilde etkiler. Kurşun hücre duvarlarında birikir. Bu olgu hücre duvarlarında tutularak kurşunun hücre içine girişini önlemesi yönünden olumlu kabul edilmektedir (Kacar vd., 2013).

Kurşun elementi, hücre turgoru ve hücre duvarı stabilitesini olumsuz etkilemesi, stoma 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). Kurşun elementi bitki köklerinde sürgünlere göre daha fazla birirmektedir. 10 ve 20 günlük periyodlarla kum kültüründe çeltik

bitkisi yetiştirilerek 500 ve 1000 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ uygulanmasının yapıldığı bitkilerde kök büyümesinin % 22-42 ve sürgün büyümesini % 25 oranında azaldığı, kökler tarafından absorbe edilen Pb miktarının sürgünlerden 1.7-3.3 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Verma ve Dubey, 2003).

1.6. Bitkilerin Ağır Metal Toksikitesine Tolerans Mekanizmaları

Bitkiler ağır metallere karşı başlıca 3 strateji geliştirmiştir (Baker ve Walker, 1990). Bunlar;

Metal Dışlayıcıları; bu grup bitkiler topraktaki metal konsantrasyonlarının geniş bir grubunu hava kanallarından geçişini önlemede etkili bitkilerdir. Bununla birlikte köklerinde metallerin büyük bir kısmını ihtiva edebilirler.

Metal İndikatörleri; bu bitki grupları toprak altındaki dokularında metalleri biriktirirler ve bu bitkilerin dokularındaki metal seviyelerini yansıtmaktadır.

Biriktiriciler; bu grup bitkiler ise (aşırı biriktiriciler) aşırı miktardaki metalleri toprak üstü dokularında biriktirebilirler, böylece böyle topraklarda veya birikim yapmayan türlerin hemen yanında bulunurlar.

Eğer bir bitki Ni, Co, Cu, Cr veya Pb'nin % 0,1 den fazlasını veya Zn'nin % 1'ini yapraklarında (kuru ağırlık temeline göre) biriktirebiliyorsa "Hiperakümülatör bitki" olarak isimlendirilir. Bitkiler metalleri birçok farklı yollarla vücut kısımlarına dağıtırlar. Çoğunlukla kök ve saplarında biriktirirler veya daha sonra dağıtmak veya kullanmak için nontoksik formda depolar veya biriktirir.

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. Ağır metallere kimi bitkilerin duyarlı olmalarına karşın kimi bitkiler ise geliştirdikleri çeşitli mekanizmalarla ağır metal fazlalığına karşı

dayanıklılık göstermektedir. Ağır metal fazlalığına karşı bitkilerin geliştirdikleri dayanıklılık mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir (Aksu ve Yıldız, 2004);

a) Hücre duvarlarına metal bağlanması: Pb-karbonat olarak tutulur.

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

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

d) Şelatlama: Cd'un, thiol 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 bileşikleri oluştururlar.

1.7. Biyoremidasyon ve Fitoremidasyon

Biyoremidasyon; mikroorganizmaların ve onların enzimlerini kullanarak çevresel dönüşümü veya kontaminantın iyileştirilmesini veya orijinal haline dönüşmesini sağlayan bir işlemdir (Jankiewicz vd., 1999). Biyoremidasyon, doğal süreçte tabiatta kirleticilerin ve organik maddeleri uzaklaştırmada mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (McLaughlin vd., 1999). Ağır metaller, mikroorganizma hücre yüzeylerine tutunarak çevresel temizleyici (biyosorbentler) olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, bakteri, fungus, alg ve zirai endüstriyel atıklar kullanılmakta olup en yaygın kullanılan mikroorganizmalar *Bacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* ve *Rhizophus*'tur.

Topraklarda bakteri, mantar, aktinomiset, protozoa ve alg olmak üzere yaygın birçok mikroorganizma grubu bulunmaktadır. Serbest yaşayan, bitkisel gelişimi teşvik eden, biyolojik savaş ajanı veya biyolojik gübre (BG) olarak kullanılan

mikroorganizmalara bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) adı verilmektedir. Bu bakteriler daha çok *Bacillus*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine aittir.

Bitki gelişmesi, azot fiksasyonu, fosforun biyolojik olarak alınabilir hale gelmesi, siderofor yardımıyla bitkilerce demirin alınması, oksin, sitokinin ve giberellin gibi bitkisel hormonların üretilmesi ve bitki etilen düzeyinin azaltılması gibi mekanizmalarla, PGPR tarafından düzenlenmektedir (Glick, 1995; Lucy vd., 2004). Dünyanın bir çok bölgesinde, potansiyel kirleticiler olan endüstriyel gübre ve pestisit uygulamalarının azaltılması amacıyla, PGPR'in biyolojik gübre olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır (Burdman vd., 2000). 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 yanıtlarına neden olurlar. Ayrıca, *Bacillus* türleri onları sporlar 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 piyasadaki kullanımları yaygın olarak mevcuttur (Jacobsen vd., 2004; Fravel, 2005).

Mikroorganizmaların toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterip bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilmesi ağır metallerle direnç geliştirmeleri ile gerçekleşmektedir (Sultan, 2006). Mikroorganizmaların ağır metal direnç sisteminde 3 önemli mekanizma bulunmaktadır. Birincisi, ağır metalin hücre dışına atılması, ikincisi katyonlar özellikle kükürt seven katyonlar tiol ihtiva eden moleküller aracılığıyla kompleks birleşiklere dönüştürülmesi. Üçüncüsü, bazı metal iyonları indirgenerek daha az toksik bileşiklere dönüştürülmesi. Ayrıca

mikroorganizmalar bu 3 mekanizmayı birlikte de kullanabilir (Nies ve Silver, 1995). Ağır metal iyonları spesifik olmayan bir sistem aracılığıyla, hücre yüzeyinde biriktiği zaman spesifik metal iyonları yüksek konsantrasyona rağmen sitoplazmaya aktarılır. Çünkü bu spesifik olmayan transport sistemi sürekli salgılanır. Ağır metal iyonlarının toksik etkisinden dolayı bu geçiş kapısı kapanmaz.

Fitoremidasyon yeşil bitkiler, biyoremidasyon ise mikroorganizmalar aracılığıyla kirleticilerin zararlı etkilerinin azaltılması ya da uzaklaştırılması işlemini ifade etmektedir. Günümüzde bitkiler ya da mikroorganizmalar geçici olarak bazı ağır metalleri ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Toprakta ağır metal varlığı; pH modifikasyonları, organik madde ve gübre amenajmanı, uygun bitki seçimi, fiziksel stabilizasyon, güçlü asitle yıkama, kireçleme, fosforlu gübre uygulaması, ağır metal şelatörleriyle yıkama ve fitoremidasyon teknikleri gibi tarımsal uygulamalarla minimize edilebilir. Toprakta ağır metalleri alarak bünyelerinde biriktiren bitkilerin kullanabildiği gibi, ağır metalleri çözerek yıkanmayla topraktan uzaklaştırılmasına aracılık eden mikroorganizmaların uygulanması tekniği de biyoremidasyon için umut verici bir yaklaşımdır.

Hiperakümülatör bitkiler sıradan bitkilerden 10 ile 500 kat daha fazla metal biriktirdiği (Chaney vd., 1997), dolayısıyla “Fitoremidasyon” için çok uygun oldukları bildirilmektedir. Hiperakümülatasyonu mümkün kılan önemli özellik, bu metallerin (hipotolerans) artan konsantrasyonlarında bitkinin toleransıdır. Genel olarak, bir bitki, aşağıdaki kriterleri karşılaması durumunda, bir hiper toplayıcı olarak adlandırılabilir;

1. Sürgün metal konsantrasyonu Al, Co, Cr, Cu, Ni ve Se için % 0,1 daha yüksek, Cd için % 0,01 ve Zn için % 1,0'den daha yüksek (Baker ve Brooks, 1989) olmalıdır;
2. Kök konsantrasyonuna sürgüne göre daha yüksek oranda (McGrath ve Zhao, 2003) olmalıdır; Bu köklerinden sürgüne metalleri taşıma yeteneği ve hipertolerans yeteneği varlığını gösterir (Marques vd., 2006);
3. Kökteki konsantrasyonun sürgüne oranı 1'den yüksek olmalıdır ki bu bitkinin metal alımı (Marques vd., 2006; McGrath ve Zhao, 2003) derecesini gösterir.

Bu bitkilerden bazıları *Haumaniastrum robertii* (Co hiper toplayıcısı); *Aeollanthus subacaulis* (Cu hiper toplayıcı); *Maytenus bureaviana* (Mn hiper toplayıcı); *Minuartia Verna* ve *Agrostis tenuis* (Pb hiperakümülatörler); *Dichapetalum gelonioides*, *Thlaspi tatrense* ve *Thlaspi caerulescens* (Zn hiperakümülatörler); *Psycotria vanhermanni* ve *Streptanthus polygaloides* (Ni hiperakümülatörler); *Lecythis ollaria* (Se hiper toplayıcı) olarak bilinmektedir.

Günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline almıştır. Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Bitkisel üretim ve zararlıların kontrolünde rastgele ve gelişi güzel kimyasal gübre ve pestisit kullanımı sonuçta toprak sağlığının bozulmasına, çevre kirlenmesine, patojen ve zararlı popülasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Saber, 2001; Backman, 1997).

1.8. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (PGPR)

Bitki rizosferinde, kök bölgesinde, üstünde veya içinde gelişen pek çok toprak bakterisi çok farklı mekanizmalarla bitki büyümesini artırır. Bu tür yararlı etkide bulunan kök bakterileri için dilimizde “bitki gelişimini uyaran kök bakterileri” diyebileceğimiz ingilizcede “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” denilmekte ve PGPR olarak kısaltılmaktadır. Bu terim ilk kez 1978 yılında kullanıldı (Kleoppe ve Schroth, 1978).

Yaklaşık 60 yıldır üzerinde bilimsel olarak çalışılan ve kısaca PGPR olarak adlandırılan bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler hem bitkilerin farklı stres koşullarına karşı dayanıklılığı hem de bitkilerde hastalık oluşturan pek çok bakteriyel, fungal ve viral etmene karşı bitkide bulunan doğal dayanıklılığı teşvik ederek koruma sağlamasından dolayı tercih edilmektedir (Backman vd., 1997). PGPR’lar genel olarak *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*,

Micrococcus, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinsleri içerisinde yer almakta olup genellikle bitkinin kök bölgesine yerleşerek toprak kökenli patojenlerin gelişimini sınırlamaktadırlar (Montesinos, 2002; Çakmakçı vd., 2001). Rizobakteriler yaşam alanı ve besin için rekabet, patojen gelişimini engelleyici kimyasalların üretimi, siderefor üretimi ve bitkide teşvik edilmiş dayanıklılığın harekete geçirilmesi gibi bir takım mekanizmaları kullanarak hem bitkinin gelişimini artırmakta hemde patojenlere karşı bitkide koruma sağlamaktadırlar (Compant vd., 2005). PGPR'lar özellikle sağlıklı bitkiye uygulama yapıldığında sistemik dayanıklılığı harekete geçirerek kimyasal uygulamalardan, özelliklede bakırlı bileşik uygulamalarından daha etkin sonuçlar vermektedir (Kuc, 2001).

Bitki gelişimini teşvik edici humik asitler, metalik iyonlar ile kilyetli bileşikler ya da metalik hidroksitler oluşturarak suda çözünebilir formları meydana getirirler. Bu elementlerin birçoğunun çözünürlüğünü de kontrol ederler. Bitkilere doğrudan etkisi, kök gelişimi ve bitkiler tarafından absorbe edilen besin elementlerinin metabolizmalarını etkilemesi ile meydana gelmektedir (Lobartini vd., 1997). Nitekim diğer çeşitli bilimsel araştırmalarda da özellikle kireç kapsamı yüksek, organik maddesi düşük ve alınabilir besin maddesi yönünden sıkıntı bulunan topraklara, organik kaynaklı bileşiklerin ilavesi ile P, Fe, Zn gibi bitki besin elementlerinin alınabilirliği artırılabilir.

Önemli kirleticilerden birisi olan ağır metallerin bitkiler üzerindeki etkilerine bir çok büyüme ve gelişme aşamasında rastlamak olanak dahilindedir. Ancak metallerin etkisi bitkilerin ilk büyüme-gelişme aşaması olan çimlenme ve fide aşamalarında çok daha önemlidir. Çünkü bu aşamalarda bitkilerin bu tür stres veya toksisite faktörlerine tepkileri daha fazla olmakta, zararın daha iyi görülebilmesi olasılığı artmaktadır.

1.9. Bitki Gelişimini Teşvik Edici *Bacillus*'ların Özellikleri

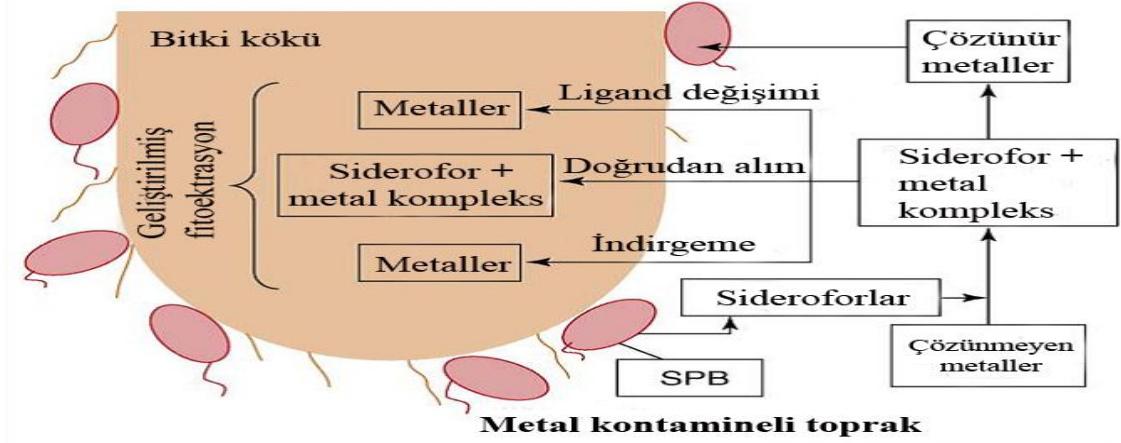
B. subtilis toplam bitki ağırlığı ile bitki dokularındaki N ve P konsantrasyonunu artırırken, *B. megaterium* toprağa iyi adaptasyon gösterip, bitki köklerine kolonize olarak şeker pancarı ve arpa verimini (Sukhovitskaya, 1998; Çakmakçı vd., 1999), pirinçte ise dane verimini arttırdığı görülmüştür (Khan vd., 2003).

Ağır metalle kirlenmiş zeminlerin iyileştirilmesinde özellikle kullanılan mikroorganizmalar *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* ve *Enterobacter cloacae*' dir. *B. subtilis* aynı zamanda metalik olmayan elementleri de azalttığı rapor edilmiştir. Örneğin, Garbisu vd. (1995), *B. subtilis* az toksik element olan (Se) seleniti de azalttığını kaydetmiştir. Bundan başka, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* Cd açısından zengin topraklarda ve metal sanayide atıklarla kirlenmiş topraklardan Cd ve Zn ekstraksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

1.10. Siderofor ve Metal Toleranslı Siderofor reten Bakteriler

Demir hayatın hemen hemen tüm formları için vazgeçilmez bir elementtir. şimdiye kadar bilinen bütün mikroorganizmalar, özellikle laktobasiller, demir gereksinir. Bununla birlikte, aerobikte çevrede, demir başlıca Fe^{+3} olarak bulunur ve sideroforlar genellikle Fe^{+3} ile 1:1 kompleks oluştururlar. Sideroforların metale bağlanmasıyla ortamda çözünebilir metal konsantrasyonu artar. Bakteriler tarafından hücreden siderofor salınır, bu daha sonra Fe^{+3} ', Fe^{+2} 'ye indirger ve hücre membranı tarafından bu demir metabolizmada kullanılmak üzere alınır (Jalal ve Helm, 1991; Madigan vd., 1997). Bazen bu işlemler esnasında sideroforlar tahrip olur ancak hücre tarafından yeniden ekspres edilir. Siderofor tarafında demir alımı mekanizması, hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler de tespit edilmiştir (Krewulak ve Vogel, 2008).

Siderofor, hayvan ve bitki patojenlerinden, serbest yaşam azot fiske eden ve simbiyotik olan mikroorganizmalara kadar çok sayıda çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bununla birlikte, siderofor üretimi, bitki gelişimini teşvik eden rizosfer bakteriler arasında en yaygın olarak gözlenmektedir (şekil 1). Bu özellikle besin kıtlığı ya da ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarında dahil olmak üzere aşırı evre koşullarında optimum büyümeyi sağlayabilmek için siderofor üretim aktivitesi gösterirler, bu nedenle kısmen fitoremidasyon işleminde yarar sağladığı düşünülmektedir.



Şekil 1. Ağır metalle kirlenmiş toprakların fitoekstrasyonu için siderofor üreten bakterilerin rolü (Rajkumar vd. (2009)'dan değiştirilerek).

Metal dirençli siderofor üreten bakteriler (SPB), doğrudan bitki dokularında metal birikimini (Dimkpa vd., 2009a; Dimkpa vd., 2009b) arttırarak fitoekstrasyon verimliliğini artırabilir. Bakteri rizosfer tarafından üretilen siderofor kompleksi aracılığıyla ağır metal taşıyan minerallerin kullanılamaz formlarını çözüdürür (Braud, 2009). Bitkiler daha sonra bu metalleri, siderofor metali komplekslerinin doğrudan emilimi ya da bir ligand değiş tokuş reaksiyonu aracılığıyla metal-siderofor komplekslerden, kök dolayındaki şelat bozulması ve metalleri serbest bırakılması gibi işlevlerle geri alır.

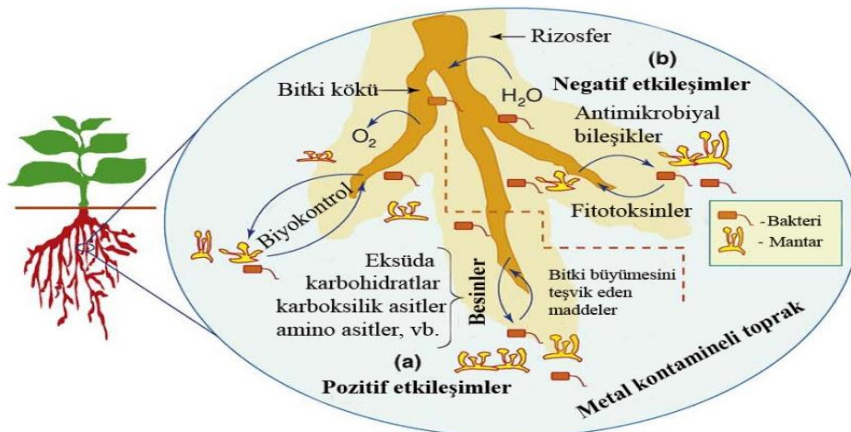
Siderofor demir için eritici ajanlar olarak hareket eder. Bakterilerin geliştirdiği en yaygın stratejilerden biri siderofor üretimi olup, sideroforlar düşük molekül ağırlıklı demir şelatörleri olup, demir kıtlığında minerallerden veya organik bileşiklerden yüksek miktarda demir kompleksleri koparabilme yeteneğine sahip proteinlerdir (Neilands, 1983; Miethke ve Marahiel, 2007). Hemen hemen 500'den fazla sayıda siderofor bilinmektedir. Demire ek olarak, siderofor ayrıca, Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, Zn gibi metallerin yanı sıra çevrede endişe yaratan uranyum (U) ve neptunyum (Np) dahil olmak üzere radyonüklitlerle de kararlı kompleksler oluşturabilirler (Neubauer vd., 2000; Kiss ve Farkas, 1998).

Mikroorganizmaların siderofor üretimi, ortamın pH değeriyle ilişkilidir. Genel olarak hidroksamat sideroforlar asidik topraklarda yaygındır ve mikroorganizmalar tarafından hidroksamat siderofor sentezi için düşük pH değeri tercihi edilmektedir.

Buna karşılık, alkali topraklarda nötr şelatör siderofor üretimini desteklemektedir. pH'ya ek olarak, çevrenin ağır metal konsantrasyonları da mikroorganizmanın gelişmesini ve siderofor biyosentezi etkilemektedir (Rajkumar ve Freitas, 2008; Rajkumar vd., 2009). Rizosferde bitki ve mikroorganizma etkileşimi pozitif ve negatif etkileşim olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2).

Pozitif etkileşimler; Bitki gelişimi sırasında kökler ya aktif ya da pasif olarak bir dizi organik bileşikler salgılar. Atılan bu eksudatlar arasında, özellikle karbohidratlar, karboksilik asitler ve aminoasitler vardır, konsantrasyon gradyanı boyunca serbest olarak salınırlar, rizosferde ki mikroplar için besin olarak hizmet ederler. Mikroplar birçok bitkinin rizosferine kolonize olurlar ve genellikle bitki büyümesini teşvik etmek ve mantar, bakteri, virüs, nematod ve bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklara karşı duyarlılığın azaltılması gibi yararlı etkiler kazandırmaktadır (Bais, 2006).

Mikrobiyal bitki büyümesini teşvik mekanizmalar, tek N kaynağı olarak atmosferik azot fiksasyonu, 1-aminosiklopropan-1-kullanımını, karboksilik asit ve siderofor üretimi ya da bitki büyüme düzenleyicilerinin üretimi gibi mekanizmaları içerir (Weyens vd., 2009). Hastalıklara duyarlılığı kontrol etmek için sorumlu mekanizmalar içine; besinler için rizosfer mikroplarıyla rekabet, niş dışlanması, antifungal metabolitlerin üretimi ve uyarılmış sistemik direnç dahildir (Compant vd., 2005).



Şekil 2. Bitki-mikroorganizma etkileşimi (Rajkumar vd. (2009)'dan değiştirilerek).

Negatif etkileşimler; Rizosfer mikropları bitki patojenleri veya parazit enfeksiyonu riskini artırarak, bitki sağlığı ve sağ kalım üzerine olumsuz etkileri olabilir. Kök eksudaları, rizosferdeki patojen organizmalarında olduğu gibi bazı tür antimikrobiyal maddeler, fitotoksinlerin, nematisid ve insektisid bileşikler olmak üzere zehirli maddeler ihtiva ederler (Bais, 2006).

Hücre dışı materyallerin metalleri bağlaması metallerin immobilizasyonu olabilir ve hücreye girişi bu mekanizmalarla önlenir. Örneğin, metallerin çoğu hücre üzerinde mevcut olan anyonik fonksiyonlu gruplara (örneğin; sülfhidril, karboksil, hidroksil, sülfonat, amin ve amid gruplarını) bağlanır. Benzer şekilde, bu polisakaritler, proteinler ve humik maddeler gibi mikrobiyal hücre dışı polimerler, etkili bir şekilde ağır metalle bağlanabilir (Pulsawat vd., 2003).

Böylece hücreler, sadece kompleks oluşumuyla ya da hücreyi çevreleyen etkili bir bariyer aracılığıyla metalleri detoksifiye edilebilir. Mikrobiyal siderofor, demire benzer kimyaya sahip metal iyonlarını bağlamak suretiyle, toksisitelerini azaltır ve biyolojik yararlılıklarını arttırır (Dimkpa vd., 2008; Gilis vd., 1998). İlave olarak birçok bakteri, ürettikleri metabolitler veya reaksiyonlar aracılığıyla metalleri çöktürebilir ya da kristalize edebilirler (Diels vd., 2003).

Çok sayıda bakteride ATPaz pompası veya kemiozmotik iyon/proton pompaları gibi efflaks transport sistemlerine sahip oldukları bilinmektedir (Haferburg ve Kothe, 2007). Bu tür taşıyıcıların yüksek substrat afinitesine sahip oldukları ve bu nedenle, sitozol içinde, metal yükünü azaltabilmeleri mümkün bulunmaktadır. Birçok bakteride metallerden korunmak için bir sitozolik sequestrasyon mekanizmalarını geliştirmiştir. Ayrıca metalotiyoneinler gibi farklı metal bağlayıcı proteinler de sentez ederler. Bunlar düşük molekül ağırlıklı sistein bakımından zengin, kadmiyum, bakır, gümüş ve cıva gibi diğer metallere yüksek afiniteye sahip proteinlerdir. Sitrik, malik ve histidin gibi aminoasit ve karboksilik asitler de metaller için potansiyel ligantlardır. Bu ürünler metal varlığında üretimleri indüklenmekte ve artan metal konsantrasyonunda detoksifikasyona destek sağlamaktadırlar. Buna ek olarak da bazı bakteriler metal direncinde veya detoksifikasyonda metilasyon (bazı metaller için) mekanizmalarını

kullanabilmektedir. Bu metil gruplarının transferini metal ve metaloidleri içerir ki selenyum metaloidleri buna örnektir (Ranjard vd., 2003).

1.11. Literatür Özeti

Ekosistemler toprak, su ve hava gibi cansız öğeleri başta insan olmak üzere bitki ve hayvanların etkileri ile kirlenmektedir. Ayrıca çeşitli doğa olayları bu kirlenmeyi artırmaktadır. 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren endüstri gelişimine paralel olarak artan kirlilik günümüzde bütün canlıları tehdit eder bir duruma gelmiştir. Bu tehdit ana üretici konumunda olan bitkiler üzerinde çok daha fazladır.

Mikroorganizmaların metallere etkileşmesinde başlıca; ağır metalin hücre 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 (Sultan ve Hasnain, 2006).

Verma ve Dubey (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, 10 ve 20 günlük periyodlarla kum kültüründe çeltik bitkisi yetiştirilerek 500 ve 1000 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ uygulanmasının yapıldığı bitkilerde kök büyümesinin % 22-42 ve sürgün büyümesini % 25 oranında azaldığı, kökler tarafından absorbe edilen Pb miktarının sürgünlerden 1.7-3.3 kat daha yüksek olduğu görülmektedir.

Mısır ve ayçiçeği bitki hücreleri tarafından Pb ortamdan başlangıçta hızlı şekilde absorbe edilmiştir ve belli bir zaman süreci sonunda hücre içerisindeki Pb konsantrasyonu çevredeki çözeltiye göre çok daha yüksek olmuştur. Bu önemli olgu Pb birikimi (akümülyasyon) şeklinde ifade edilmektedir. Benzer şekilde Kacar vd. (2009), hücre içindeki metal konsantrasyonunun, dışarıdaki metal konsantrasyonuna oranı metalin birikim oranı şeklinde tanımlanmıştır.

Doğan ve Çolak (2009) tarafından yapılan, toksik metallere kurşunun su kültüründe uygulanan farklı derişimlerinin (0, 10, 100 mg/L) ekmeklik buğdayda bazı fizyolojik özellikler üzerine etkileri araştırılmıştır. Uygulanan kurşun derişime bağlı

olarak buğdayda büyüme ve gelişmenin engellendiği belirlenmiştir. Bitki köklerinde askorbik asit miktarı Pb etkisinde artarken, otsu gövdede ise azalmıştır. Araştırma boyunca yapılan gözlemlerde, özellikle 100 mg/L'lik kurşun etkisindeki bitkilerin yapraklarında lokal kahverengileşmeler ve kloroz olduğu görülmüştür. Bitkilerin topraktan aldıkları kurşunun önemli bir miktarını köklerinde tuttukları, toprak üstü organlara taşınmasını ise sınırladıkları rapor edilmiştir (Lane ve Martin, 1977).

Kurşunla kirlenmiş topraklarda tahıl üretiminde azalmalar olmakta ve böylece zirai anlamda ciddi problemler ortaya çıkmaktadır (Johnson ve Eaton, 1980). Toprak çözeltisinden bitki bünyesine alınan kurşunun, bitkide büyüme ve gelişmeyi engellediği konusunda birçok araştırma yapılmıştır (Breckle, 1991; Obroucheva vd., 1998). Kurşun toksisitesinin spesifik olmayan belirtileri; kök büyüme ve gelişmesinin kısıtlanması, cüceleşme ve kloroz olduğu bildirilmektedir (Burton vd., 1984).

Gül (2013) yaptığı bir çalışmada, toprak pH'sının azalmasına bağlı olarak toprak çözeltisindeki Pb konsantrasyonu ve bitki gövdesindeki Pb birikimleri artmış olduğu bildirmektedir. Pb asit yönde daha fazla yarayışlı olduğu ve hidrojen iyonları konsantrasyonu (pH) toprakların önde gelen özelliklerinden biri olup Pb yarayışlılığını artış yönünde etkilediği bildirilmiştir. Usta (1995), toksik metal katyonlarının çözünürlüklerinin ve topraktaki konsantrasyonlarının asitleşme ile artış gösterdiğini belirtmiştir. Obroucheva vd. (1998)'nin yaptıkları çalışmada, mısır fidelerinde kurşun toksisitesinin kök gelişimini engellediği bulunmuştur. Kurşunun klorofil sentezini engellediği ve sonuç olarak klorofil miktarlarında azalmalara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Miranda ve Ilangovan, 1996; Doğan vd., 2009). Kurşunun bitkilerde neden olduğu olumsuz etkilerden biri de, reaktif oksijen türlerinin uyartılmasından kaynaklanan oksidatif strestir. Bitkide kurşun stresinden kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi veya kurşunun şelatlanarak detoksifikasyonunda prolinin oynadığı rolden ileri gelebildiği bildirilmiştir (Farago ve Mullen, 1979; Sharmila ve Pardha Saradhi, 2002).

Yapılan bir çalışmada radyoaktif elementler ve toksik ağır metallere kirlenmiş bir tarım toprağındaki mikrofloro aktivitesi özellikle de sülfid minerallerini okside edebilen asidofilik kemolitotrofik bakterilerin aktivitesi, toprağın su, oksijen ve bitki besin

maddesi içeriği gibi bazı önemli çevresel faktörlerde uygun değişiklikler yapılarak artırılmıştır. Mikroflora aktivitesi sonucu çözünür hale geçen metal iyonları toprağın periyodik olarak yıkanması sonucu topraktan uzaklaştırılmış ve uygulama sonucu topraktaki ağır metal seviyeleri makul seviyelere düşürülmüştür. Yapılan işlemler toprak mikroflorasında asidofilik kemolitotrofik bakterilerin artması ve heterotrof sayısının düşmesi gibi bazı değişikliklere yol açarken, toprağın kompozisyonu, yapısı ve başlıca fiziksel özelliklerinde çok az bir değişim olduğu bildirilmiştir (Groudev vd., 2001). Doğan ve Çolak (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, toksik metallere kurşunun su kültüründe uygulanan farklı derişimlerinin (0, 10, 100 mg/L) ekmeclik buğday çeşitlerinden Tosunbey'de bazı fizyolojik özellikler üzerine etkileri araştırılmıştır. Kök ve otsu gövdelerindeki Pb miktarlarının, uygulanan Pb derişimine bağılı olarak arttığı ve yapraklarındaki fotosentetik pigment miktarlarında azalmaya neden oluşturduğu belirlenmiştir.

Thiobacillus sp. ile yapılan bir çalışmada 15-55 °C arasında asidik (pH 4.0) ve aerobik şartlarda sülfür bileşiklerini indirgeyebildiği bildirilmiştir. Metal sülfitlerin okside olarak sülfürik asit oluşturması ve topraktaki metallere yerine protonların bağlanmasıyla metallere desorbe edilmesi şeklinde doğrudan gerçekleşebildiği gibi, Fe⁺²'nin Fe⁺³'e dönüştürülmesi şeklinde dolaylı olarak da gerçekleşebildiği belirlenmiştir. Çeşitli fizibilite çalışmaları, kirlenmiş toprakların *Thiobacilli* tarafından etkin bir şekilde ıslah edilebileceğini göstermiştir (Mulligan vd., 2001). Çabuk vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. ve *P. aeruginosa*'yı da içeren bazı bakterilerin kurşunun biyoremediasyonunda kullanılabileceği bildirilmektedir. Bu bakterilerin kurşunun hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplara bağlanarak ya da bu gruplarla etkileşime girerek biyosorbsiyon olabildikleri, hücre duvarındaki asidik bölgeler ve kurşun arasındaki kompleks oluşumu yoluyla kontamine olmuş kaynaklardaki kurşunu azaltabilecekleri bildirilmektedir.

Gupta vd. (2012) bitki rizosferinden izole edilen 13 Gram pozitif bakterinin, yüksek konsantrasyonlarda ağır Co, Ni, Pb, Cr ve Fe metallere toleranslı olduğunu belirlemiştir. Filogenetik analiz (16S rDNA) ile Firmicutes grubuna ait olduğunu belirlenmiş, kurşun direnci 5-8 mM aralığında bildirilmiştir. Chen ve Cutright (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, olası mekanizmalar geçiren bir bariyer oluşturularak

dışlama, intra ve ekstraselüler izolasyon, aktif taşıma, enzimatik detoksifikasyon, kurşunun asitle ayrıştırılması, kurşunun şelatlanması, kurşunun organik esaslar vasıtasıyla çöktürülmesi, ekstrasellüler metal çöktürmesi ve metilleme, buharlaştırma, oksidasyon ve redüksiyon gibi biyotransformasyon reaksiyonlarını kapsadığı bildirilmektedir.

Son yıllarda PGPR şeker pancarı, şeker kamışı, çeltik, mısır ve buğday gibi bitkilerde kullanılmaya başlanmıştır (Döbereiner, 1997; Schilling vd., 1998; Hecht-Buchholz, 1998). *Bacillus* suşları ile yürütülen araştırmalarda, konifer türleri (Bent vd., 2002), çeltik (Khan vd., 2003; Sudha vd., 1999; Tiwari vd., 1989), arpa (Belimov vd., 1995; Çakmakçı vd., 1999, Şahin vd., 2004), buğday (Caceres vd., 1996; De Freitas, 2000; Öztürk vd., 2003) ve mısır (Pal, 1999) veriminde önemli artışlar belirlenmiştir. *Rhodobacter* türlerinin N₂ fiksettiği (Drepper vd., 2002) ve çeltik fidelerinin azot oranını artırdığı (Elbadry ve Elbanna, 1999) bilinmektedir. Bitki gelişimini teşvik edebilen bakteriler (Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB) bitki gelişmesini doğrudan ve dolaylı olarak etkilemektedir. Doğrudan bazı besin elementlerinin alımını teşvik eden PGPR, dolaylı olarak fitopatogenik organizmaları engellemektedir.

Ghani (2010) tarafından yapılan çalışmada, mısır büyümesi üzerine 6 ağır metalin (Cd, Cr, Co, Mn ve Pb) etkisi incelemiş, sonuçta bu metallerin mevcudiyeti mısır büyümesi ve protein içeriği azalttığı gösterilmiştir. Bu metallerin toksisitesinin de mısır büyümesi üzerine etkisini incelemiştir. Sonuç toprakta bu metallerin mevcudiyeti mısır büyümesi ve protein içeriği azalttığını göstermiştir. Bu metallerin toksisitesi de Cd > Co > Hg > Mn > Pb > Cr şeklinde sıralanmıştır. Aynı zamanda 2 veya daha fazla ağır metal kombinasyonlarının etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Uygun çevre ve bitki seçilmesi durumunda PGPR'ler, sorunlu toprakların iyileştirilmesinde (biyoremediasyonunda) güçlü etkileri olduğu gösterilmiştir. Gelecekte farklı çevre koşullarında ve farklı bitkilerde hangi mikrobiyal özelliklerin kullanılacağı, optimum etkin mikroorganizmaların seçim ve bu mikroorganizmalarla hazırlanacak biyolojik gübre formülasyonlarının kullanımı organik tarım sektörü için büyük önem taşımaktadır. 1980'lerin ortasında ağır metal ve kirleticilerin çevresel salınımının önlenmesi amaçlı 90 çeşit genetiği değiştirilmiş mikroorganizma tasarlanmıştır, fakat

bakterilerin laboratuvar ortamında öngörüldüğü gibi doğal şartlarda davranmadıklarından dolayı başarısız sonuçlanmıştır. Bu nedenle biyoremediasyonda doğal floradan izole edilen, bitki gelişimini teşvik edebilen ve metal toleransı yüksek mikroorganizmalarla çalışmak ilgi konusu olmuştur.

Biyokontrol, biyoremidant ve bitki gelişimini teşvik edici özelliklere sahip yeni mikroorganizmaların tanımlanması özellikle organik tarımda büyük önem arz etmektedir. Özellikle her bölgede o bölgeye spesifik, yabancı olmayan mikroorganizmaların seçilip kullanılması ise ekosisteme dışarıdan müdahale olmaması gerekliliği açısından da ayrıca önem taşımaktadır. Bu nedenle çok sayıda çalışma, farklı bitki türlerinde uygulamaların yaygınlaştırılması, bitki yüzeyleri ve bakteri ilişkileri, bakterilerle bitki genotipi arasındaki ilişkiler, çevresel uyumluluk ve etkin türlerin izolasyonu üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır.

Bu çalışma çay tarımı yapılan bölgemizde özellikle organik tarım hedeflenen toprakların iyileştirilmesinde, aynı bölgeden köken alan mikroorganizmaların kullanılabilme şansı sağlanması hedeflenmiştir. Bu çalışma sonucunda belirlenecek en uygun *Bacillus* sp. suşu bu amaca giden yolda bir başlangıç olması umudunu taşımaktadır. Ayrıca çalışmayla alanda bilgi birikiminin sağlanması, öğrenci yetiştirilmesine ve bilginin üretime dönüşebilme yolunun açılmasına öncülük edeceği düşünülmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Araç, Gereç ve Sarf Malzemeleri

Laboratuvarında örneklerin incelenmesi için çeşitli araç ve gereçler kullanıldı (Tablo 1). Çalışmada gereç olarak; çeşitli cam (çeşitli boylarda vida kapaklı tüpler, erlenmayer, lam, lamel, pastör pipeti, cam baget) ve plastik malzemeler (5-10'luk pipetler, petri kapları, mezür, filtre kâğıdı), mikropipet seti, mikro ve makro pipet uçları, pipet kutuları, pens, eppendorf tüpleri, öze, eküvyon çubukları, küçük plastik petripler, sporlar kullanıldı.

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri ve kimyasal maddeler ticari (Merck, Sigma, Detroit, USA) olarak elde edildi (Tablo 2).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Model/Firma
Uv-Vis Spektrofotometre	Spectramax/M5
Soğutmalı Santrifüj	Sigma/2-16PK
pH metre	Hanna/HI3220
Çalkalayıcı	Gfl/3005
Thermoblok	Nosheng/MS-100
İnkübatör	Memmert/Model600
Jel Görüntüleme Sistemi	Uvp/Digi-Doc It
İklimlendirme Kabini	Daihan/WGC-P4
Bidistile Su Cihazı	Gfl/2108
Güvenlik kabineti	Nüve/MN-20
Işık mikroskobi	Nikon/E100
Güç kaynağı	Owl/OSP-500
Koloni mikroskobu	Olympos
Pastör fırını	Nüve/FN-500
Otoklav	Nüve/OT-40L
Hassas Terazı	Denver/PL-214
Vorteks	Heidolph/Reax Top
Derin dondurucu	-
Araştırma mikroskobu	Olympos
Magnetik karıştırıcı	Nüve
ICP-OES	PerkinElmer/Optima 7000 DV)
Dansitometre	Bioscrin C

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.

Kimyasal Adı	Firma	Kimyasal Adı	Firma
Agar Agar	Fluka	Potasyum Fosfat	Sigma
Mueller Hilton Agar	Merck	NaOH	Merck
Mueller Hilton Broth	Merck	Demir sülfat	Sigma
Eozin Metilen Blue (EMB)	Merck	Sodium clorür	Sigma
Luria bertani (LB) Broth	Merck	Kalsiyum Fosfat	Sigma
Brain Heart İnfusion Broth	Merck	Amonyum sülfat	Sigma
Patoto Dekstroz Agar	Merck	Bakır Sülfat	Sigma
Yeast Ekstrakt Powder	Merck	Magnezyum Klorür	Sigma
Meat Ekstrat	Merck	Demir klorid	Sigma
Malt Ekstrat Agar	Merck	Amonyum Klorür	Sigma
Pepton	Fluka	Kobalt klorid	Sigma
Monosodyum fosfat	Sigma	Çinko Klorür	Sigma
Etil Alkol (% 96'lık)	Merck	Glukoz	MERCK
Bromo phenol blue	Merck	Agaroz	Sigma
2-ethanesulfonik asit (PİPES)	Sigma	Asetik asit	SİGMA
1- 5diphenyl carbazide	Sigma	Molibden trioksit	Sigma
Hexadieyltrimethylammonium	Sigma	Sodyum asetat	Kimetsan
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma	Sodium Arsenate	Sigma
Potassiumphosphate dibasic(K2HP04)	Sigma	Mercury chloride (HgC12)	Sigma
Glukonik asid sodyum tuz	Sigma	ITS Primerleri	Sigma
Taq for routine PCR with inert dye; with 10X buffer & dNTP 250 UNmix	Sigma	Phenol:chloroform:ıso amylAlcohol25:24:1	Sigma

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Çalışmada 2012-2013 yılları arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Pazar Meslek Yüksekokulu (PMY) Uygulama bahçesinden toplanıp enfeksiyonlu meyvelerden izole edilerek 80 °C'de saklanan 34 adet *Bacillus* suşu kullanıldı (Tablo 3). Örnekler meyve Pazar (MP) olarak, farklı izolatlar ise alfabetik sıraya göre kodlandı.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan suşların izole edildiği meyveler.

Örnek No	Meyve Adı	İzolatlar
MP1	Elma	1-B, 1-D,1-E, 1-G
MP2	Elma	2-B
MP4	Elma	4-A
MP5	Misket Elma	5-MEA, 5-MEB
MP6	Elma	6-A
MP7	Elma	7-B, 7-C2, 7-F, 7-G
MP9	Armut	9-A, 9-B, 9-C, 9D
MP10	Armut	10-A, 10B, 10-C, 10-D
MP12	StarkrimsonElma	12-A, 12-A1, 12-F
MP13	Golden Elma	13-A
MP14	Granny Smith Elma	14-B
MP19	Elma	19-A, 19-C
MP20	Delicios Elma	20-D
MP22	Armut	22-A, 22-B, 22-C, 22-D1, 22-E

2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

2.2.1. Müller Hinton Agar (MHA) Katı ve Sıvı Besiyerleri

Bakteri kültürlerinin canlandırılmasında kullanılan MHA besiyeri, ticari firmanın önerisi doğrultusunda litrede 34 gram tartılarak otoklavda 121 °C’de 20 dk. steril edildi. Agarlar steril şartlarda 9 cm’lik steril petrilere, sıvı besiyeri ise steril tüplere aktarıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C’de bekletildi.

2.2.2. Leura-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

10 g Triptofan, 5 g Yeast Ekstrat ve 5 g NaCl tartılarak 1 litre distile suda çözüldü. 121 °C’de 20 dk. otoklavlanarak steril edildikten sonra steril şartlarda 9 cm’lik steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C’de bekletildi.

2.2.3. Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) Besiyeri

Ticari firmanın önerisi doğrultusunda litrede 34 gram tartılarak otoklavda 121 °C’de 20 dk. steril edildikten sonra steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C’de bekletildi.

2.2.4. İndol Besiyeri

10 g Triptofan, 2 g Tripton ve 0,5 g NaCl tartılarak 1 litre distile suda çözülüp tüplere 3'er mL dağıtıldı ve otoklavlanarak steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.5. Metil Red-Voges Proskauer Besiyeri

7 g Pepton, 5 g Glukoz ve 4 g K₂HPO₄ tartılarak 1 litre distile suya tamamlandıktan sonra tüplere 3'er mL olarak dağıtılır. Tüpler otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de bekletilir.

2.2.6. Nitrat Besiyeri

5 g Pepton, 3 g Beff ekstrat ve 1 g Potasyum nitrat tartılarak 1 litre distile suda çözülüp hazırlandıktan sonra tüplere 3 mL olacak şekilde dağıtılıp otoklavlanarak steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de bekletildi.

2.2.7. İki Şeker (KIA) Besiyeri

Ticari firmanın önerdiği üzere hazır toz besiyerinden 5,5 g tartılıp 100 mL ddH₂O içerisinde çözüldü. Tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra otoklav edilip, yatık şekilde soğutularak slant agar hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de bekletildi.

2.2.8. Sitrat Besiyeri

Litrede 1 g K₂HPO₄, 5 g NaCl, 2 g Sodyum sitrat, 0,2 g MgSO₄, 0,08 g Bromtimol mavi, 13 g Agar-agar tartıldıktan sonra distile suda çözülüp hazırlanarak otoklavda steril edildi. Steril tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra yatık bir şekilde donması için bekletildi. Donduktan sonra kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de bekletildi.

2.2.9. Lesitinaz Besiyeri

Litrede 34 g Brain Heart İnfusion Agar besiyeri hazırlanıp otoklav edildikten sonra soğutuldu. İki yumurtanın yüzeyi yıkanıp alkolle steril edildikten sonra, yumurta sarıları falkon tüpe konulup karıştırıldıktan sonra soğuyan besiyerine ilave edildi. Besiyeri homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra steril petri kaplarına dökülerek soğuması beklenildi. Kullanılacağı süreye kadar +4°C’de bekletildi.

2.2.10. Üreaz Besiyeri

Litrede 0,1 g Maya Ekstratı, 0,091 g Monopotasyum Fosfat, 0,095 g Disodyum Fosfat, 20 g Üre, 0,01 g Fenol kırmızısı tartıldıktan sonra distile suda çözülüp hazırlanarak otoklavda steril edildi. Sterilizasyondan sonra eliza plaklarına 150 µL olacak şekilde dağıtılarak kullanıldı.

2.2.11. Karboksil Metil Selülaz (CMC) Besiyeri

Litrede 10 g CMC, 5 g Pepton, 5 g Maya özütü, 1 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 10 g NaCl, 15 g Agar- agar tartılıp distile suda çözülerek, pH’sı 10.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra otoklav edilip steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C’de bekletildi.

2.2.12. Proteaz Besiyeri

Litrede 10 g Triptofan, 5 g Yeast Ekstrakt, 5 g NaCl ve 15 g Agar-agar tartılıp distile suda çözülerek hazırlandıktan sonra otoklav edilip steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C’de bekletildi.

2.2.13. Amilaz Besiyeri

Litrede 6 g Na₂ HPO₄.7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 0,24 g MgSO₄.7H₂O, 0,24 g CaCl₂. 2 g H₂O, 3 g Pepton, 10 g Nişasta ve 15 g Agar-agar

tartılıp distile suda çözülerek hazırlandıktan sonra otoklav edilip steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C’de bekletildi.

2.2.14. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri

Nutrient sıvı besiyerine % 10 jelatin ilave edilerek kaynar suda eritildi. Vida kapaklı tüplere 2 mL şeklinde dağıtıldı ve otoklavda 121 °C’de 15 dk. steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar oda ısında bekletildi (Bilgehan, 2004).

2.2.15. Hareket Besiyeri

Litrede 21,8 g Nütrient besiyeri ve % 0,6 Agar- agar tartılıp distile suda çözülerek hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve steril tüplere 4 mL olacak şekilde dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C’de bekletildi.

2.2.16. Tuz Tolerans Besiyeri

1 M’lık Tuz konsantrasyonu için; 100 ml Müeller Hilton Broth sıvı besiyeri hazırlanıp içerisine 5,48 g NaCl eklenerek otoklavla steril edildi. Aynı işlemler 2 M ve 3 M’lık NaCl konsantrasyonları için de gerçekleştirildi.

2.2.17. Fosfat Besiyeri

Litrede 10 g Glukoz, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 5 g MgCl₂.6H₂O, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,1 g KCl ve 0,1 g (NH₄)₂SO₄ tartılıp distile suda çözülerek, pH 7.0’ye ayarlandıktan sonra 0,025 g bromo fenol blue (BPB) ilave edildi. Besiyeri otoklav edildikten sonra steril petrilere dağıtıldı (Aydoğan vd., 2013).

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

Litrede; 4 g KH₂PO₄, 6 g NaHPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,1 g FeSO₄.7H₂O, 10 µg H₂BO₃, 10 µg MnSO₄, 70 µg ZnSO₄, 50 µg CuSO₄, 10 µg MoO₃, 2 g Glukoz, 2 g Glukonik Asid, 2 g Citric Asid, 2 g Amonyum sülfat ve 12 g Agar-agar tartılıp distile

suda çözüldükten sonra üzerine 2 g Amonyum sülfat ilave edilerek otoklav edildi. Besiyeri steril plaklara dökülerek kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Dworken ve Foster, 1958).

2.2.19. Siderofor Besiyeri

Hazırlanacak besiyeri için önceden tüm cam şişeler 6 mM'lık HCl ile temizlenip eser elementler uzaklaştırıldı ve iki kez distile su ile yıkandı. Bu test hazırlanırken üç farklı hazırlık aşamasından geçildi (Schwyn ve Neilands, 1987). Bunlar;

a) Boya Solüsyonu:

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

Solüsyon 2: 0,0027 g FeCl₃.6 H₂O tartılıp 10 ml HCl'de çözüldü.

Solüsyon 3: 0,073 g HDTMA tartılıp 40 ml ddH₂O'da çözüldü.

Solüsyon 1'in içine 9 mL solüsyon 2'den ilave edilip, daha sonra solüsyon 3'ün tümü karıştırıldı. Solüsyon mavi renge dönüştükten sonra otoklavlanıp cam şişede muhafaza edildi.

b) Karışım; Minimal Media 9 (MM9) Tuz Solüsyonu Stok: Bunun için 15 g KH₂PO₄, 25 g NaCl ve 50 g NH₄Cl tartılıp 500 mL ddH₂O'ya tamamlandı.

%20 Glukoz Stok Solüsyonu: 20 g glukoz tartılıp 100 mL ddH₂O'da çözüldü.

Stok NaOH: 25 g NaOH tartılıp 150 mL ddH₂O'da çözülüp pH 12.0'ye ayarlandı.

c) CAS Agar Hazırlanışı: MM 9'dan 100 mL alınıp, 750 mL ddH₂O'da çözüldü. 2-ethanesulfonyl asit'in (PIPES) 32,24 gramı tartılarak solüsyon-b'ye ilave edildi. (Not: Solüsyona ilave edilince pH 5.0'in altına düşer. NaOH ile pH 6.0-6.8 arasında ayarlanmalı, 6,8'i geçerse rengi yeşile döner). pH ayarlandıktan sonra 15 g agar ilave edilip otoklavlandı ve 50 °C'de soğutuldu. Soğutulan agarın içine 10 ml % 20'lik steril glukoz solüsyonu eklendi. Bunun da üzerine yavaşça 100 mL boya solüsyonu ilave edilip karıştırıldı ve steril petrilere döküldü.

2.2.20. IAA (İndol Asetik Asit) Besiyeri

IAA testi için Salkowski reagent ve DF Salt Medium olmak üzere iki farklı solüsyon hazırlandı. Bunlar;

Salkowski solusyonu: 150 ml H₂SO₄, 7,5 mL 0,5 M FeCl₃.6H₂O ayarlanıp 250 mL ddH₂O içinde çözüldü.

Minimal Salt (DF) besiyeri: 4 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 1 µg FeSO₄, 10 µg H₃BO₄, 10 µg MnSO₄, 70 µg ZnSO₄, 50 µg CuSO₄, 10 µg MoO₃, 2 g glukoz, 2 g glukonik asit, 2 g sitrik asit tartılarak hazırlandı ve pH 6.5'a ayarlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Fürkranz vd., 2009).

2.2.21. Amonyum Üretim 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).

2.2.22. Metal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Stok solüsyonların hazırlanışı; kurşun için 3,793 g Pb(NO₃)₂, bakır için 2,4968 g CuSO₄.5H₂O, demir için 2,703 g FeCl₃.6H₂O, gümüş için 1,6987 g AgNO₃ ve çinko için 1,3635 g ZnCl₂ tartılıp, 100'er mL distile suda çözülmesi sağlandı.

Bunun için ilk olarak 100 mM'lık stok metal solüsyonları hazırlandı. Stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra her birinden 1, 2,5, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar 100 ml MHA besiyeri ile karıştırılıp pH 7.0'e ayarlandıktan sonra otoklav edildi. Otoklavdan sonra steril petrilere dökülerek kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.23. Farklı pH Aralıklarında Pb'li ve Pb'siz MHB Besiyerlerinin Hazırlanışı

Ticari firmannın önerisi doğrultusunda Müeller Hilton Broth (MHB) tartıldı ve distile suda çözülerek 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 hazır hale getirildi.

Aynı şekilde hazırlanan MHB besi ortamlarına (Pb(NO₃)₂) stok solüsyondan ilave edilerek 1,5, 2,0, 2,5 ve 3,0 mM olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan kurşun nitrattlı MHB 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 kadar saklandı. Besiyerleri bakterilerin sıvı ortamda farklı pH'da, optimum kurşun konsantrasyonlarında üreyebilme yeteneklerinin belirlenmesinde, üreme eğrilerinin belirlenmesinde ve büyük hacimde bakteri üretimlerinde kullanıldı.

2.2.24. Spektrofotometrik Ölçümler

Çalışma, sıvı ortamlarda kurşun absorban değerinin ölçülmesi amacıyla yapıldı. Ölçüm için her örnekten 150 µL alınıp düztabanlı ELİSA plakalarına konularak hazırlandı ve spektrofotometrede (Spectramax M5) ölçümleri yapıldı. Alınan spektrum verileri Excel programına aktarılarak absorban grafikleri çizildi.

2.2.25. Çalışmada Kullanılan Mısır Tohumu ve Toprak İçeriği

Metal ve bakterilerin bitki çimlenmesi ve gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çimlenme ve saksı deneylerinde mısır bitkisi kullanıldı. Mısır tohumu (Hibrit-RX9292) ticari firmadan (MayAgro Tohumculuk A.Ş.) temin edildi. Aynı şekilde çalışmada kullanılan saksı toprağı torf özellikte olup ticari bir firmadan temin edildi. Toprağın içeriği Tablo 4'teki gibidir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan toprağın içeriği.

İçerik	Miktar	İçerik	Miktar
pH	4.5-6.5	N	20,2 mg/L
E.C	0,5 ds/m	C	% 48
K	mey/L 0,06	C/N	25
Na	mey/L 0,4	Cu	% 2,2
Ca+Mg	mey/L 5,0	Mg	% 0,44
Cl	24,9 mg/L	Na	% 0,04
P.PO4	1,9 mg/L	P	% 0,103
N.NO3	4,8 mg/L	N	% 1,94
N.NH4	2,7 mg/L		

2.3. Çalışmada Kullanılan Ayıraçlar, Solüsyonlar ve Boyalar

Oksidaz Ayıracı; 0,1 g alfa naftol tartılarak 10 mL % 95'lik etil alkol içerisinde eritildi.

Katalaz Ayıracı; % 30'luk H₂O₂ stokundan % 3'lük hazırlanarak kullanıldı.

Nessler Reagent Ayıracı; 1:1 oranında potasyum klorür ve cıva II klorid kullanılarak hazırlandı.

Kovaks Ayıracı; 10 g p-Dimethylaminobenzaldehide, 150 mL İzöamil Alkol ve 50 ml HCl çözülüp ışık geçirmeyen şişeye doldurulduktan sonra kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Metil Red Ayıracı; Metil kırmızısının 0,05 gramı havanda 150 mL Etil Alkol (% 95) ile dövülerek çözüldü ve ışık geçirmeyen şişeye aktarıldı. Üzeri 100 mL Saf su ile tamamlandıktan sonra kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Voges Proskauer Ayıracı; A ayıracı: 5 g α-naftol, 100 ml Etil alkol (% 95).

B ayıracı: 10 g Potasyum hidroksit, 100 mL ddH₂O.

İki ayıraç ayrı ayrı hazırlandı ve kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Nitrat Ayıracı; A ayıracı: 0,5 g α-Naphthylamine tartılıp 100 mL % 30'luk Asetik asit içerisinde çözüldü.

B ayıracı: 0,8 g Sülfanik asit tartılıp 100 mL % 30'luk Asetik asit içerisinde çözüldü.
C ayıracı: Çinko tozu.

Ayıracılar ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karanlık şişelere aktarılıp, kullanılacağı süreye kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Lugol Solüsyonu; 1 g İyot ve 2 g Potasyum iyodür tartılıp havanda birlikte ezilerek 300 ml su ile homojenize edildi. Karanlık şişeye aktarılarak +4 °C'de muhafaza edildi.

Kongo Kırmızısı; Ticari olarak temin edilen Kongo red boyasından 0,1 g tartılıp 100 mL saf suda çözüldü. Kullanılacağı süreye kadar oda ısısında bekletildi.

1 N'lik NaCl Çözeltisi; 58,8 g NaCl tartılıp 1000 mL ddH₂O içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

Kristal Viyole Boyası; A Solüsyonu; 1 g Kristal viyole tartılıp 10 mL % 96'lık etanolde çözümlenerek 90 mL ddH₂O'ya tamamlandı. **B Solüsyonu;** 4 g Amonyum oksalat 400 mL ddH₂O içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Bu iki solüsyon hazırlandıktan sonra karıştırılarak istenilen boya elde edildi.

Safranin Boyası; 0,25 g Safranin, 10 mL Etil Alkol (% 95) ile çözümlenip karanlık şişeye aktarılarak 100 mL olacak şekilde distile suya tamamlandı.

2.4. Yöntem

2.4.1. Mikroorganizma Karakterizasyon Çalışmaları

2.4.1.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması

Önceden saflaştırılıp -80 °C'de % 20 gliserol ile saklanmış olan 34 adet bitki kökenli suşların (Tablo 1), Müeller Hinton Agar (MHA) besiyerlerine ekimleri yapılarak ve 24-48 saat 36 °C'de inkübe edildi. Hedeflenen deneylerde kullanılmak

üzere tek koloni alınarak MHB sıvı besiyerine pasajları yapıldı. 36 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak diğer testler için kullanıma hazır hale getirildi.

2.4.2. İdentifikasyon İçin Uygulanan Biyokimyasal Testler

2.4.2.1. İndol Deneyi

Başta Enterobacteriaceae’ler olmak üzere birçok bakterinin buldukları triptofanaz enzimleri ile triptofandan indol oluşturmalarının araştırılması temeline dayanan bir testtir. İncelenecek bakteri örnekleri indol besiyerlerine ekildi. 24 saat 35 °C’de inkübe edildikten sonra tüplere Kovaks ayırıcından 6-8 damla damlatıldı. Birkaç saniye içerisinde tüpün üst kısmında parlak kırmızı bir halkanın oluşması pozitif sonuç, sarı halka oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi.

2.4.2.2. Metil Red-Voges Proskauer Deneyi

Metil kırmızısı deneyi bakterilerin karbonhidratları fermente etmeleri esnasında oluşan laktik, asetik ve formik asit gibi ürünlerden besiyerinin pH’sını metil kırmızısı ayırıcı ile saptanabilecek derecede düşürmeleri temeline dayanır. Besiyerlerine saf bakteri kültürlerinden ekim yapılarak, 35 °C’de en az 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda besiyeri içerisine 5-6 damla metil kırmızısı ayırıcı damlatıldı. Besiyerinde kırmızı renk oluşumu sonucun pozitif, turuncu ve sarı renk oluşumu ise sonucun negatif olduğunu gösterir.

Glukozun fermentatif parçalanması sırasında oluşan pürvik asit bazı bakterilerde bulunan enzimatik sistemlerle daha ileriye doğru parçalanıp son ürün olan asetionu oluşturur. Bakteri ekimi yapıp inkübe edilmiş olan MR-VP besiyerine VP ayıraçlarından ilk olarak 0,6 mL ayıraç I (α -naftol), hemen arkasından 0,2 mL ayıraç II (potasyum hidroksit) damlatılıp tüplerin ağızları açık bırakılarak 10-15 dk. bekletildi. Bu süre sonunda pembe-kırmızı arası renk oluşumu VP testi için pozitif, açık kahverengi renk oluşumu ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

2.4.2.3. Nitrat Deneyi

Bakterilerin nitratı nitrite indirgeyip indirgemediğini görmek için yapılan bir testtir. Saf kültür halinde bulunan bakterilerden öze yardımıyla nitrat besiyerine ekim yapıp, 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültürle sırasıyla A (α -Naphthylamine) ve B (Sülfanik asit) ayırıcından 1’er mL eklendi. 30 sn içerisinde kırmızı bir renk oluşması nitritin varlığını yani bakterilerin nitratları redükte etmiş olduğunu gösterir ve nitrat testi pozitif olarak değerlendirilir. Eğer 30 sn içerisinde renk oluşmazsa besiyerine küçük bir miktar çinko tozu ilave edilir. Tozun eklenmesiyle 30 sn içerisinde kırmızı renk oluşursa, besiyerindeki nitratların bakteriler tarafından redükte edilmemiş olduğu, eklenen çinko tarafından redükte edilmiş olduğu anlaşılır ve nitrat testi sonucu negatif olarak değerlendirilir.

2.4.2.4. İki Şeker (KIA) Testi

Bakterilerin glikoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkilerini ve hidrojen sülfid (H_2S) oluşturup oluşturmadıklarını belirleme amacıyla kullanılır. Ekim yapılırken, bakteri kültürlerinden iğne özeyle alınıp önce besiyerinin dik kısmına batırıldı sonrasında yatık kısmın yüzeyinde zikzak çizilerek ekim tamamlandı. 35 °C’de 48-72 saat inkübe edildi. 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 oluşması varsa besiyerinin içinde gaz kabarcıklarının ya da besiyerinin parçalanmasının görülmesi ile anlaşılır. Besiyerinin dip kısmının siyahlanması ise bakterinin H_2S oluşturduğu anlaşılır.

2.4.2.5. Sitrat Testi

Testin amacı, bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanma yeteneklerinin belirlenmesidir. Organizmalar sitratı hücre içine alan enzim olan permeaz ve parçalayan enzim olarak sitrat liyaza sahipse sitrat besiyerinde alkali bir reaksiyon oluşturur. Besiyerinde bulunan bromthmol mavisi ayırıcının yeşil rengi maviye döner.

Ekim yapılırken, bakteri kültürlerinden iğne özeye alınıp önce besiyerinin dik kısmına batırılarak sonrasında yatık kısmın yüzeyinde zikzak çizilerek ekim tamamlandı. 35 °C’de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerinin renginin maviye dönüşmesi pozitif sonuç, rengin değişmeyip yeşil kalması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

2.4.2.6. Oksidaz Testi

İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir testtir. MHA besiyerinde üreyen bakteri kültürlerinin üzerine birkaç damla oksidaz testi ayırıcı damlatıldı. 30-60 sn içerisinde oluşan koyu mavi renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.4.2.7. Katalaz Testi

Katalaz enzimi yapan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırırlar. Bu nedenle bu enzim hidrojen peroksit ile araştırılır. MHA besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinden öze ile alınıp bir lamın üzerine bırakıldı. Üzerine bir iki damla % 3’lük H₂O₂ çözeltisi ilave edilip öze ile karıştırıldı. Oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.4.2.8. Sıcaklık Üreme Aralığının Saptanması

Bakterilerin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan bir testtir. MHB besiyerine taze kültürlerden alınan izolatlar ekilerek 10, 20, 30, 36, 40, 45 ve 50 °C’lik etüvlerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24-48 saat sonra üreme gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

2.4.2.9. pH Üreme Aralığının Saptanması

Bakterilerin en iyi üreyebildiği pH aralıklarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan bir testtir. Test için; pH 4.5, 5.5, 8.5 arasında farklı pH’lara sahip MHB besiyerleri

hazırlanarak 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda bakterilerin hangi pH aralıklarında üreme gösterdiklerine bakılarak değerlendirme yapıldı.

2.4.2.10. Tuz Tolerans Testi

Hazırlanan besiyerinden 1’er mL steril ependorf tüplere dağıtılıp, önceden hazırlanan taze kültürlerden üzerlerine 100 µl ekim yapıldı. 37 °C’de 48-72 saat inkübe edildikten sonra bakterilerin 1 M, 2 M ve 3 M’lık ortamlarda üreyip üremediklerine bakılarak değerlendirme yapıldı.

2.4.2.11. Hareket Testi

Bazı bakteriler flagella adı verilen hücre organelleri sayesinde aktif hareket etme yeteneğine sahiptirler. Bakterilerde hareket daha çok flagella varlığının belirlenmesi değil, hareketlerin gösterilmesi şeklinde ortaya konulmaktadır. Makroskobik ve mikroskobik olarak yapılan hareketlilik testinde, uygun koşullarda geliştirilmiş 18-24 saatlik genç kültürlerle ihtiyaç vardır. Taze bakteri kültürlerinden iğne özeye hareket besiyerine dik olacak şekilde batırılıp çekilmesiyle inokülasyon yapıldı. 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra besiyerinde bakterinin yayılımı olup olmamasına göre sonuç değerlendirildi.

2.4.3. *Bacillus* Suşlarının Enzim Aktivitelerilerinin Belirlenmesi

2.4.3.1. Lektinaz Testi

Bu test, yumurta sarısında bulunan lipoprotein komplekslerinin bakteriler tarafından oluşturulan lektinaz ve fosfolipaz enzimleri ile hidroliz edilebilme durumunu belirlemek için yapılır. Koloniler etrafında lektin hidrolizasyonu zonu oluşan açılmalar ve opaklaşmalar pozitif olarak değerlendirildi.

2.4.3.2. Üreaz Testi

Bakterilerin üreaz enzimi vasıtasıyla üreyi parçalayıp, parçalamadığı tespit edilir. Bazı organizmalar tarafından üretilen üreaz üreyi parçalayıcı özelliğe sahiptir. Üreazın varlığı fenol kırmızısı (fenolfitalin) ihtiva eden üre besiyerinde tespit edildi. Üre parçalandıkça oluşan amonyak, alkali bir ortam yaratır ve neticede fenol kırmızısı koyu pembeye dönüşür. Dolayısıyla, pembe renk oluşumu üreaz için pozitif olarak değerlendirildi.

2.4.3.3. Karboksil Metil Selülaz (CMC) Testi

Bakterilerin selülaz aktivitesi gösterip göstermediğini belirlemek için kullanıldı. İzolatlardan CMC agar besiyerlerine çizgi ekim yapıldı ve 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyerlerine % 0,1’lik kongo kırmızısı çözeltisinden dökülerek 15 dk. boyada bekletildi. Bu sürenin sonunda boya dökülerek rengin açılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilerek 15 dk. bekletildi. Boyama işlemi sonunda selülaz üreten kolonilerin çevresinde boyanmayan şeffaf hidroliz zonlarının meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Hols vd., 1994).

2.4.3.4. Proteaz Testi

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Bu test bakterilerin proteaz enzimi üretilip üretilmediğini belirlemek için yapıldı. İzolatların besiyerine ekimleri yapıldı ve 37 °C’de inkübasyona tabi tutuldu. Düzenli periyotlarda takip edilerek petri etrafında açık zon oluşturan koloniler proteaz pozitif olarak kabul edildi (Carlisle ve Falkinham, 1989).

2.4.3.5. Amilaz Testi

Amilazlar, nişastanın hidrolizasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bu test bakterilerin amilaz enzimi üretilip üretilmediğini nişastalı besiyerinde hidroliz zonu oluşturması esasına dayanır. İzolatların nişastalı agar besiyerine ekimleri yapıldı ve 37 °C’de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında petri yüzeyleri lugol solüsyonu ile

kaplandı ve 5 dk. bekletildi. Amilaz üreten izolatlar kolonilerin etrafında oluşan beyaz hidroliz zonuyla belirlendi (Aygan, 2008).

2.4.3.6. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test bakterilerin jelatini hidrolize eden jelatinase enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Jelatin protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilir. Taze bakteri kültürlerinden besiyerlerine ekimleri yapıldı ve 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri kontrolleriyle birlikte buzdolabında +4 °C’de 1-2 saat bekletildi. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halde ve katılaşmadığı görülür. Bu durum jelatin testi için pozitif kabul edilirken, jelatinin katılaşması negatif olarak kabul edildi (Aygan, 2008).

2.4.4. Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu

2.4.4.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bakteri izolatları, genomik DNA izolasyonu için MHB sıvı besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu, Sambrook vd. (1989)’nin izolasyon prosedürlerine göre aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- ✓ Gece kültürleri 13.000 rpm’de 3-4 dk. santrifüj edilerek çöktürüldü.
- ✓ Pellet üzerine 500 µL TE tamponu (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) ilave edilip çözüldü.
- ✓ Her bir tüpe 500 µL lizozim enzimi konulup, 37 °C’de 1 saat bekletildi.
- ✓ Her bir tüpe 50 µL % 10’luk SDS eklenerek 5-6 kez alt üst edildi ve 37 °C’de 30 dk. bekletildi.
- ✓ Sonrasında her tüpe 3 M’lık 1/10 hacim sodyum asetat (Na-Ac pH 5.2) eklenip, 65 °C’de 10-30 dk. alt üst edilerek bekletildi.
- ✓ Her tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilip vortekslendi ve 5 dk. 13.000 rpm’de santrifüj edildi.
- ✓ Tüplerdeki süpernatant kısım temiz ependorf tüplere aktarıldı.

- ✓ Tüplere 500 µL kloroform ilave edildi ve tüpler alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı.
- ✓ Tüplere tekrar 500 µL kloroform ilave edildi ve tüpler alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Böylece bu işlem iki kez tekrarlandı.
- ✓ Tüplere sonrasında 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim (yaklaşık 900 µl) % 96'lık soğuk etanol ilave edilerek -20 °C'de 45 dk. bekletildi.
- ✓ Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilip pelletler alınarak üzerlerine 500 µL % 96'lık soğuk etanol ilave edildi ve 5 dk. santrifüj edildi.
- ✓ Pelletler üzerine 500 µL % 70'lik soğuk etanol ilave edilerek tekrardan 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatantlar atılıp pelletler alınarak 37 °C'de kurutulduktan sonra 75 µL TE RNase içerisinde çözüldü.

İzole edilen DNA'lar % 1'lik etidyum bromür içeren agaroz jelde 100 V'da yaklaşık 20 dk. kadar yürütülerek UV ışığı altında görüntülendi. Elde edilen DNA örnekleri kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.4.4.2. 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Aşağıdaki gibi örnek başına toplamda 50 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR ependoflarına karışımdan 49 µL konulup, kontrolle 1 µL su diğer tüplere ise 1 µL DNA eklendi. 16S MER programına göre PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µL agaroz jelde yürütülerek UV ışığı altında görüntülenip sekans analizi için Macrogen firmasına gönderildi. Sekans analizinden sonra veriler NCBI gen bankası verileriyle karşılaştırılarak tür tanısı doğrulandı (Sambrook vd., 1989). PCR reaksiyon karışımı için;

10 X Buffer mix	5 µL
MgCl ₂	3 µL
dNTPmix	2 µL
Primer1	1,5 µL
Primer 2	1,5 µL

<i>Tag</i> DNA Polimeraz	0,4 µL
ddH ₂ O	35,6 µL
DNA	1 µL (Kontrol için 1 µL ddH ₂ O)

2.4.5. Bakterilerin Bitki Gelişimine Etki Eden Faktörlerin Araştırılması

2.4.5.1. Fosfat Çözünürlüğü Testi

Bir gecelik kültürlerden fosfat besiyerine bakteri ekimleri yapıldıktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşumu pozitif sonuç, zon oluşmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi (Aydoğan vd., 2013).

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

Bir gecelik sıvı kültürlerden ACC Deaminaz besiyerine 50 µL bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda bakteri üremesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Dworken ve Foster, 1958).

2.4.5.3. Siderofor Üretimi Testi

Bir gecelik sıvı bakteri kültürlerinden 1 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde hazırlanıp Cas Agar besiyerine 5 µL’lik ekim yapıldı. 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra UV ışığı altında sonuçlarına bakıldı. Bakteri kolonilerinin etrafında sarı renkte haloların görülmesi siderofor üretimi yönünden pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

2.4.5.4. IAA (İndol Asetik Asit) Testi

Bu test izole edilen suşların bitki gelişimi için önemli bir etken olan indol asetik asit hormonunun üretilip üretilmediğini test edilmesi 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.

2.4.5.5. Amonyum Üretim Testi

Pepton water besiyerine bir gecelik bakteri kültürlerinden 30 µL ekilerek 30 °C'de 4 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüplere 1 mL Nessler reagent eklenerek renk değişimi gözlemlendi. Amonyum üretimi için açık sarı renk oluşumu pozitif sonuç, renk değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirildi (Bakker, 1987).

2.4.6. Bakterilerin Metal Toleranslarının Araştırılması

2.4.6.1. Bakterilerin Metalli Katı Besiyeri Ortamında Üretimleri

Bacillus izolatlarının metal içeren katı besiyerlerinde Pb, Ag, Fe, Cu ve Zn metallerine karşı gösterdikleri direnci belirlemek amacıyla yapılan bir testtir. MHA besiyerinde canlandırılan bakterilerden tek koloni alınıp 3 mL MH broth'a pasaj yapılarak bir gecelik saf kültürleri hazırlandı. Her bir suşun önceden hazırlanıp plaklara dökülen farklı konsantrasyonlardaki metal (1, 2,5, 5 ve 10 mM) içerikli besiyerlerine, 3 µL olacak şekilde nokta ekimleri yapıldı. Bakteri içermeyen metalli besiyeri ve metal içermeyen besiyerleri kontrol olarak kullanıldı. Ekimler en iyi üreme ısısı olan 36 °C'de 72 saat inkübe edildikten sonra üreme özellikleri, koloni morfolojileri, hidrolizasyon zonu oluşturup oluşturmadıkları gibi özelliklerine bakıldı. Bir haftalık inkübasyondan sonra oda ısısına alınarak 1 ay boyunca izlenip değişimleri kaydedildi. Yüksek metal konsantrasyonlarında üreyebilen suşlar metale dirençli suşlar olarak belirlendi. En yüksek konsantrasyonlarda üreyen *Bacillus* sp. suşları bir sonraki çalışma için seçildi (Velásquez ve Dussan, 2009).

2.4.6.2. Sıvı Besiyeri Ortamında Kurşun Toleransının Araştırılması

Kurşunlu katı besiyerlerinde üreyen suşların tekrardan sıvı besiyerinde üreme yeteneklerini araştırmak için yapılmış bir testtir. Bu amaçla en iyi üreme gösteren suşlardan 2,5, 3 ve 5 mM olmak üzere 3 farklı kurşun konsantrasyonunda üremelerine bakıldı (Srinalt vd., 2002). Bunun için 100 mL'lik MHB sıvı besiyerlerine 2,5, 3 ve 5 mM'lık stok kurşun çözeltilerinden eklenerek besiyeri hazırlandı. Besiyerlerine bir gecelik bakteri kültürlerinden 0,5 mL ekim yapıldı ve 36 °C'de 150 rpm'de 24 saat inoküle edildi. En iyi üreme gözlenen en yüksek metal konsantrasyon değeri çalışma için seçildi. Bakteri kültürleri sonrasında +4 °C'de 20 dakika 9000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöken bakteri hücreleri saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra vortekslenip homojen edildi ve 24 saat 65 °C'lik etüvde kurumaya bırakıldı. Kuruyan bakteri hücreleri ezilerek parçalandıktan sonra mikrodalga parçalama sisteminde yakma işlemine tabi tutuldu. Sıvı kısımda (süpernatant) alınarak kalan kurşun miktarının belirlenmesi için aynı işlemlere tabi tutuldu (Velásquez ve Dussan, 2009). Yakma işlemlerinden sonra kurşun miktarlarının belirlenmesi için ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma/Optik Emisyon Spektrometresi) ile ölçüm yapıldı.

2.4.6.3. Bakterilerde Kurşun Minimum İnhibisyon (MIC) ve Minimum Bakterisit (MBC) Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Kurşun 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 kurşunun ½ seri dilüsyonlarından 100 µL'si damlatıldı. Kültürler 36 °C'de 24-48 saat sonra inkübe edildikten sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Kurşunun MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi için steril şartlarda hazırlanan bakteri kültürleri kullanıldı. Mikrodilüsyon tekniğiyle MHB besi ortamında eliza plakalarında 100 mM kurşunun ½ seri dilüsyonları yapıldı. Üzerine kültürden 20 µL ilave edildi ve 36 °C'de 24-48 saat sonra inkübe edildi. Üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki kurşun miktarı MIC olarak belirlendi.

Kurşunun bakteriyi öldüren dozunun (MBC) belirlenmesi için, MIC testinde üremenin olmadığı kuyucuklardaki besiyerinin tüm 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.

2.4.6.4. Bakterilerin Pb'li ve Pb'siz MHB Besiyerinde Üreme Eğrileri

Suşların kurşun varlığında ve yokluğunda farklı pH aralıklarında MHB sıvı besiyeri ortamında ki üreme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. MHA besiyerinde 3 mM Pb içeren ortama adapte olmuş kültürlerden tek koloni alınarak Pb içeren MHB besiyerine pasaj yapıldı ve 1 gece 36 °C'de kültürleri edildi. Bu kültürlerden steril distile suya McFarland 0,5 bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı. Steril Dansite metre plağına 200 mL 3 mM Pb içeren farklı pH'larda (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5) MHB besiyerleri dağıtıldı. Kontrol için Pb içermeyen farklı pH'larda 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.

2.4.6.5. Spektrofotometrik Yöntemlerle Belirlenmesi

Kurşunun sulu ortamlarda (dH₂O ve MHB) 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 250-700 nm dalga boyunda spektrumları alındı. Bu spektrumlarla kurşun standart eğri grafiği oluşturuldu. Aynı ortamlardan 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 kurşunu zamana göre absorbans (bağlama/indirgeme kapasitesi) özelliği 250-700 nm dalga boyunda spektrumları alınarak araştırıldı ve grafikleri yapıldı.

Kurşun için farklı (1, 2 ve 3 mM) konsantrasyonlarda en iyi üreme gösteren bakterilerden biri seçildi ve bakteri varlığında sıvı ortamda kurşun absorpsiyonu ölçülmesi planlandı. Bu amaçla 3 mM kurşun içeren ve farklı pH'lara ayarlanan MHB besiyeri 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 alınarak 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantları steril ependorflara aktararak spektrofotometrik ölçümleri alınacağı süreye kadar -20 °C'de bekletildi. Tüm örnekler tamamlandıncaya 100 mL olarak düz tabanlı eliza plakalarına 3 tekrarlı dağıtılarak 250-700 nm dalga boyunda spektrumları alındı. Veriler excelde aktararak grafikleri elde edildi.

2.4.7. Bitki Denemeleri

2.4.7.1. Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumlarında Çimlenme Deneyi

Çalışmada mısır tohumlarının kurşun ve bakteri varlığında çimlenme başarısı ölçülmesi amaçlandı. Bu amaçla öncelikle bakterinin MHB içinde 30 °C'de 150 rpm'de 24-48 saatlik kültürleri hazırlandı. Mısır tohumları 24-25 gr gelecek şekilde tartıldı. Her bir grup boyası gidene kadar musluk suyunda 2-3 kez yıkandı. % 70'lik etanol'de 3 dk. bekletildi, sonra % 3'lük çamaşır suyunda 3 dk. daha bekletildikten sonra steril distile su ile hudun içinde çamaşır suyu kokusu gidene kadar yıkandı. Mısırlar her bir grup için 10 adet mısır gelecek şekilde erlenlere steril şartlarda aktarıldı.

Bakterilerin her birinden steril distile suda 2 günlük MHB besiyerinden alınarak Mc farland 2 sulandırımı hazırlandı. Deney grubu mısır tohumları ve bakterili kontrol grubuna test edilecek bakterinin Mc farland 2 süspansiyonundan 5 mL alınarak, 5 mL % 10'luk steril gumarabik solüsyonu homojen edilerek karıştırıldı. Kontrol grubuna steril su ilave edildi. Tüm erlenler 30 °C ve 150 rpm'de 2 saat çalkalamaya bırakıldı. Süre dolduktan sonra steril şartlarda petrilere 10'ar adet tohum yerleştirildi. Kontrol grupları;

1. Mısır kontrol (kurşunsuz ve bakterisiz); üç tekerrürlü olacak şekilde petrilere 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril 20 mL distile su ilave edildi.

2. Mısır + Pb kontrol (bakterisiz); üç tekerrürlü olacak şekilde petrilere 10'ar tane mısır yerleştirildi ve üzerine 20 mL 3 mM Pb'nin sudaki solüsyonu ilave edildi.

3. Mısır + bakteri kontrol (kurşunsuz); üç tekerrürlü olacak şekilde petrilere 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril distile suda 20 mL ilave edildi. Her tohumu 10^8 bakteri düşecek şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp ilave edildi.

Deney (Mısır + Bakteri +3 mM Pb) grubu; üç tekerrürlü olacak şekilde petrilere 10'ar tane mısır yerleştirildi. Steril distile suda hazırlanan 3 mM Pb solüsyonundan 10 mL ve bakteri süspansiyonundan 5 mL ilave edildi.

Tüm petrilere iklim dolabına tek sıra halinde yerleştirilerek 16 saat gündüz 8 saat gece olacak şekilde $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ '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 çimlenenler 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 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildikten sonra tekrardan tartılarak belirlendi.

2.4.7.2. Saksı Deneyi

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında bitki gelişimini teşvik eden özellikleri en iyi olan ve metallere karşı toleransı yüksek olan *Bacillus thuringiensis* MP7B suşu bitki saksı denemesi için kullanıldı. Deneme düzeni;

Kontrol grup 1: 3 adet saksıda steril toprakta (bakteri ve Pb içermeyen) mısır ekimi

Kontrol grup 2: 3 adet saksıda bakteri içeren (kurşun içermeyen) toprakta mısır ekimi

Kontrol grup 3: 3 adet saksıda 100 mM/L kurşun içeren (bakteri içermeyen) toprakta mısır ekimi

Kontrol grup 4: 3 adet saksıda 200 mM/L kurşun içeren (bakteri içermeyen) toprakta mısır ekimi

Deney grup 1: 3 adet saksı 100 mM/L kurşun ve bakteri içeren mısırlı saksılar

Deney grup 2: 3 adet saksı 200 mM/L kurşun ve bakteri içeren mısırlı saksılar

Çalışmada kullanılacak lisanslı mısır tohumları ilk olarak steril edildi. Bu amaçla tohumlar % 70'lik etanol içinde 3 dk. bekletildikten sonra % 3'lük sodyum hipoklorit içinde 3 dakika daha bekletildi. Daha sonra 6 defa steril distile su ile yıkanarak steril edildikten sonra, steril petriye fitre kağıtlarının arasına tohumlar konulup 48 saat etüvde inkübe edilerek çimlenmesi sağlandı. Çalışmada ticari olarak temin edilen toprak kullanıldı. Bakterinin kurşun tolerans sınırı belirlenmiş olan iki farklı konsantrasyon değeri (100 ve 200 mg/L), toprağa uygulama aşamasında kullanıldı. Topraklar 2 gün ardı ardına 40 dk. 21 °C'de otoklav ile steril edildikten sonra soğuması için 24 saat bekletildi. Çalışmada her saksıya (25x22 cm) eşit miktarda toprak konuldu ve içerisine 5 adet çimlenmiş tohum uygulaması yapıldı. Kontrol için metal uygulaması öncesi ve sonrası ekim yapılmadan toprak örnekleri alındı. Saksılar iklimlendirme kabinetinde, 3.500 lüks ışık altında, 24-25 °C sıcaklıklarda, fotoperiyot 16 saat ışık, 8 saat karanlık (uzun gün) olacak şekilde 4 hafta boyunca inkübe edildi.

Bakteri uygulaması, saksılardaki mısırların gelişmesinin 8. gününde bitkiler 2 yaprak halindeyken yapıldı. Bu aşama için bir dizi ön denemelerle belirlenen *Bacillus thuringiensis* MP7B suşu kullanıldı. Bu amaçla MHA besiyerinde 36 °C'de bir gece kültürü yapıldı, 5 mL MHB içine Mc Farland 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. Pelletler steril distile suda yeniden süspanse edildi ve 600 nm dalga boyunda OD'si 0,536 absorbans değeri olacak şekilde (yaklaşık bakteri miktarı 7.4×10^8 cfu/mL) sulandırımı ayarlandı. 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 15 mL 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 100 ve 200 mg/L kurşun 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 (Albarracin vd., 2010; Ramakrishna vd., 2011; Jiang vd., 2008). 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 musluk suyu yardımıyla kökleri topraktan ayrıldı. Her bir bitkinin yaprak sayısı, yapraklarının uzunlukları, gövde uzunlukları, ana kök uzunluğu ve saçak kökleri sayılarak ölçüldü. Örneklerin yaprak kısımları ve kök kısımları 65 °C’de 24 saat bekletildikten sonra tartılarak kuru ağırlıkları hesaplandı. Tüm veriler SPSS programına aktarıldı.

2.4.7.3. *Bacillus thuringiensis* MP7B Suşunun Metal Absorbsiyonunun Belirlenmesi

Bakterinin metal absorpsiyonunu ICP-OES spektrofotometresinde belirlemek amacıyla deney düzeneği hazırlandı. Deney düzeneği şöyle oluşturuldu;

1. Kontrol grup 1; Kurşun ve bakteri içermeyen pH 7.0±0.2’ye ayarlanmış MHB
2. Kontrol grup 2; Kurşun (3 mM) içeren pH 7.0±0.2’ye ayarlanmış MHB
3. Deney grup1; Kurşun (3 mM) varlığında bakterinin (MP7B) pH 7.0±0.2’ye ayarlanmış MHB sıvı besiyerinde 3 günlük kültürü.
4. Deney grup 2; Kurşun yokluğunda bakterinin (MP7B) pH 7.0±0.2’ye ayarlanmış MHB sıvı besiyerinde 3 günlük kültürü.

Bu amaçla *Bacillus thuringiensis* MP7B suşunun bir gecelik kültüründen 3 mM Pb içeren pH 7.0 ±0.2’ye ayarlanmış 250 mL MHB besiyerine 3 (1:10) mL ekim yapıldı. Kontrol için aynı şartlarda hazırlanmış kurşun içermeyen besiyerine, aynı miktarda ekim yapıldı ve 36 °C’de 3 gün 150 rpm de inkübe edildi. Kültürler 3 gün sonra soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Sıvı kısım içinde kalan kurşun miktarını ölçmek için ayrı bir steril kaba alındı. Bakteri pelleti 3 kez steril distile su ile yıkandı. Elde edilen pellet 65 °C’de 3 gün kurutulduktan sonra 0,3 g tartılarak ICP-OES ile kurşun analizi için yakma deneyine

hazırlanmak üzere stoklandı. Kurşunlu ve kurşunsuz kültürlerin sıvı kısımları ve bakterisiz besiyeri kontrolleri kurşun içeriğinin ölçülmesi için kullanıldı.

2.4.7.4. ICP-OES’de Kurşun Metal Ölçümü için Yakma İşlemlerinin Yapılışı

Mısır bitkisinin kök ve yapraklarındaki kurşun içeriğinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan ICP-OES analizi için numunelere yaş yakma işlemi uygulandı ve bu işlem için bitki yakma programı kullanıldı. Bunun için 300 mg (0,3 g) toz haline getirilmiş kuru bitki kök ve yaprakları tartıldı, çeker ocak içinde mikrodalga yakma tüplerine konuldu. Üzerine sırasıyla 5 mL HNO₃ (% 65) ve 3 mL H₂O₂ (% 30’luk) ilave edildi. Tüpler 20 dk. belirli aralıklarla sallanarak hücrelerin asitle parçalanması sağlandıktan sonra cihaza yerleştirilip program (°C: 145, P: 50, Power: 70, Ta(min.): 10, Time: 5) çalıştırıldı, yakma işlemi 35 dk. sürdü. Daha sonra cihazdan çıkartılan örnekler 15 mL’lik tüplere aktarıldı. Vatman MN 640w Q125 mm’lik filtre kağıtları kullanılarak süzüldü ve bidistile su ile 50 mL’ye tamamlandı.

Saksı deneyi sonrasında toprakta kalan kurşun miktarının belirlenmesi için yapılacak olan yakma işleminde ise toprak yakma programı kullanıldı. Bu işlem için toprak önceden kurutularak elekten elendi. Sonrasında 1 g ±1 mg olacak şekilde tartılarak mikrodalga yakma tüplerine konuldu. Üzerine sırasıyla 2,35 mL HNO₃ (% 65) ve 7 mL HCl (% 37) ilave edildi. Hafifçe karıştırılıp 2 dk. beklendikten sonra 35dk.’lık yakma işlemi programına (°C: 100, P: 30, Power: 70, Ta(min.): 5, Time: 5) tabi tutuldu. Filtre kağıtları kullanılarak filtreden geçirildi ve bidistile su ile 50 mL’ye tamamlandı.

Bacillus thuringiensis (MP7B) bakterili ve bakterisiz sıvı besiyerinin (süpernatantın) yakılma işlemi meyve suyundaki yakma metodu (microwave digestion of fruit juices) kullanılarak yapıldı. Bunun için her bir sıvı numune örneğinden 5 mL alınarak mikrodalga tüplerine konuldu. Üzerine sırasıyla 5 mL % 65’lik HNO₃ ile 1mL % 30’luk H₂O₂ konuldu. Bekletilmeden kapaklar kapatılıp mikrodalgaya yakmak üzere konuldu. Meyve suyu yakma programında yakma işleme (°C: 170, P: 40, Power: 80, Ta(min.): 5, Time: 10) tabi tutuldu. Yakma işlemi 35 dk. sürdü (Kacar, 2012). Daha sonra cihazdan alınan örnekler aynı şekilde 15 mL’lik tüplere aktarıldı ve tüpler

bidistile su ile yıkanıp kalıntı bırakılmamasına önem gösterildi. Filtre kağıtları kullanılarak filtreden geçirildi ve bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Bakteri pelletleri de kuru bitki yakma metodu kullanılarak yakılmıştır. Bunun için yukarıda anlatılan mısır bitkisi kök ve yapraklarına uygulanan işlemlerin aynısı tekrar edildi. Sonrasında ise kurşun miktarlarının belirlenmesi RTEÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan ICP-OES cihazı ile kurşun (Pb) elementinin ölçümleri yapıldı. Örnekler 3 tekrar olacak şekilde hazırlandı ve ICP-OES cihazında okutulmuş sonuçlar SPSS analiz programında incelendi. Elde edilen ölçüm sonuçlarına aşağıdaki formül uygulanarak gramdaki mineral madde içeriği hesaplanmıştır.

$$\text{Ölçüm sonucu (ppm)} \times 50 \text{ mL} / 0,3 \text{ g} = \dots \text{ ppm/g}$$

2.4.8. İstatistik Analizler

Bütün deneyler 3'er defa tekrar edildi. Sonuçlar ortalamanın standart hatası alınarak ve varyans analizi yapılarak istatistik analize tabi tutuldu. Varyans analizi için bilgisayarda software SPSS21 analiz programı kullanıldı. Anova, Tukey-kramers çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ önem seviyelerinde değerlendirilmeleri yapıldı.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan suşlar, 2012-2013 yıllarında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Pazar MYO bahçesindeki elma ve armut ağaçlarından toplanan 14 adet hastalıklı meyve örneklerinden izole edildi.

Meyve örnekleri steril poşetlere alınarak laboratuvara getirildikten sonra metodolojide belirtilen yöntemlerle ön işlemlerden geçirilerek uygun besiyerlerine ekimleri yapıldı. EMB agarda üremeyen, MHA besiyerinde üreyen toplam 34 farklı izolat saflaştırıldı ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere -20 ve 80 °C'de stok kültürleri yapıldı. İzolatlar Pazar MYO'daki meyvelerden izole edildiğini belirtmek amacıyla MP şeklinde kodlandı (Tablo 5).

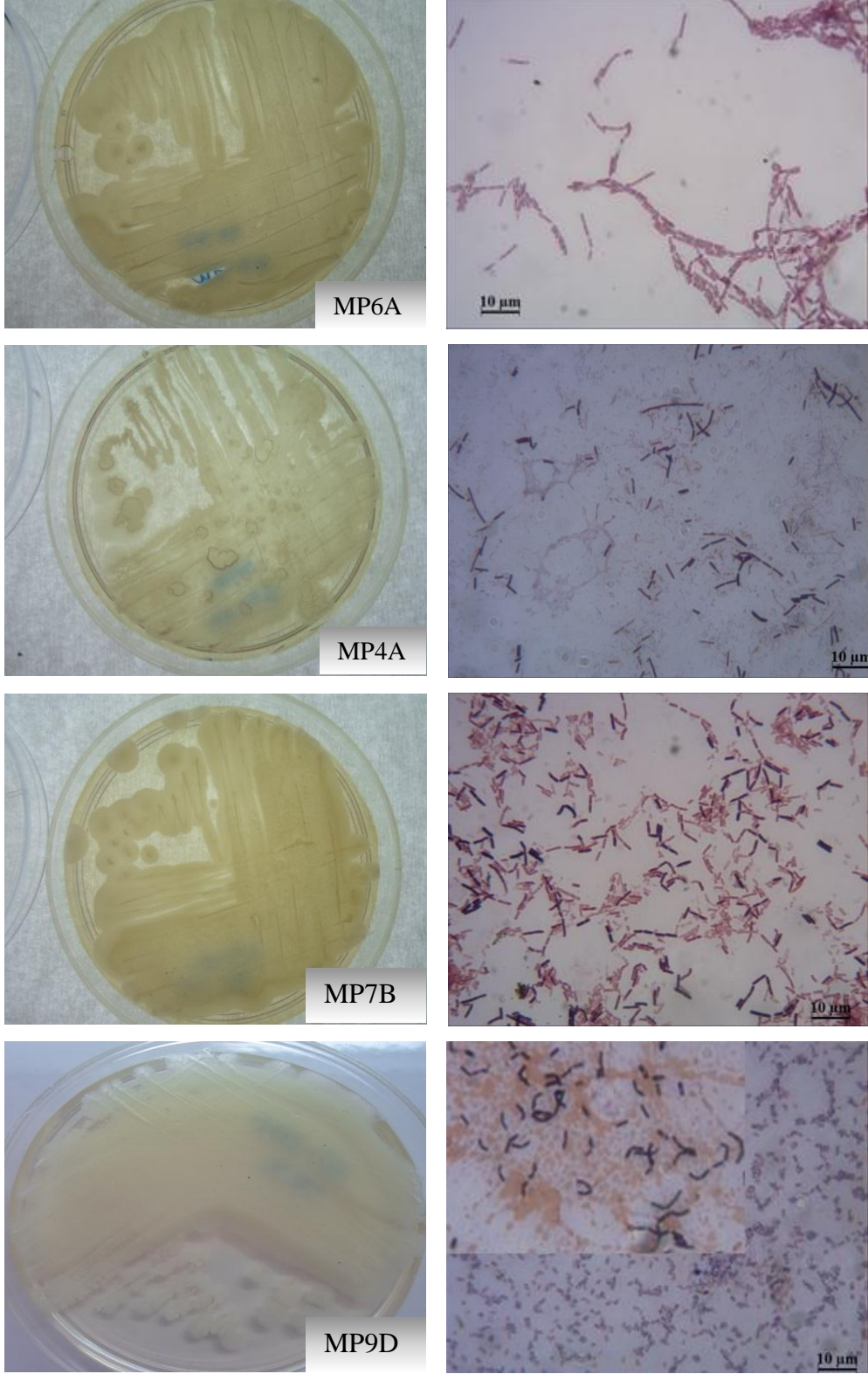
Tablo 5. Çalışmada kullanılan izolatlar ve numaraları.

Sayı (N)	Bakteri Suş No	Sayı (N)	Bakteri Suş No
1	MP 1B	18	MP 10A
2	MP 1D	19	MP 10B
3	MP 1E	20	MP 10C
4	MP 1G	21	MP 10D
5	MP 2B	22	MP 12A
6	MP 4A	23	MP 12A1
7	MP 5MEA	24	MP 12F
8	MP 5MEB	25	MP 13A
9	MP 6A	26	MP 14B
10	MP 7B	27	MP 19A
11	MP 7C2	28	MP 19C
12	MP 7F	29	MP 20D
13	MP 7G	30	MP 22A
14	MP 9A	31	MP 22B
15	MP 9B	32	MP 22C
16	MP 9C	33	MP 22D1
17	MP 9D	34	MP 22E

3.1. Bakterilerin Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların genel üretim besiyerlerinde morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla MHA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Üreyen kültürlerin koloni tipi, koloni rengi, koloni büyüklüğü gibi makroskobik ve Gram boyamalı preparatlarında

mikroskobik özellikleri tespit edildi (Şekil 3). Elde edilen bu veriler, izolatların geleneksel yöntemlerle tanımlanmasında kullanıldı.



Şekil 3. Bazı izolatların MHA besiyerinde koloni morfolojileri ve mikroskobileri.

İzolatların büyük çoğunluğunun R (pürtüklü) tipi, krem renkli koloni morfolojisi gösterirken, 11 tanesinin S (düzgün), 2 tanesinin ise M (mukoid) tipi koloni morfolojisi gösterdiği belirlendi. Sporların hücredeki yerleşimleri çoğunlukla subterminal/santral konumda, 3 tanesinin ise terminal konumda oldukları gözlemlendi (Tablo 6).

Tablo 6. İzolatların bazı morfolojik özellikleri (N=34).

SUŞ	Koloni Tipi	Solunum	Hareket	Gram Boyama	Spor konumu
MP-1B	M	F	-	+	Subt.
MP-1D	S	F	-	+	Central
Mp-1E	R	A.	-	+	Subt.
Mp-1G	R	F	-	+	Subt.
Mp-2B	S	F	-	+	Subt.
MP-4A	R	F	-	+	Subt.
MP-5-MEA	R	F	-	+	Central
MP-5-MEB	S	F	-	+	Subt.
Mp-6A	R	F	-	+	Central
Mp-7B	R	F	+	+	Central
Mp-7C2	M	F	-	+	Central
MP-7F	R	F	-	+	Central
Mp-7G	S	F	-	+	Subt.
Mp-9A	S	F	-	-	Central
Mp-9B	S	F	-	+	Central
Mp-9C	S	F	-	+	Subt.
Mp-9D	R	F	-	+	Subt./Cent
Mp-10A	R	F	-	+	Subt.
Mp-10B	R	F	-	+	Central
MP-10C	S	F	-	+	Terminal
Mp-10D	R	A.	-	+	Terminal
MP-12A2	S	F	-	+	Subt.
MP-12A1	S	F	-	+	Subt.
Mp-12F	R	F	-	+	Central
Mp-13A	R	F	-	+	Subt.
Mp-14B	M	F	-	+	Subt.
MP-19A	S	F	-	+	Terminal
MP-19C	R	F	+	+	Subt./Cent.
Mp-20D	R	F	-	+	Central
MP-22A	R	F	-	+	Subt.
Mp-22B	R	A	-	+	Central
Mp-22C	R	F	-	+	Central
Mp-22D1	R	AE	-	+	Central
Mp-22E	R	F	-	+	Central

S; Düzgün, R; Pürtüklü, M; Mukoid, AE; Anaerobik, A; Aerobik, F; Fakültatif Anaerobik, Subt.; Subterminal, Cent.; Central (Merkezi).

İzolatların karakterizasyonu amacıyla bir dizi fizyolojik özellikleri incelendi. Bu amaçla farklı sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonları gibi fizyolojik özellikleri test edildi (Tablo 7). İzolatların 27'si % 10'luk, 16'sı % 15'lik NaCl ortamlarında üreme

gösterirken, pH 4.5-5.5 ve 8.5'ta ise bütün suşların üreyebildiği belirlendi. Sıcaklık tolerans testlerinde 10 °C ve 37 °C'de bütün suşların üreyebildiği, 45 °C'de ise MP7C, MP7G ve MP12A1 suşlarının dışındaki tüm suşların üreyebildiği gözlemlendi.

Tablo 7. İzolatların fizyolojik özellikleri.

Suş No	NaCl tolerans		Sıcaklık testi		pH testi		
	% 10	% 15	10 °C	45 °C	4.5	5.5	8.5
MP1B	+	+	+	+	+	+	+
MP1D	2+	-	+	+	+	2+	+
MP1E	+	+	+	+	-	2+	+
MP1G	-	-	±	2+	+	2+	2+
MP2B	2+	+	+	2+	+	+	+
MP4A	+	-	+	+	+	+	+
MP5MEA	+	+	2+	2+	+	3+	+
MP5MEB	+	-	+	+	+	2+	3+
MP6A	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
MP7B	-	-	2+	+	+	4+	2+
MP7C	-	±	2+	-	+	2+	2+
MP7F	+	-	+	+	+	+	+
MP7G	-	+	+	-	±	2+	+
MP9A	±	-	2+	+	2+	+	2+
MP9B	+	+	+	2+	+	2+	2+
MP9C	+	-	+	+	±	+	+
MP9D	-	-	+	+	+	+	+
MP10A	-	-	2+	2+	+	2+	2+
MP10B	+	-	+	2+	+	2+	2+
MP10C	+	+	+	+	±	+	3+
MP10D	+	±	+	+	+	2+	+
MP12A2	+	2+	3+	2+	+	+	2+
MP12A1	-	-	2+	-	2+	+	2+
MP12F	+	±	+	+	+	+	+
MP13A	2+	-	2+	2+	±	2+	2+
MP14B	±	-	2+	+	+	+	2+
MP19A1	3+	2+	+	3+	3+	2+	2+
MP19C	+	-	±	+	+	3+	+
MP20D	2+	-	+	+	+	2+	2+
MP22A2	+	-	+	2+	+	+	+
MP22B	+	+	+	+	+	+	+
MP22C	±	-	2+	+	2+	+	2+
MP22D1	+	±	+	+	+	+	+
MP22E	+	+	+	+	+	+	+

-, üreme yok, ±; zayıf üreme, +; iyi üreme, 2-3+; çok iyi üreme

Çalışmada kullanılan izolatların geleneksel yöntemlerle tanımlanabilmesi için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler ve Weiss, 1986) ve The Prokaryotes (Slepecky ve Hemphill, 2006) kaynaklarında belirtilen fizyolojik özelliklerinin yanında bir dizi biyokimyasal özellikleri de test edilip değerlendirildi (Tablo 8). Bakterilerin çoğunluğunda oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitif olduğu, bazılarında zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. İMVİC test sonuçlarına

bakıldığında; metil red reaksiyonuna göre izolatların çoğu pozitif, sitrat testine göre 7'si pozitif, indol üretimi bakımından ise tümü negatif olarak belirlendi. İki şeker (KIA) testine göre ise izolatların çoğu dip asit yüzey asit sonuç verip, H₂S ve gaz oluşumu göstermedi.

Tablo 8. İzole edilen kültürlerin biyokimyasal test sonuçları.

Suş	Oks.	Kat.	İnd.	MR.	Cit.	Nit.	KIA			
							D	Y	H ₂ S	G
MP1B	+	+	-	-	-	++	A	A	-	-
MP1D	+	+	-	+	-	+	A	A	-	-
MP1E	+	+	-	+	+	-	A	A	-	-
MP1G	+	+	-	-	-	2+	A	A	-	-
MP2B	+	+	-	+	-	-	A	Alk.	-	-
MP4A	-	+	-	+	-	2+	A	A	-	-
MP5MEA	±	+	-	+	-	-	A	A	-	-
MP5MEB	+	+	-	+	-	++	A	A	-	-
MP6A	+	+	-	-	-	+	A	A	-	-
MP7B	-	+	-	+	-	+/*	A	A	-	-
MP7C	+	+	-	+	-	-	-	A	-	-
MP7F	+	+	-	+	++	-	A	A	-	-
MP7G	+	+	-	+	-	-	A	A	-	-
MP9A	-	+	-	+	+	-	A	A	-	-
MP9B	-	±	-	-	++	-	A	A	-	-
MP9C	-	+	-	+	-	-	-	A	-	-
MP9D	+	+	-	+	-	-	Alk.	Alk.	-	-
MP10A	+	±	-	+	-	-	A	A	-	-
MP10B	+	+	-	+	-	-	A	A	-	-
MP10C	+	±	-	+	-	-	A	A	-	-
MP10D	+	±	-	+	-	-	A	A	-	-
MP12A2	-	+	-	+	-	+	A	A	-	-
MP12A1	-	+	-	+	-	+	A	A	-	-
MP12F	±	+	-	+	-	-	A	A	-	-
M13A	-	+	-	+	-	+/*	A	A	-	-
MP14B	-	+	-	+	3+	2+	-	Alk.	-	-
MP19A1	+	++	-	+	2+	-	Alk.	Alk.	-	-
MP19C	+	±	-	+	-	+	-	A	-	-
MP20D	+	±	-	+	-	2+	A	A	-	-
MP22A2	+	+	-	±	-	-	A	A	-	-
MP22B	+	++	-	-	-	++	A	A	-	-
MP22C	+	++	-	+	-	-	A	A	-	-
MP22D1	+	++	-	-	2+	2+	A	A	-	-
MP22E	+	±	-	-	-	+	A	A	-	-

In; İndol, MR; Metilred, Cit; Sitrat, KIA: Üç şeker, D: Dip, Y; Yüzey, A: Asit, Alk.; Alkali, G; Gaz, Nit; Nitrat, -; üreme var ancak test sonucu olumsuz, ±; zayıf pozitiflik, +; Sonuç olumlu, 2-3+; Sonuç çok iyi, *; nitrite indirgenme

Çalışmada izole edilen bakterilerin geleneksel yöntemlere göre tür tanısına bakıldığında; sırasıyla % 23,53 *B. mycooides*, % 11,76 *B. pumilis* ve *B. coagulans*, % 8,82 *B. circulans*, % 5,88 *B. cereus*, % 2,94 *B. polymyxa*, *B. fastidiosus* ve *B. megaterium* olarak tanımlanırken, 10 izolat ise *Bacillus* sp. olarak tanımlandı (Tablo 9).

Tablo 9. Geleneksel tanı metotlarına göre tür dağılımları.

Suş No	Türü	Suş No	Türü
MP1B	<i>Bacillus</i> sp.	MP10A	<i>Bacillus</i> sp.
MP1D	<i>B. coagulans</i>	MP10B	<i>B. cereus</i>
MP1E	<i>Bacillus</i> sp.	MP10C	<i>B. circulans</i>
MP1G	<i>B. mycooides</i>	MP10D	<i>B. mycooides</i>
MP2B	<i>B. pumilis</i>	MP12A2	<i>B. circulans</i>
MP4A	<i>B. coagulans</i>	MP12A1	<i>Bacillus</i> sp.
MP5MEA	<i>B. pumilis</i>	MP12F	<i>Bacillus</i> sp.
MP5MEB	<i>B. polymyxa</i>	MP13A	<i>B. coagulans</i>
MP6A	<i>B. circulans</i>	MP14B	<i>B. pumilis</i>
MP7B	<i>B. cereus</i>	MP19A1	<i>B. pumilis</i>
MP7C	<i>B. coagulans</i>	MP19C	<i>B. mycooides</i>
MP7F	<i>Bacillus</i> sp.	MP20D	<i>B. cereus</i>
MP7G	<i>Bacillus</i> sp.	MP-22A2	<i>B. mycooides</i>
MP9A	<i>B. mycooides</i>	MP22B	<i>B.megaterium</i>
MP9B	<i>Bacillus</i> sp.	MP22C	<i>Bacillus</i> sp.
MP9C	<i>Bacillus</i> sp.	MP22D1	<i>B. mycooides</i>
MP9D	<i>B. fastidiosus</i>	MP22E	<i>B.mycooides</i>

3.2. Suşların Bazı Enzim Aktiviteleri ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Özellikleri

Çalışmada tanımlanan bakterilerin bir dizi enzim aktiviteleri (kitinaz, amilaz, proteaz, karboksi metil selülaz, lesitinaz ve jelatinaz) ve bitki gelişimini teşvik eden (Siderofor üretimi, Fosfat çözünürlüğü, ACC deaminaz aktivitesi ve Amonyum üretimi) faktörleri sıvı/agar plak yöntemiyle test edildi (Tablo 10).

Bakterilerden MP1E, MP2B ve MP19A1 suşlarında kitinaz aktivitesi pozitif olarak belirlendi. Suşların 3'ünde güçlü olmak üzere toplam 12'sinde amilaz aktivitesi varlığı belirlendi. Proteaz aktiviteyi incelendiğinde ise suşların 20'si güçlü aktivite gösterirken, 8'inin daha zayıf aktivite gösterdiği belirlendi. Suşların 7'si güçlü olmak üzere 15'inde karboksi metil selülaz ve 4'ü güçlü olmak üzere 12'sinde lesitinaz aktivitesi gözlemlendi. Suşların jelatinaz özelliklerine bakıldığında ise 16 izolat pozitif olarak tespit edildi.

Tablo 10. Tanımlanan bakterilerin bazı enzim aktiviteleri ve bitki gelişimini teşvik edici özellikleri.

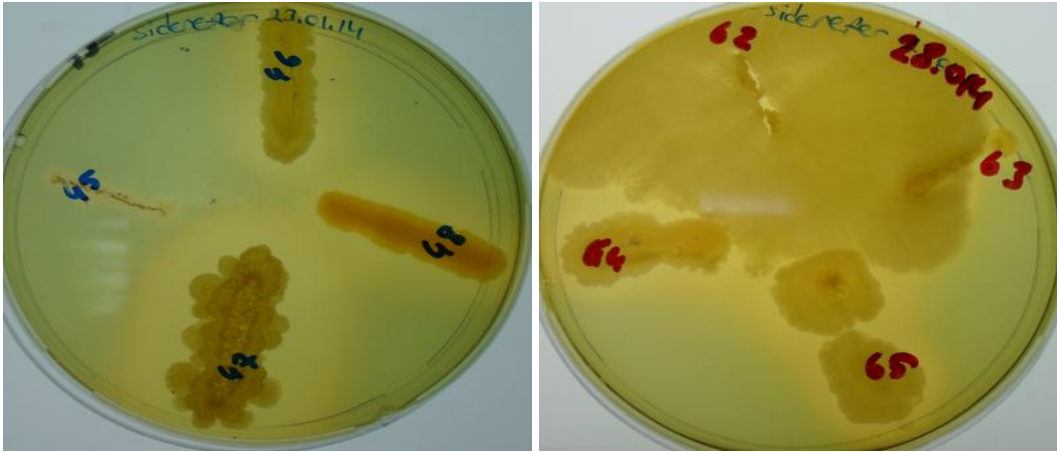
Suş	Üre.	Kit.	Aml.	Pro.	CMC	Les.	Jel.	Sid. Ü/Z (mm)	Fos. Çöz. Ü/Z (mm)	ACC Dea.	NH ₃ Üre.
MP1B	-	-	-	5+	-	-	+	15/28	-	+	2+
MP1D	-	TE	TE	-	TE	-	-	8/23	10/20	-	+
MP1E	-	2+	TE	4+	-	-	-	10/21	-	+	2+
MP1G	+	-	-	3+	-	-	+	10/15	-	+	2+
MP2B	-	2+	±	3+	-	-	TE	5/11	-	-	2+
MP4A	-	-	+	5+	3+	-	+	36/46	-	+	2+
MP5MEA	+	-	-	4+	2+	+	-	9/20	-	-	2+
MP5MEB1	-	-	+	4+	-	-	-	6/8	-	+	2+
MP6A	-	-	2+	4+	3+	4+	+	5/8	-	+	+
MP7B	-	-	+	4+	+	4+	+	9/26	11/17	+	2+
MP7C	-	-	-	4+	-	+	TE	10/17	12/17	+	2+
MP7F	2+	-	-	+	TE	-	TE	TE	TE	TE	TE
MP7G	-	-	±	+	-	-	TE	TE	TE	TE	TE
MP9A	-	-	TE	+	TE	-	-	10/23	11/26	+	2+
MP9B	2+	-	TE	-	TE	-	-	TE	TE	-	-
MP9C	3+	-	-	-	TE	-	TE	3/14	-	-	2+
MP9D	-	TE	-	TE	TE	-	-	9/20	11/25	+	2+
MP10A	-	-	-	5+	-	4+	-	8/12	-	-	4+
MP10B	-	-	-	2+	-	2+	-	10/16	-	+	2+
MP10C	-	-	-	+	3+	-	-	2/4	11/25	-	+
MP10D	-	-	-	3+	3+	+	-	12/24	2/2,5	-	2+
MP12A2	+	-	+	2+	+	-	+	10/17	13/30	+	2+
MP12A1	+	-	+	2+	+	-	+	10/26	-	-	2+
MP12F	-	-	TE	4+	TE	+	+	12/26	-	-	2+
MP13A	-	-	-	5+	+	4+	+	5/8	18/18	-	4+
MP14B	+	-	-	-	3+	-	-	17/31	13/15	+	2+
MP19A1	-	+	+	4+	TE	+	+	14/20	-	-	2+
MP19C	-	TE	TE	4+	2+	-	+	13/40	-	+	2+
MP20D	-	-	-	-	-	-	-	3/5	11/15	+	+
MP22A2	+	-	2+	4+	3+	±	+	31/40	-	+	2+
MP22B	+	-	+	5+	2+	-	+	30/32	-	+	2+
MP22C	-	TE	-	2+	2+	+	+	7/22	-	-	2+
MP22D1	2+	-	2+	4+	-	-	+	14/23	-	+	2+
MP22E	-	-	-	4+	3+	-	+	16/32	-	+	2+

Ü; Üreme, Z; Zon çapı, -; aktivite yok, +; aktivite var, Siderofor üretimi ve Fosfat Çözünürlüğü için 1-9 mm; aktivite var, 10-19 mm; aktivite iyi, ≥20; aktivite çok iyi, TE: Test edilmedi.

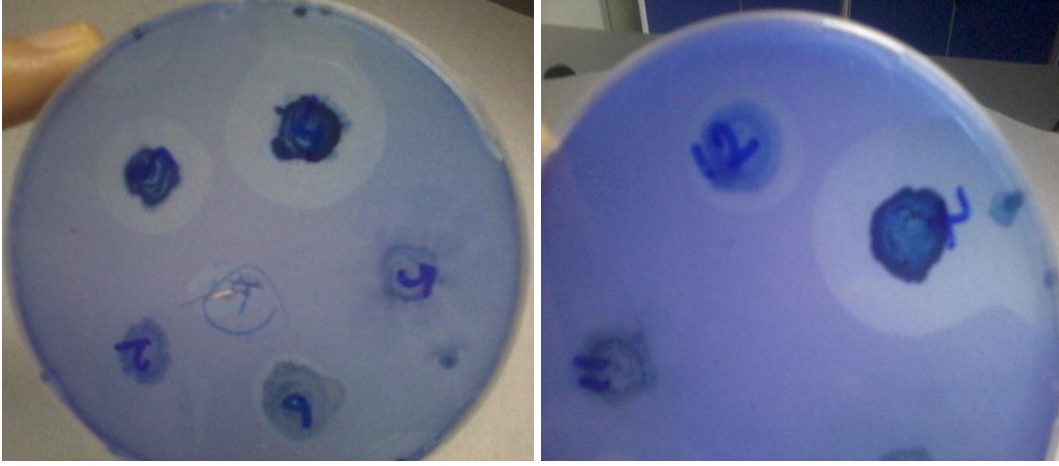


Şekil 4. Bakterilerde lesitinaz (1. Plak; beyaz zon oluşumu) ve proteaz testi görüntüsü (2. Plak: pozitif, 3. Plak: negatif sonuç).

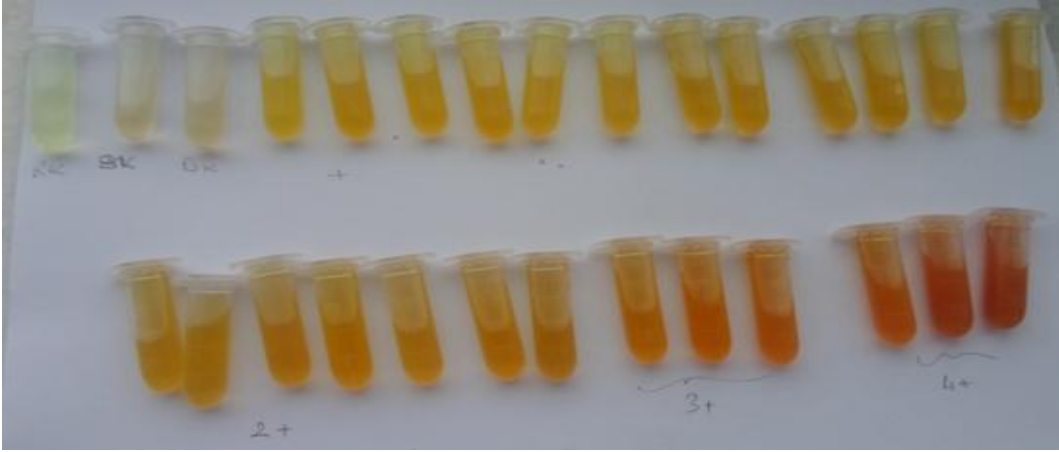
İzolatların 31'inde siderofor varlığı saptanmış olup % 58,82'sinde güçlü pozitiflik gözlemlendi (Şekil 5). İzolatların 5'inde fosfat çözünürlüğü (Şekil 6), 19'unda ACC deaminaz (Şekil 7) pozitifliği yüksek düzeyde tespit edildi. İzolatların 31'inde amonyum üretimi gözlenirken 2'sinde (MP10A ve MP13A) çok yüksek düzeylerde olduğu belirlendi (Şekil 8).



Şekil 5. Demir içeren besiyerinde siderofor üretiminin belirlenmesi. -; mavimsi alan siderofor negatif, +; Sarımsı zon siderofor pozitif, 47: MP19C, 62; MP19C1, 45: MP10C.



Şekil 6. Fosfat içeren besiyerinde fosfataz enzimi (şeffaf zon görünümü testin pozitifliğini verir) aktivitesi.

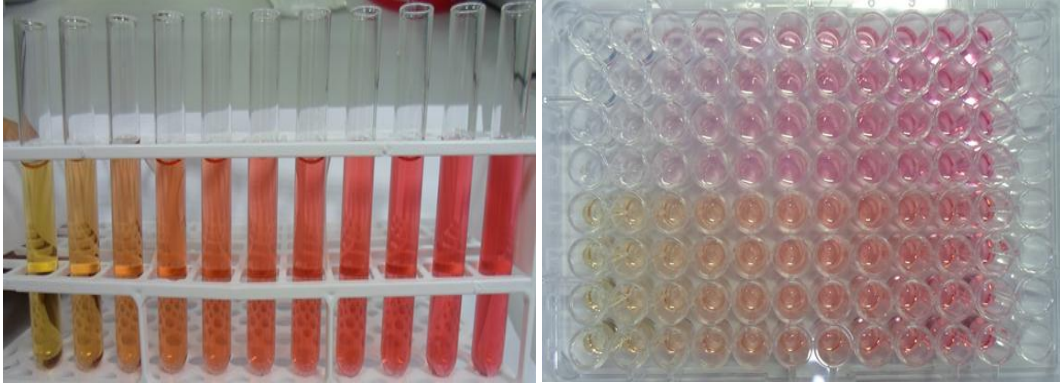


Şekil 7. Amonyum sülfat çözünürlüğü aktivitesinin (kırmızılık artıçça aktivite artar) belirlenmesi. RK; Nessler ayıraçlı negatif kontrol, BK; Besiyeri kontrol, ÜK; Bakteri üreme kontrol, +; zayıf, 2-3+; iyi, 4+; çok iyi aktivite varlığı.



Şekil 8. Bakterilerde ACC deaminaz aktivitesinin varlığı (koloni üremesi testi pozitif kılar).

Çalışmada suşların indol asetik asit üretme yetenekleri spektrofotometrik yöntemle araştırıldı. Test edilen 31 örneğin 11'inde (MP10B, MP1G, MP5MEB1, MP7B, MP9C, MP9D, MP10D, MP12F, MP22A1, MP22D1 ve MP22E) çok iyi düzeyde aktivite gözlenirken, 1 şusta ise aktivite olmadığı gözlemlendi (Tablo 11 ve Şekil 9).



Şekil 9. IAA aktivitesinin (pembe rengin artışı) belirlenmesinde eliza plakalarından bir görünüm.

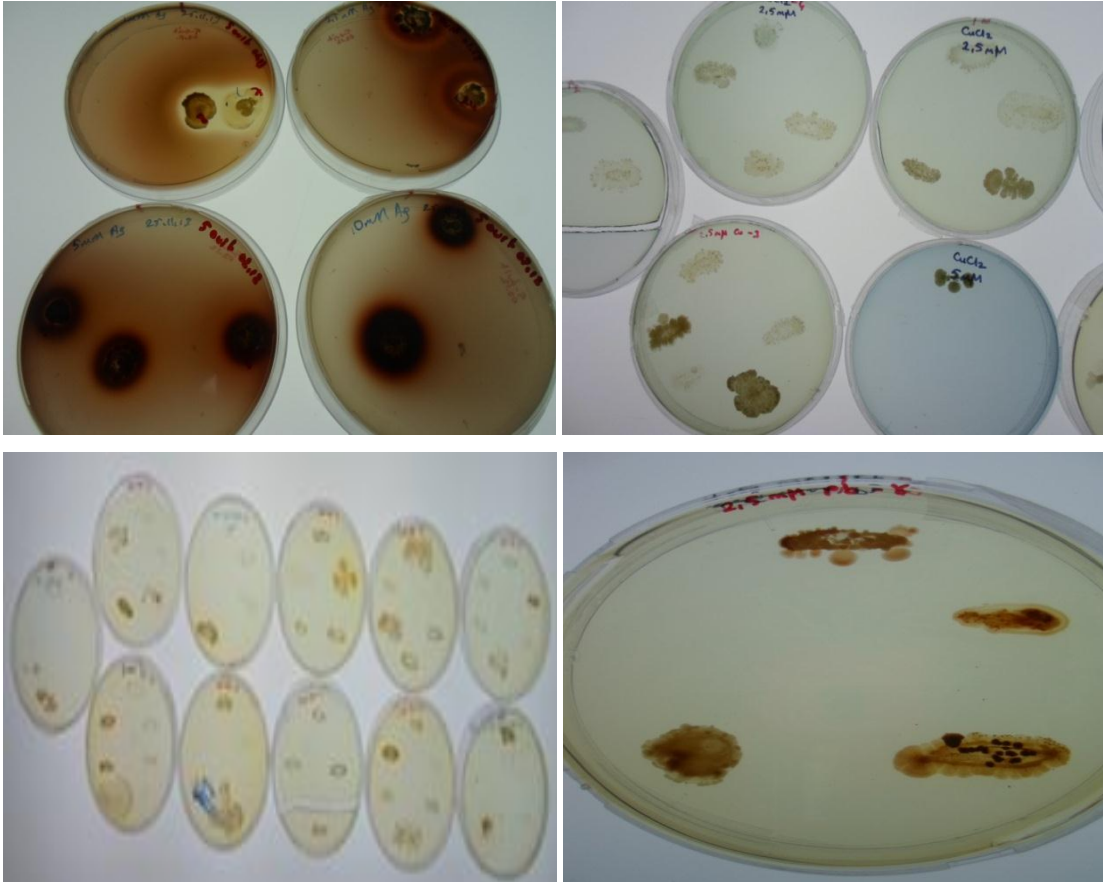
Tablo 11. Mikroorganizmaların indol asetik asit (IAA) aktiviteleri.

Suş No	IAA Aktivite değeri	Suş No	IAA Aktivite değeri
MP1B	10,37±4,37	MP10A	13,13±6,08
MP1D	-2,34±0,06	MP10B	16,05±0,30*
MP1E	5,29±0,10	MP10C	9,70±0,22
MP1G	25,13±10,94*	MP10D	17,11±0,77*
MP2B	11,39±1,07	MP12A2	12,08±3,27
MP4A	13,63±0,99	MP12A1	7,82±1,55
MP5MEA	0,14±1,01	MP12F	20,03±0,57*
MP5MEB1	15,56±0,22*	MP13A	12,89±1,85
MP6A	14,22±0,60	MP14B	14,78±0,18
MP7B	26,85±2,29*	MP19A1	11,90±1,12
MP7C	11,51±0,14	MP19C	10,24±0,61
MP7F	TE	MP20D	9,07±0,12
MP7G	TE	MP22A1	16,02±3,74*
MP9A	8,79±0,35	MP22B	11,94±0,97
MP9B	TE	MP22C	14,34±0,22
MP9C	19,66±1,77*	MP22D1	16,71±2,86*
MP9D	23,66±1,35*	MP22E	15,89±0,29*

TE; Test edilmedi, ≤0; Aktivite yok, 0-9; Aktivite var, 10-15; Aktivite iyi, */ ≥16; Aktivite çok iyi

3.3. Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Çalışmada test edilen suşların 4 farklı (kurşun, gümüş, bakır ve çinko) ağır metal varlığında 1, 2,5, 5 ve 10 mM konsantrasyon ortamlarında üreme özellikleri incelendi. Suşların tümünün 1 mM çinko varlığında rahat üredikleri, diğer konsantrasyonlarda zorlandıkları ve zayıf bir üreme gösterdikleri belirlendi. Gümüş varlığında 1 mM'da 29 suşun üreyebildiği, 9 suşun ise daha iyi üreyip şeffaf zon ve kararmalar oluşturduğu gözlemlendi. MP4A ve MP7F suşlarının ise gümüşün 4 farklı konsantrasyonunda da üreme gösterdiği, şeffaf zon ve kararmalar oluşturduğu gözlemlendi. Bakır varlığında 29 suşun 1 mM'lık konsantrasyonlarda, 20 suşun 2,5 mM'da, 1 suşun (MP9C) 5 mM'da, 8 suşun ise bakırın tüm konsantrasyonlarında üreme özelliği gösterdiği belirlendi. MP7C2 suşunun besiyerinde kararmalar oluşturduğu, MP9C'nin ise bakır için en iyi üreme potansiyeline sahip suş olduğu belirlendi. Eskiyen kültürlerin kolonilerinde daha bariz renk değişimlerinin olduğu besiyeri renklerinin açıldığı gözlemlendi (Tablo 12, Şekil 10).



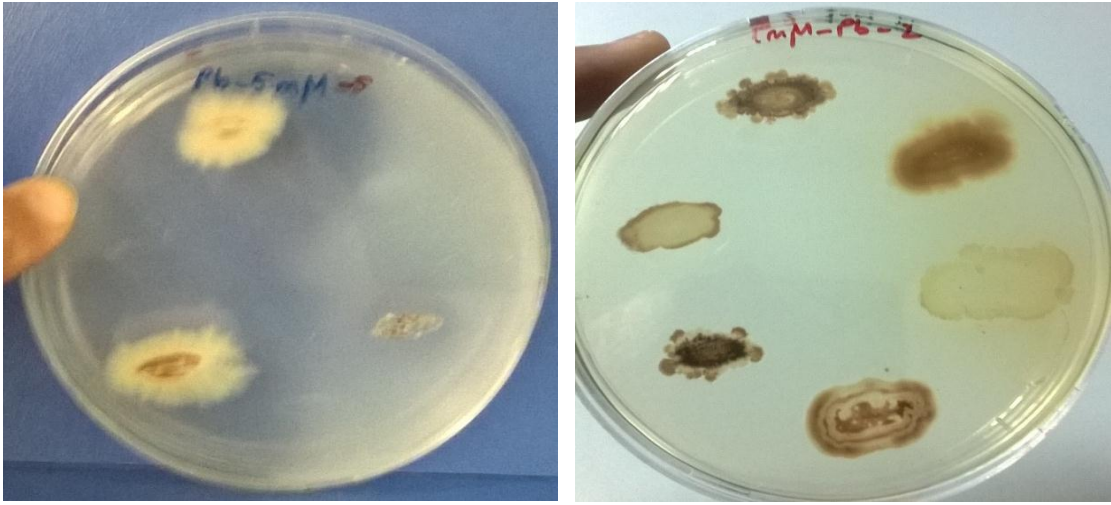
Şekil 10. Farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat, bakır sülfat, çinko klorür ve kurşun nitrat varlığında üreme (kültürlerin 7. gün sonuçları).

Tablo 12. Bakterilerin MHA ortamında, metal tuzlarının farklı (1, 2,5, 5 ve 10 mM) konsantrasyonlarında üreyebilme ve zon çapları (mm).

Suş	AgNO ₃ (mM)				CuCl ₂ (mM)				Pb NO ₃ (mM)				ZnSO ₄ (mM)			
	1	2,5	5	10	1	2,5	5	10	1	2,5	5	10	1	2,5	5	10
MP19A	±	-	-	-	17	10	-	-	17 k	15	-	-	13	-	-	-
MP12A	±	-	-	-	18	10	±	±	16	16	±	-	13	-	-	-
MP10D	13/15	-	10	+ k	20	17	-	-	19 kk	14 kk	13 k	-	16	-	-	-
MP20D	+	6 k	+	-	17	-	-	-	23 kk	12 kk	-	-	12	-	-	-
MP1G	11/13	-	-	-	±	±	±	±	30	17 k	6 k	-	18	±	±	+
MP5MEB	+	-	-	-	15	±	±	±	2 k	16 k	14 kk	-	21	±	±	-
MP7G	6/8	-	-	-	17	15	±	-	12 k	10 kk	-	-	10	-	-	-
MP2B	±	±	± k	-	18	14	-	-	23	14 k	-	-	13	-	-	-
MP22A	-	-	-	-	-	-	-	-	19 k	16 k	-	-	13	-	-	-
MP22D1	-	-	-	-	15	13	-	-	15 k	13 k	1 k	-	14	-	-	-
MP12F	10/11	-	-	-	11	-	-	-	16 k	15 k	12	-	13	-	-	-
MP13A	-	-	-	-	53	16	±	-	60	40	23/56 ş	10 k	14	-	-	-
MP22B	+	±	5/6	-	28	10	±	-	28 k	20 k	14 k	±	17	12	10	-
MP5MEA	9/10k	+ k	-	6 k	18	19	±	±	29 kk	20 k	14 k	±	18	1	1	±
MP1D	±	-	-	-	8	-	-	-	18 k	18 k	±	±	10	±	±	-
MP10E	±	-	-	-	-	-	-	-	9	3 k	10 rd	-	13	13	13	-
MP1E	±	±	± k	-	19	17	-	-	17 k	18 k	10 rd	-	13	±	±	-
MP9D	11/13k	-	6/7 k	-	19	13	-	-	26 k	17 kk	10 rd	-	13	12	12	±
MP7B	10	-	-	3 k	41	15	-	-	40	3 k	19/50 ş	10	21	14	±	±
MP9A	10	-	-	-	16	15	-	-	15	14	-	-	18	-	-	-
MP22E	-	-	-	-	-	-	-	-	17	14	-	-	16	±	±	-
MP6A	10	-	-	-	23	16	-	-	45	34	25/48 kş	-	18	±	±	±
MP10B	-	-	-	-	16	15	-	-	17 kk	16 kk	14/16	-	15	12	±	±
MP9C	11	±	6	1	18	16	12	±	19	19	11	-	17	14	±	±
MP19C	±	±	±	-	24	-	-	-	22 k	20 kk	10 kk	-	16	±	±	±
MP1B	±	-	-	-	-	-	-	-	32 k	33 k	11 kk	±	20	-	-	-
MP22C	±	-	-	-	15	13	±	±	15 k	18 kk	±	±	20	20	±	±
MP4A	15/20 ş	±	7/8k	7/10ş	±	-	-	-	20	19 kk	12/17kş	±	15	±	±	±
MP10A	±	-	-	-	58	-	-	-	45	40	29/46	±	21	±	±	±
MP12A1	15/12 ş	10	10	60	19	17	±	±	18	16	±	±	17	±	-	-
MP10C	±	-	-	-	-	-	-	-	16	±	±	-	16	-	-	-
MP7F	8 k/11 ş	±	30k/40ş	±	21	20	-	-	19	17	-	-	16	-	-	-
MP7C2	±	±	8	-	19 kk	-	-	-	25 k	8	-	-	1	-	-	-
MP14B	±	±	8	-	15	13	±	±	18 kk	16 kk	±	-	16	-	-	-

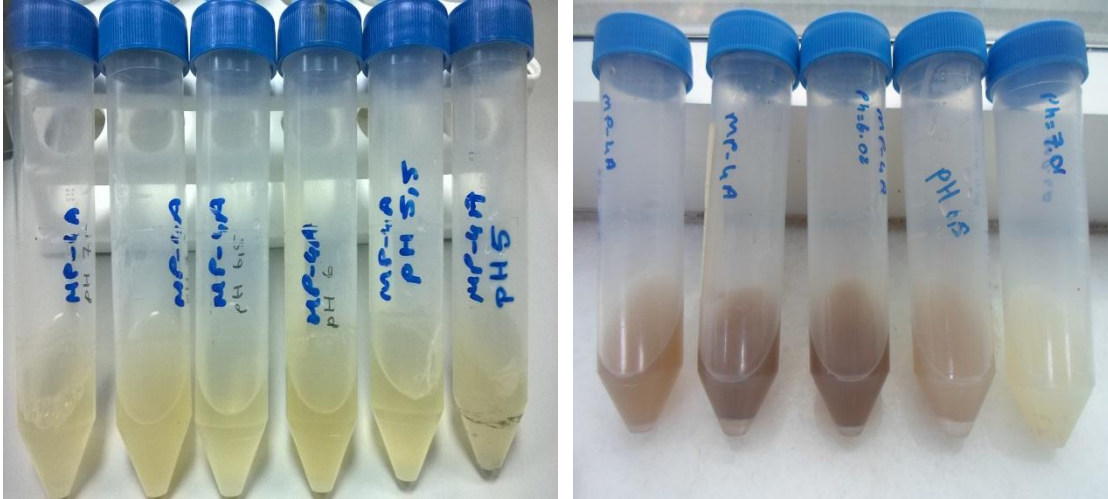
k; kararma, kk: koyu kahve rengi, ş; şeffaf zon, rd: renk değişimi, ;/.; üreme/zon çapı

Kurşun varlığında ise 1 mM ve 2,5 mM'lık konsantrasyonlarda tüm suşların üreyebildiği gözlemlendi. Üreyen suşların bazılarında hidroliz zonuna rastlanırken bazılarında ise kararmalar gözlemlendi. Kurşunun 5 mM'lık konsantrasyonlarında 25 suşun, 10 mM'da ise yalnızca 10 suşun üreyebildiği ve en iyi üreme potansiyeline sahip suşların sırasıyla MP 13A, MP 22B, MP5 MEA, MP 7B, MP 6A, MP 4A ve MP 10A oldukları tespit edildi (Tablo 12). Kurşun metali varlığında en iyi üreme ve reaksiyon gösteren MP7B suşunun kolonilerinde kahverengiden siyahlanmaya dönüşen bariz renk değişimleri ve koloni etraflarında şeffaf hidroliz zonu oluşumları gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Kurşun içeren MHA besi ortamında kültür edilen suşlarda zon oluşumu (5 mM) ve kremden kahverengi-siyaha dönüşen renklenmeler (1 mM).

Kurşun metali varlığında üreme katı agar ortamının yanı sıra sıvı kültür ortamında da denendi ve benzer sonuçlar oluşturduğu gözlemlendi. 2,5 mM ve 5 mM'da konsantrasyonlarında hazırlanan kurşunlu kültürlerde üremenin çok iyi olduğu, kültür ortamında siyahlanmaya dönüşen renk değişimleri ve şeffaflaşmaların olduğu gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Kurşun içeren MHB besi ortamında kültür edilen MP4A suşunun 2,5 mM ve 5 mM ortamlarında ki renk değişimleri.

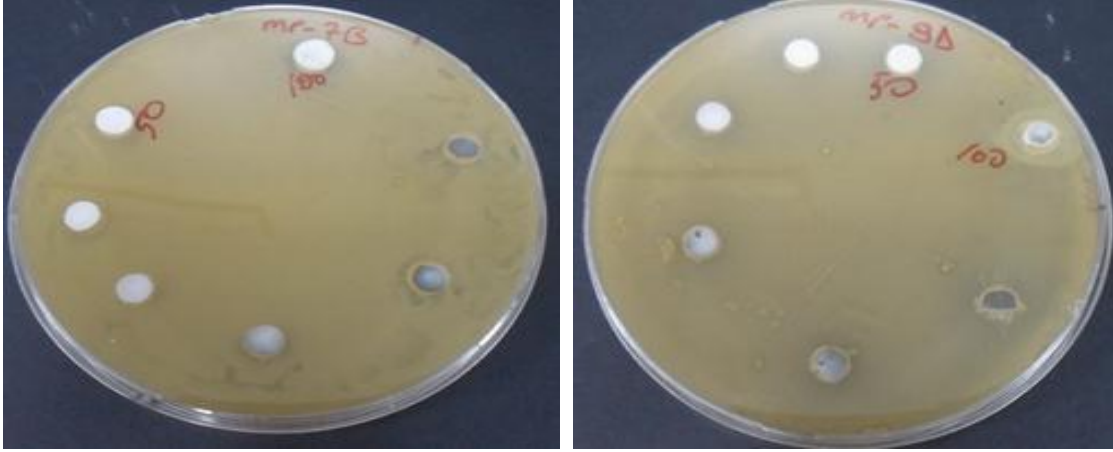
Bakterilerin test edilen parametreleri (bitki gelişimini teşvik etme yetenekleri, enzim aktiviteleri, metaller varlığında üreme ve özellikle de kurşun varlığında en iyi üreme) incelenerek en iyi etkinliğe sahip olan suşlardan 3'ü seçildi. Bu suşlarda kurşun tuzunun minimal inhibisyon (MIC) ve minimal bakterisit (MBC) konsantrasyon değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle test edildi (Tablo 13).

MIC konsantrasyonları incelendiğinde kontrol suş olarak kullanılan *B. subtilis* W168'de dâhil olmak üzere MP7B ve MP9D suşlarının benzer oranda kurşuna dirençli (25 mM/L) oldukları, ancak MP6A suşunun ise 12,5 mM/L konsantrasyona dirençli olduğu belirlendi. Kurşun nitratin bakterisit konsantrasyon değerleri incelendiğinde, kontrol suşu hariç diğer suşların birbirine benzer şekilde 100 mM/L'nin üzerinde, kontrol suş için ise 100 mM/L değerlerinde olduğu belirlendi (Tablo 13, Şekil 13).

Tablo 13. Bakterilerin kurşun toleransının sıvı dilüsyon yöntemiyle MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi.

Örnek No	İnhibisyon (mM/L)	
	MIC	MBC
MP6A	12,5±0	>100
MP7B	25±0	>100
MP9D	25±0	>100
* <i>B. subtilis</i> W168	25±0	100

*: kontrol olarak kullanıldı.

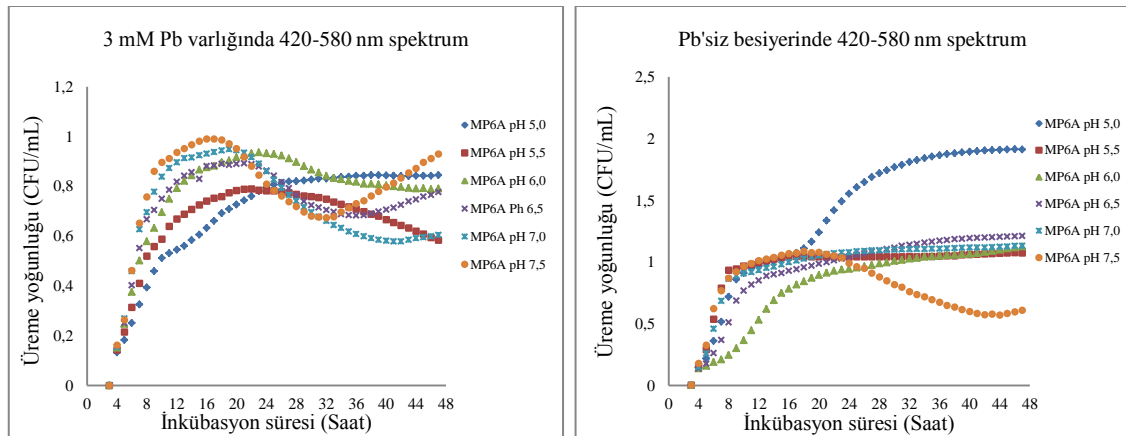


Şekil 13. MP7B ve MP9D suşlarının kurşun toleransının MBC sonuçları.

3.4. Kurşun Varlığında ve Yokluğunda Farklı pH'larda Bakterilerin Üreme Eğrisi

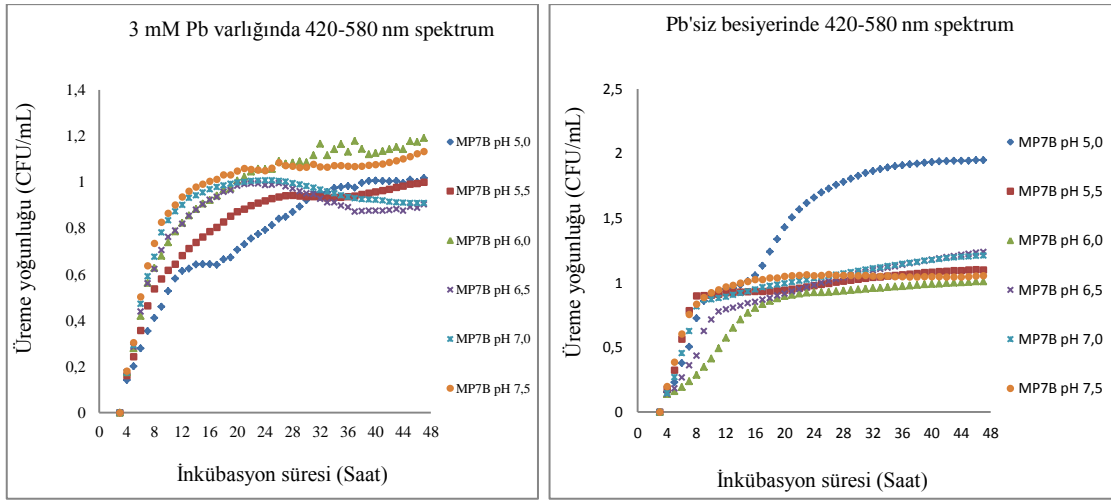
Çalışmada kurşun varlığında iyi üreyen 3 suşun farklı pH ortamlarında (pH 5.0-7.5 aralığında) büyüme özelliklerinin belirlenmesi için optimum üreme ısılarında kurşunlu ve kurşunsuz ortamlarda üreme eğrileri Dansitometre (Bioscrin C) cihazı yardımıyla araştırıldı (Şekil 14, 15 ve 16).

Kurşunsuz ortamda MP6A suşunda pH 6.0-6.5 aralığında üremenin düşük olduğu, logaritmik faza ancak 10-16 saatte ulaştığı sonrasında stasyonel faza geçtiği gözlemlendi. Diğer düşük ve yüksek pH değerlerinde iyi üredikleri pH 5.0'de ise 15-16. saatlerden sonra bir sıçrama yaptığı gözlemlendi. Kurşun metali varlığında ise üremenin düşük pH değerlerinde (pH 5.0-5.5) daha fazla olmak üzere genel olarak etkilendiği, yoğunluğunun düştüğü, logaritmik fazın 8-16 saatte bittiği gözlemlendi (Şekil 14).



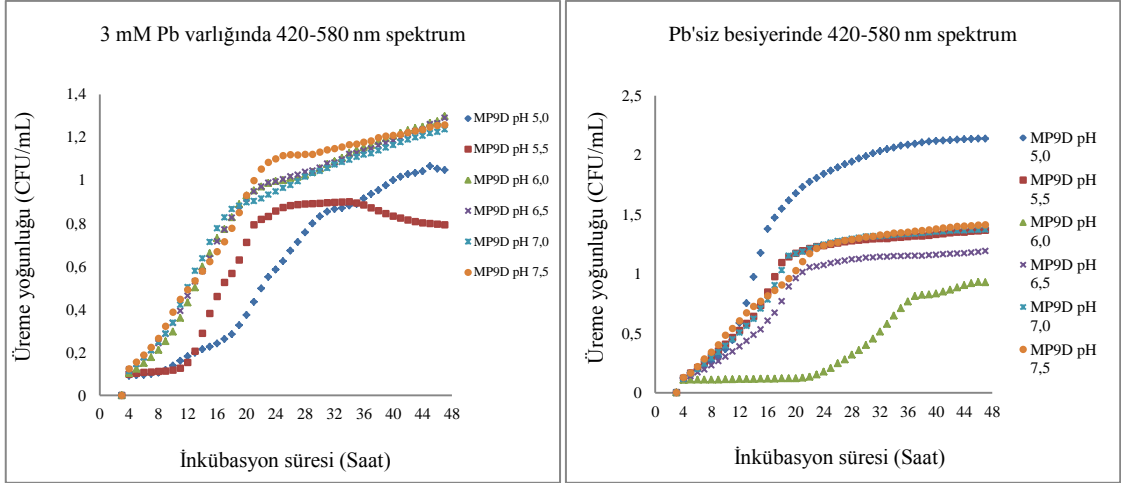
Şekil 14. MP6A suşunun farklı pH'larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi.

MP7B suşunun 3 mM metal varlığında ve yokluğunda üremelerinde önemli sayılabilecek bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Metalsiz ortamda pH 6.0-6.5 aralığında logaritmik fazın uzadığı ancak üreme yoğunluğunun neticede değişmediği, ancak pH 5.5’de 16. saatten sonra ikinci bir logaritmik evre göstererek yoğunluğun 2 kat arttığı gözlemlendi. Metal varlığında ise düşük pH değerlerinde (pH 5.0-5.5) üremenin bir miktar etkilendiği, pH arttıkça üremenin düşük pH değerlerine göre daha iyi olduğu ancak aralarında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 15).



Şekil 15. MP7B suşunun farklı pH’larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi.

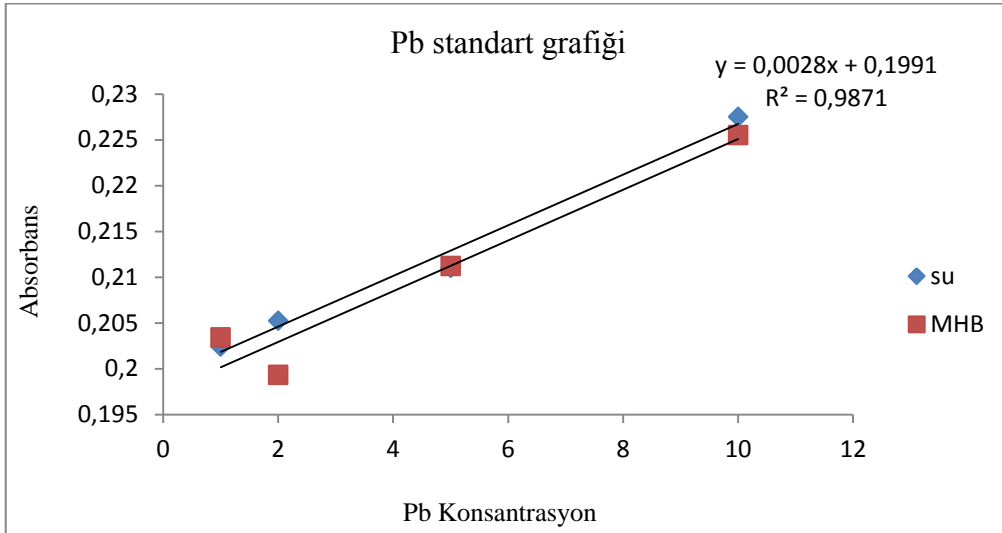
MP9D suşunda metalsiz ortamda üremenin pH 6.0’da çok pH 6.5’de daha az olmak üzere etkilendiği, diğer pH değerlerinde 16 saate kadar benzer üreme hızı ve yoğunluğuna sahip olduğu, ancak pH 5.5 de ise bir artış oluşturduğu gözlemlendi. Metal varlığında ise diğer suşlarda olduğu gibi düşük pH’larda (5.0-5.5) üremenin olumsuz yönde etkilendiği, diğer tüm pH değerlerinde biraz daha düşük yoğunlukta olmakla birlikte benzer üreme yoğunluğuna ve hızına sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 16).



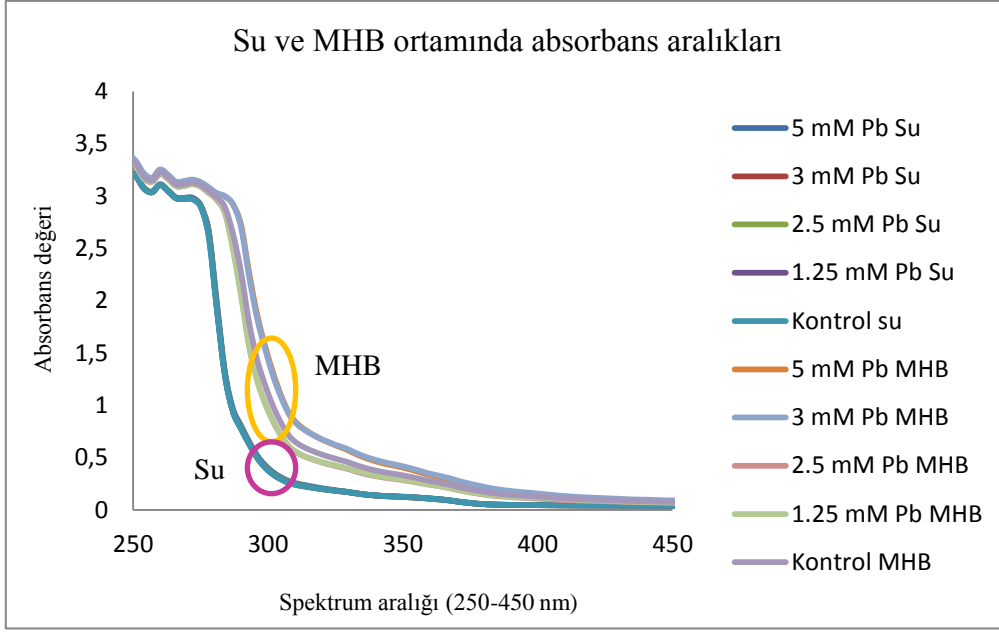
Şekil 16. MP9D suşunun farklı pH'larda kurşunlu ve kurşunsuz ortamda büyüme eğrisi.

3.5. MP7B Suşunun Kurşun Adsorpsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Kurşunun besi ortamıyla olan etkileşimini belirlemek amacıyla su ve MHB ortamlarında 1-10 mM Pb içeren standart solüsyon hazırlanıp OD₂₇₅₋₄₅₀ nm dalga boyunda spektrum alınarak standart eğri çıkarıldı (Şekil, 17). Bu şekilde gözlemlendiği üzere su ortamı ve MHB besiyeri ortamları arasında önemli bir farklılık gözlenmedi (Şekil, 18). Dolayısıyla MHB besiyerinin kurşun adsorpsiyonunun suya yakın değerlere sahip olduğu belirlendi.



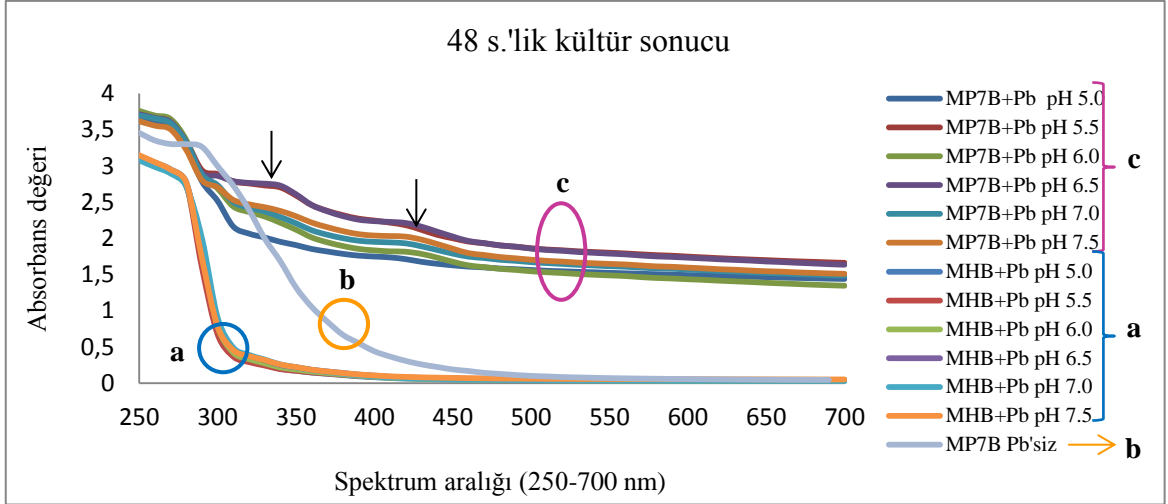
Şekil 17. Kurşunun MHB besiyeri ve su ortamındaki standart eğrisi.



Şekil 18. Kurşunun MHB besiyeri ve su ortamındaki absorbans eğrisi.

Bir dizi özellikler açısından incelenerek seçilen üç suş (MP7B, MP6A ve MP9D) kurşun absorblama/indirgeme yetenekleri incelemek amacıyla 3 mM kurşun varlığında farklı pH (pH 5.0-7.5) aralığında MHB besi ortamında test edildi. Bu özelliği en uygun olan suşun MP7B suşu olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla tezde sadece bu suşun değerleri verildi.

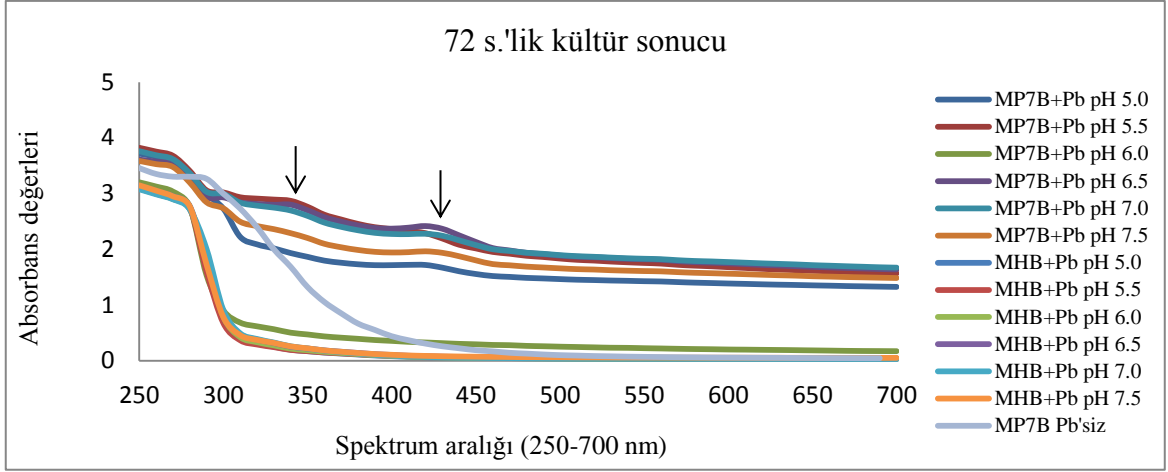
MP7B suşu 3 mM Pb varlığında ve kontrol olarak kurşun yokluğunda, pH 5.0-7.5 ayarlanmış MHB besi ortamlarında 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 36 °C'de inkübe edilen kültürlerden 48, 72 ve 96. saat periyotlarında absorblama/indirgeme değerlerinin belirlenmesi amacıyla örnekleme yapıldı. Örneklerin 250-700 nm aralığında UV-Vis Spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldüğünde 340-350 nm'de MP7B suşu pik oluşturdu ve bu pikin kurşun ait olduğu gözlemlendi (Şekil 19). Spektrumun hem kültür süresine göre hem de pH değerine göre değiştiği gözlemlendi.



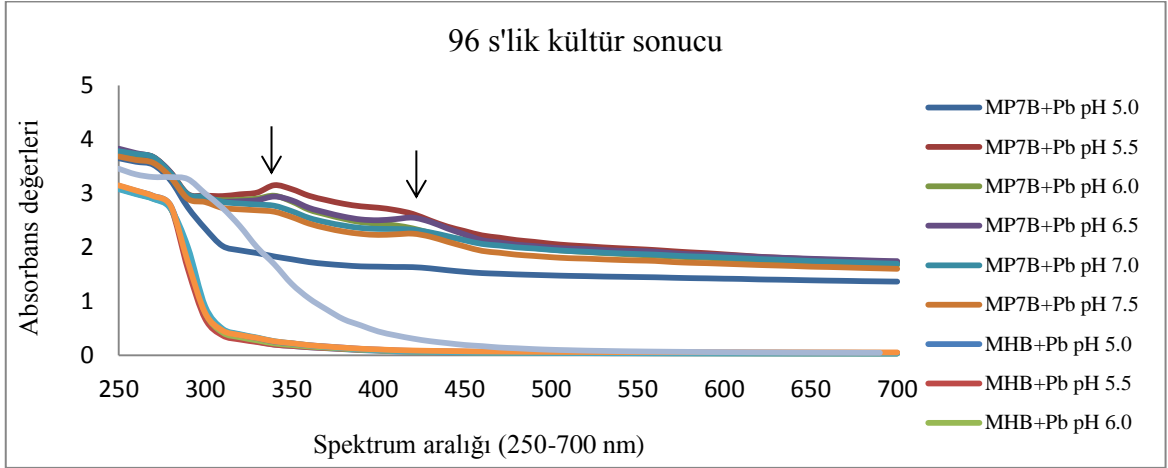
Şekil 19. MP7B suşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36 °C'de 48 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.

Spektrofotometrik ölçümlerde başlıca üç grup eğri gözlemlendi. Birinci grupta farklı pH aralığına ayarlanmış MHB+Pb yer aldığı, absorbanslarının çok düşük olduğu ve pH farklılığında değişmediği gözlemlendi. İkinci grup absorbansında ise MP7B suşunun kurşunsuz kültür filtratı yer aldığı ve kurşuna özgü bir absorbansın olmadığı belirlendi. Üçüncü grup absorbans ise farklı pH aralığındaki MP7B+Pb (3 mM) varlığında gözlemlendi. Absorbans değerinin pH 5.0'de düşük olduğu, en yüksek değer pH 5.5-6.5 aralığında oluştuğu gözlemlendi (Şekil 19). Bu sonuçlar kültürün kurşun varlığında üremesi için en uygun pH aralığının pH 5.5 - 6.5 olduğunu göstermektedir.

İnkübasyon süresi incelendiğinde 48 saatteki absorbans ile 72 ve 96. saatteki absorbans değerleri arasında inkübasyon süresi arttıkça absorbans değerinin 320-340 nm dalga boylarında arttığı izlendi (Şekil 19-21). Bu sonuçlara doğrultusunda MP 7B suşunun metali bağladığı/ya da indirgemiş olduğu belirlenmiş olup bitki denemesinde bu suşun kullanılması ve denemelerin pH 5.0 dışında herhangi bir pH'da yapılması gerektiği tespit edildi.



Şekil 20. MP7B suşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36 °C'de 72 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.



Şekil 21. MP7B suşunun Pb'li ve Pb'siz farklı pH'larda 36 °C'de 96 s. inkübasyondan sonra 250-700 nm dalga boyunda alınan spektrumları.

3.6. Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı

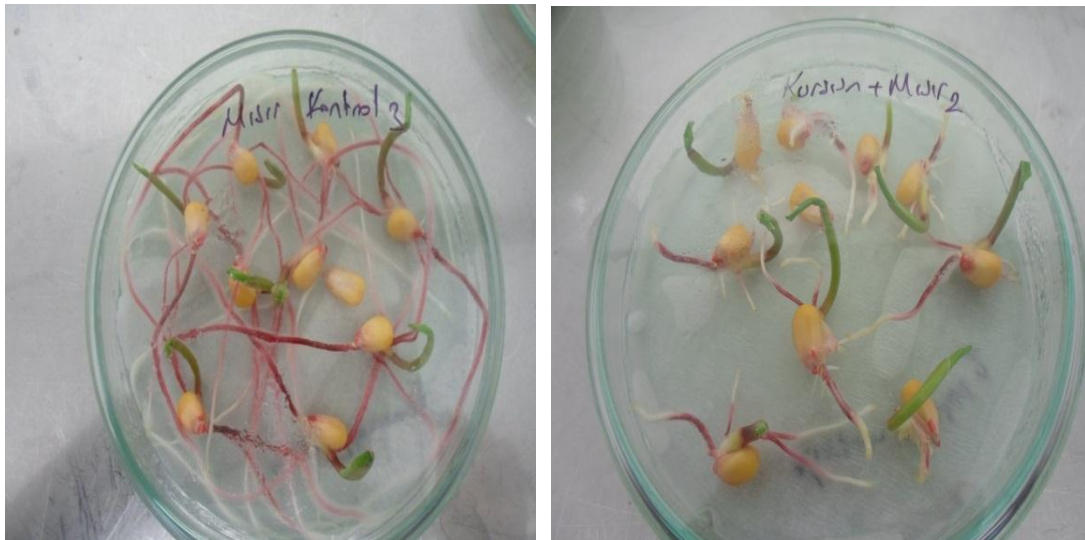
Birçok özellikleri açısından (bitki gelişimini teşvik eden özellikleri, metal toleransı ve metal bağlama kapasitesi vb.) incelenerek yapılan suş seçimine göre MP7B ve MP9D suşları belirlendi ve bu suşların 3 mM Pb varlığında mısır bitkisinin çimlenmesine olan etkinliği araştırıldı. Bu amaçla her bir deneme grubu için 3 tekerrürlü olmak üzere toplamda 30 (10X3) adet mısır tohumu bir hafta çimlendirilerek çimlenme başarısı, koleptil (gövde) ve radikula (kök) gelişimi parametreleri ölçüldü.

Çimlenme başarısı incelendiğinde % 100 çimlenme kontrol grubunda 3. günde, kurşun grubunda 5. günde, MP7B ve MP7B+Pb gruplarında 7. günde gerçekleştiği gözlemlendi. MP9D suşunda 7. günde % 80 çimlenme başarısı elde edilirken MP9D+Pb grubunda % 86,7 oranında bir artış olduğu gözlemlendi (Tablo 14, Şekil 22).

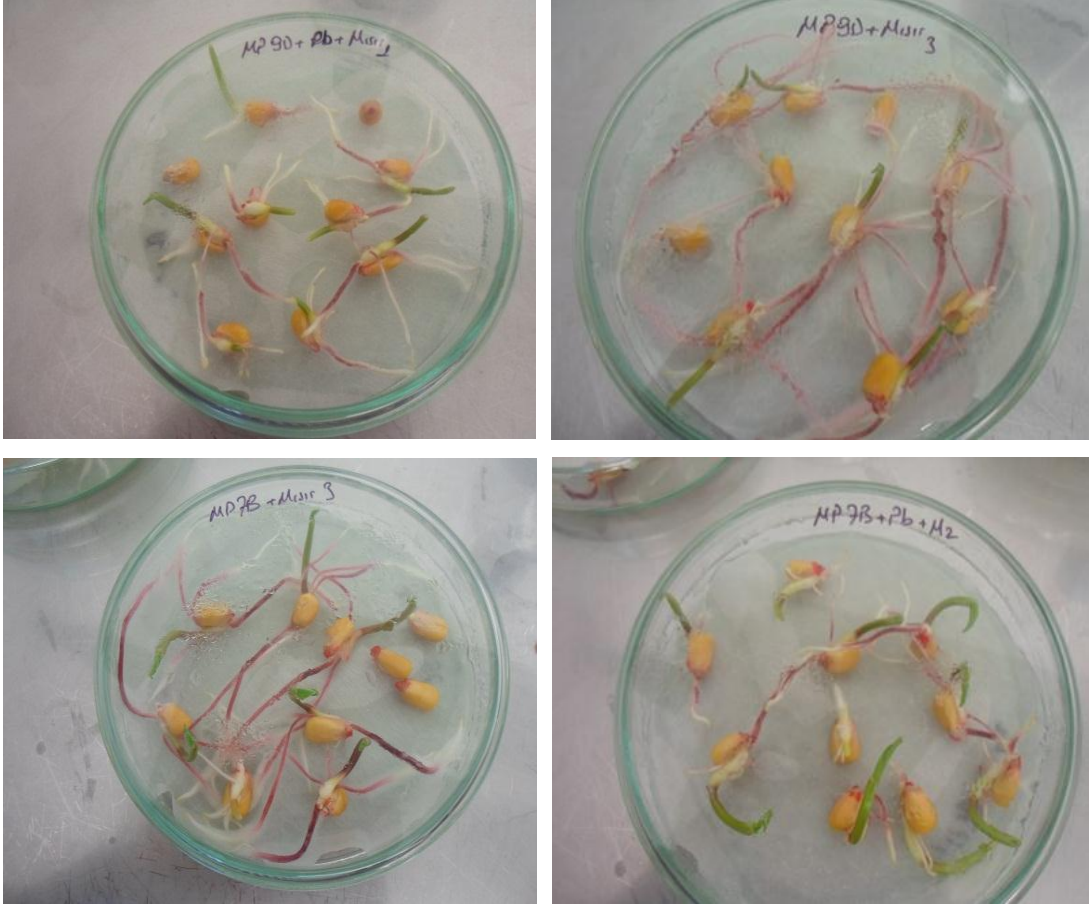
Tablo 14. Mısır bitkisinin çimlenmesi üzerine Kurşun (3 mM) tuzunun etkinliğinin belirlenmesi.

Deneme Düzeni	Günlük çimlenme yüzdesi (%)			Ortalama koleptil Ağırlığı	Ortalama radikula		Toplam ağırlık		Ort. saçak sayısı	
	3.	5.	7.		Boyu	Ağırlığı	Boyu	Yaş		Kuru
Kontrol	100	100	100	0,16	5,07	0,39	14,15	0,55	0,255	3,63
Kurşun	90	100	100	0,125	3,49	0,122	2,3	0,247	0,169	10,3
MP7B	66,7	90	100	0,081	2,633	0,191	8,05	0,272	0,1161	4,07
MP7B+Pb	90	93,3	100	0,131	3,583	0,118	2,67	0,303	0,172	8,23
MP9D	63,3	73,3	80	0,119	3,9	0,184	7,19	0,303	0,319	4,73
MP9D+Pb	60	73,3	86,7	0,104	2,883	0,117	2,957	0,221	0,140	9,27

Kurşun grubundan alınan verilerin ortalamalarının kontrol gruplarına göre paralel bir azalış gösterdiği görülmektedir. Bu farklılıkların rastlantısal mı yoksa gerçek bir olgu mu olduğunu anlayabilmek için ANOVA testi yapıldı. Pb varlığında test edilen 2 farklı bakteri suşunun mısırın çimlenmesi üzerine kontrol bitkisine göre plumula ağırlığı hariç ($p < 0,05$) diğer parametreler açısından incelendiğinde $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bir farklılık oluşturduğu gözlemlendi.

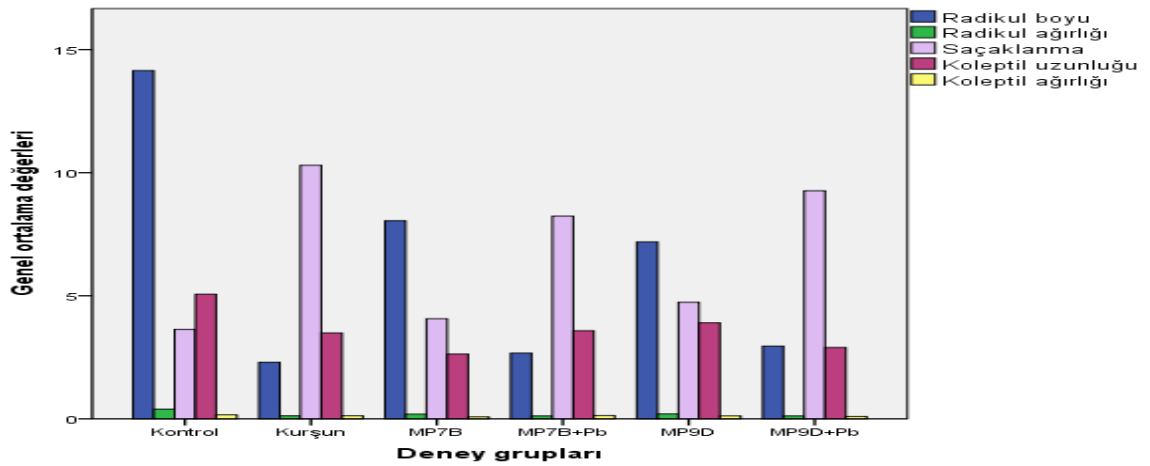


Şekil 22. Mısırın çimlenme deneyinin 5. gününde MP9D ve MP7B izolatlarının hem kurşunlu (3 mM) hem de kurşunsuz ortamlarda çimleme görünümleri.



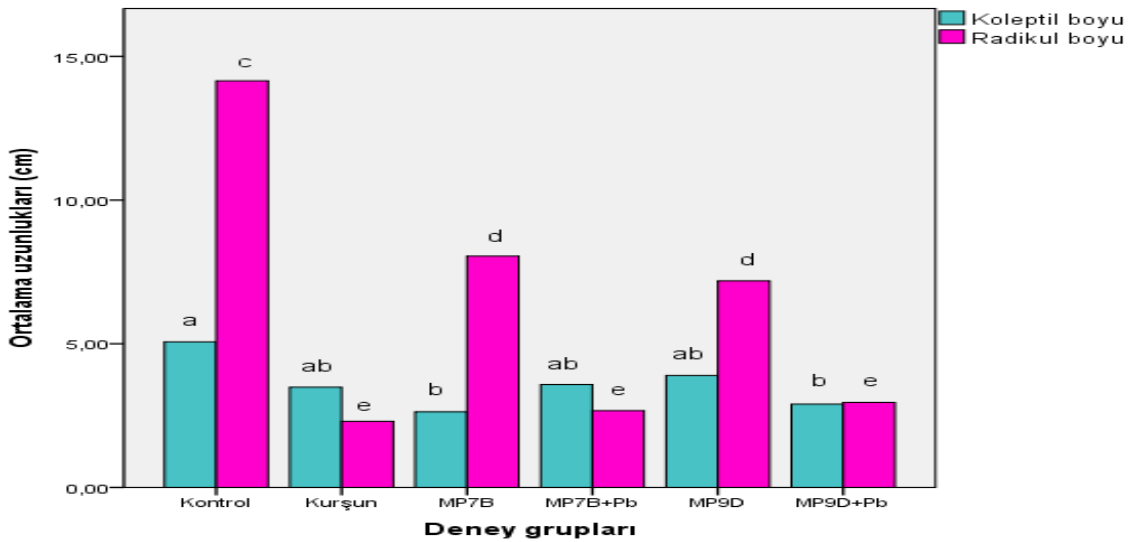
Şekil 22 (devam). Mısırın çimlenme deneyinin 5. gününde MP9D ve MP7B izolatlarının hem kurşunlu (3 mM) hem de kurşunsuz ortamlarda çimleme görünüşleri.

Kurşun varlığında saçaklanma hariç tüm verilerde kontrole göre büyük oranda azalma gözlemlendi. Saçaklanmada ise kurşun varlığında bakterilerin kontrole göre saçaklanma sayısını % 100'e varan oranda arttırdığı gözlemlendi (Tablo 14 ve Şekil 23).



Şekil 23. Çimlenme deneyinin kurşun varlığında ve yokluğunda genel sonuçları.

Parametreler radikula ve koleptil uzunluğu açısından incelendiğinde radikula ve koleptil ağırlıklarına paralel bir sonuç elde edilmiştir. En uzun radikula sırasıyla kontrolden sonra MP7B, MP9D, MP9D+Pb, MP7B+Pb ve kurşun gruplarının parametrelerinde gözlemlendi (Tablo 14, Şekil 22 ve Şekil 23). En uzun koleptil sırasıyla MP9D, MP7B+Pb, kurşun, MP9D+Pb ve MP7B gruplarında gözlemlendi. Kontrole göre MP9D suşunun MP7B suşuna göre koleptil uzunluğunu arttırdığı, radikula uzunluğunu azalttığı gözlemlendi. Dolayısıyla 7B suşunun bitkide strese neden olarak radikula gelişimini arttırdığı ve koleptil gelişimini azalttığı düşünülmektedir. Kurşun varlığında ise tersi bir durum söz konusu olup MP7B suşunun MP9D suşuna göre koleptil uzunluğunu arttırdığı gözlemlendi. Muhtemelen MP7B suşunun metali absorbe ederek bitki stresini azalttığı düşünülmektedir (Şekil 24).

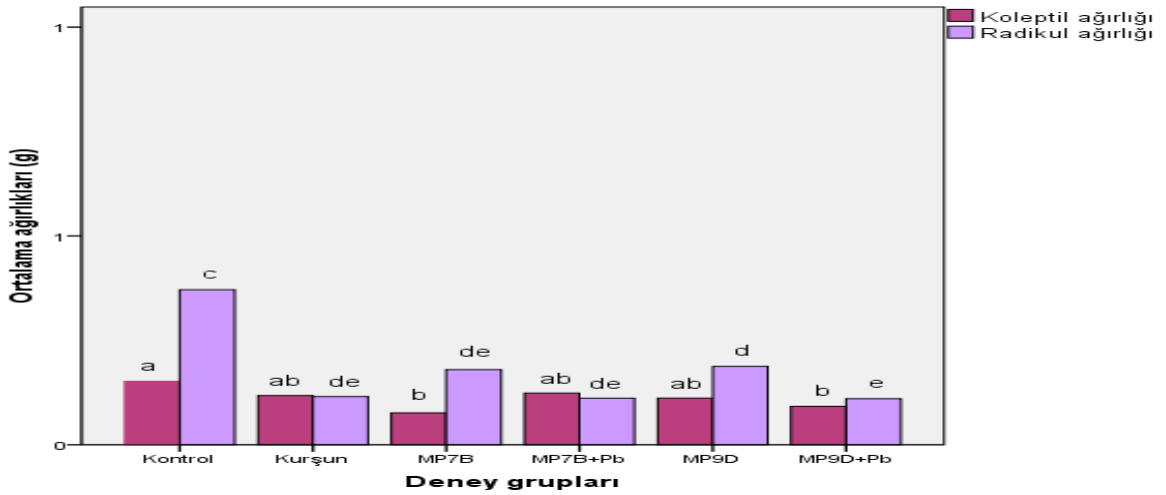


Şekil 24. Kurşun varlığında ve yokluğunda suşların mısır bitkisinin kök ve gövde uzunlukları.

Çimlenme radikula ve koleptil ağırlığı açısından incelendiğinde kontrole göre tüm test edilen deneme gruplarında bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Tablo 14, Şekil 25). Koleptil ağırlığı açısından bakıldığında kontrolden sonra sırasıyla en ağır MP7B+Pb, kurşun, MP9D, MP9D+Pb ve MP7B grupları gelmektedir. Radikula ağırlığına bakıldığında kontrolden sonra en ağır olan gruplar ise MP7B, MP9D, MP7B+Pb, MP9D+Pb ve kurşun şeklinde sıralanmaktadır. Yalnızca bakteri varlığında incelendiğinde MP9D'nin daha etkili olduğu, kurşun varlığında ise MP7B'nin daha

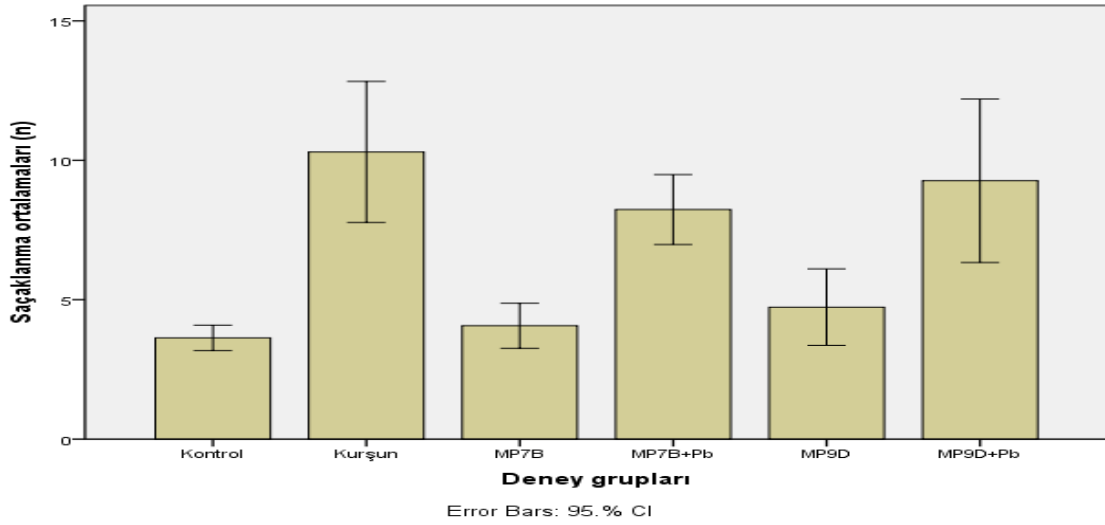
etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 25). Sonuç olarak radikula-koleptil uzunluk ve ağırlıkları arasında doğru orantı olduğu belirlendi.

Radikula ve koleptil toplam yaş ağırlığına bakıldığında da kontrolden sonra en iyi gelişme sırasıyla MP7B+Pb, MP9D, MP7B, kurşun ve MP9D+Pb gruplarında gözlenmektedir (Tablo 14). Mısır bitkisinin toplam yaş ve kuru ağırlığından yüzde (%) su içeriği hesaplandığında bakteri varlığında kontrole göre su içeriği arttığı, kurşun varlığında ise % 21,8 azaldığı belirlendi. Bakteri kurşun birlikteliğinde ise kurşun kontrole göre su içeriği arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar göstermektedir ki bakteri varlığında bitkinin su tutma kapasitesi artmakta, kurşun varlığında ise azalmaktadır.



Şekil 25. Pb varlığında ve yokluğunda suşları mısır bitkisinin kök ve gövde ağırlıkları.

Saçaklanma verileri incelendiğinde, kontrole göre tüm parametrelerin saçaklanmayı önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi (Şekil 26, Tablo 14). Kurşun varlığında kontrole göre MP7B % 4,4, MP9D ise % 11 saçaklanmayı arttırdığı belirlendi. MP7B+Pb birlikteliğinde kontrole göre % 46, kurşuna göre % 20,7 arttırdığı, MP9D+Pb birlikteliği ise kontrole göre % 56,4 arttırırken kurşuna göre % 10,3 arttırdığı belirlendi. Sonuç olarak MP9D'nin MP7B'ye göre kurşun varlığında ve yokluğunda saçaklanmayı daha da arttırdığı gözlemlendi. Bakteri kurşun birlikteliğinde ise kurşun kontrole göre MP7B'nin MP9D'ye oranla daha fazla saçaklanmayı azalttığı izlendi. Bu sonuçlar göstermektedir ki saçaklanma strese bağlı olarak kurşun varlığında artmaktadır.



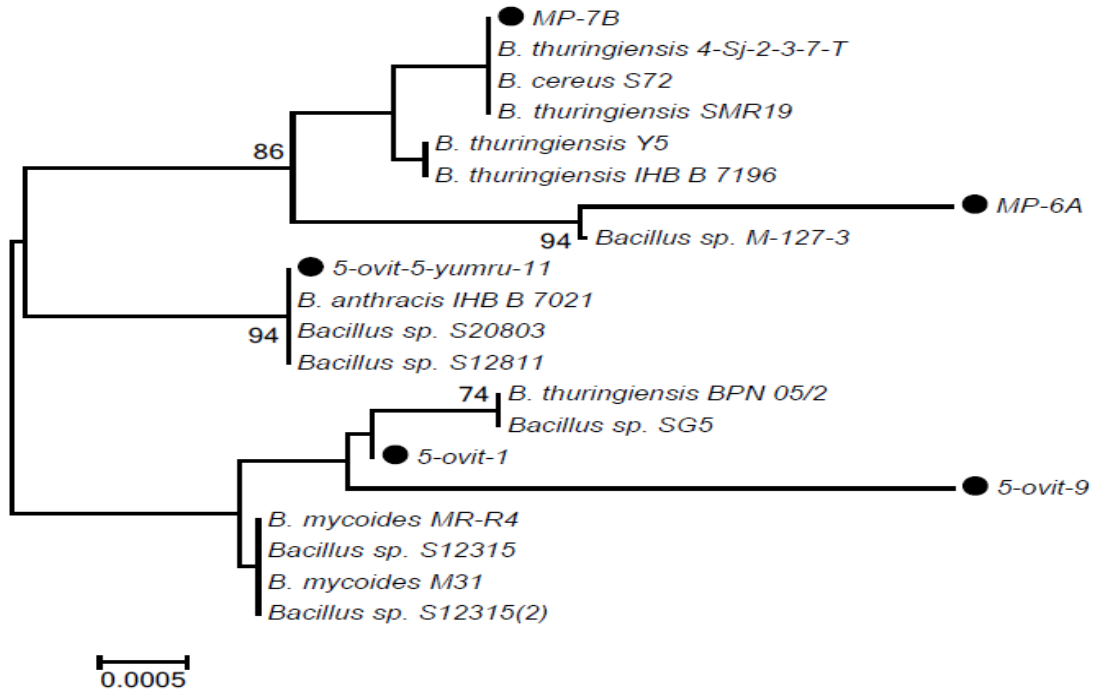
Şekil 26. Çimlenme deneyinin kurşun varlığında ve yokluğunda saçaklanma sonuçları.

Tüm verilere genel olarak bakıldığında bakterilerin, çimlenmeyi kontrole göre olumsuz etkiledikleri fakat kurşun varlığında metal stresini azaltarak bitki gelişimini olumlu yönde etkiledikleri gözlemlendi. Bu çalışma sonucunda saksı deneyinde kullanmak üzere çimlenme bulgusu en iyi olan MP7B suşu seçildi.

Çalışmada seçilen bu üç bakterinin tür tanımlarını kesinleştirmek amacıyla moleküler metotlar (16S rRNA sekans analizi) kullanıldı. Ancak MP9D suşu tanımlanamadı. Yapılan filogenetik ağaca göre MP6A'nın *Bacillus* sp. M-127-3 ile, MP7B suşunun ise *B. thuringiensis* 4-Sj-2-3-7-T suşu ile benzer oldukları belirlendi (Tablo 15, Şekil 27).

Tablo 15. Bakteriyal izolatların 16S rRNA gen benzerlikleri.

İzolat No	Genbank Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
MP 6A	KF641792.1	<i>B. thuringiensis</i> Y5	100	99
	KF746881.1	<i>Bacillus</i> sp. M-127-3	99	99
	KJ767341.1	<i>B. thuringiensis</i> IHB B 7196	99	99
MP 7B	KJ009512.1	<i>B. thuringiensis</i> 4-Sj-2-3-7-T	100	99
	FJ763650.1	<i>B. cereus</i> S72	100	99
	KF600767.1	<i>B. thuringiensis</i> SMR19	99	99



Şekil 27. MP6A ve MP7B izolatlarının filogenetik ağacı.

3.7. Kurşun Varlığında Mısır Bitkisi Gelişimi ve ICP-OES Analizi

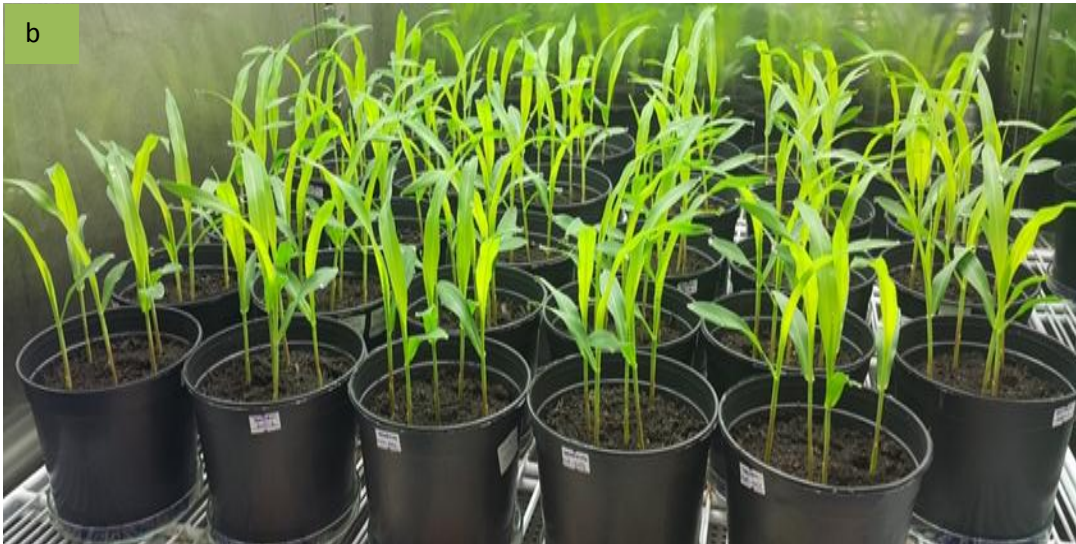
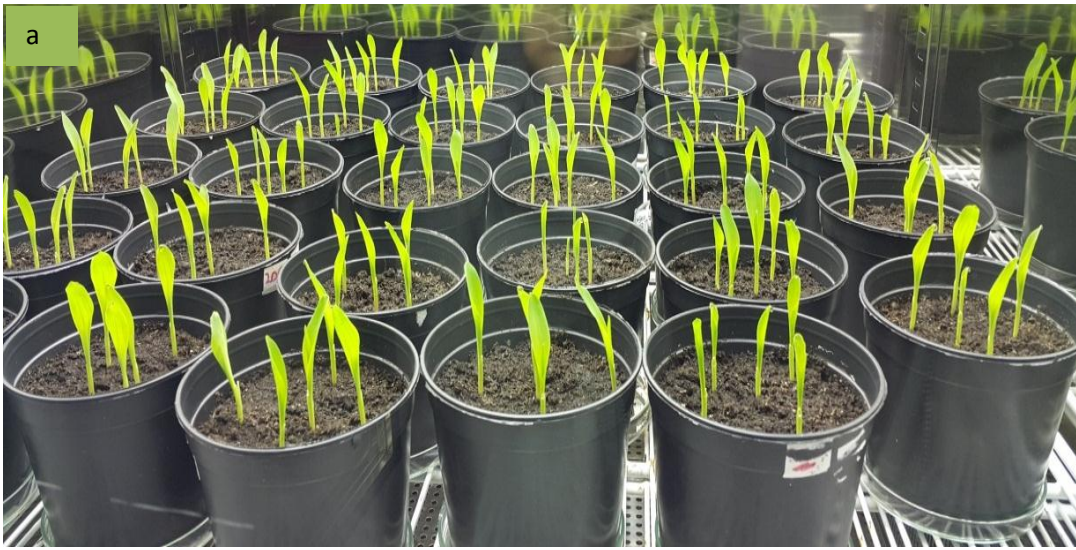
3.7.1. Kurşun Varlığında Mısır Saksı Deneyi Sonuçları

Çalışmada bir dizi parametreleri (bitki gelişimini teşvik etme, geniş pH aralığında ve metal ortamında rahat üreyebilme, çimlenme başarısına etkili olabilme bakımından incelendiğinde MP7B suşunun mısır bitkisi saksı deneyinde kullanılmasına 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 30 tohum test edildi (Tablo 16).

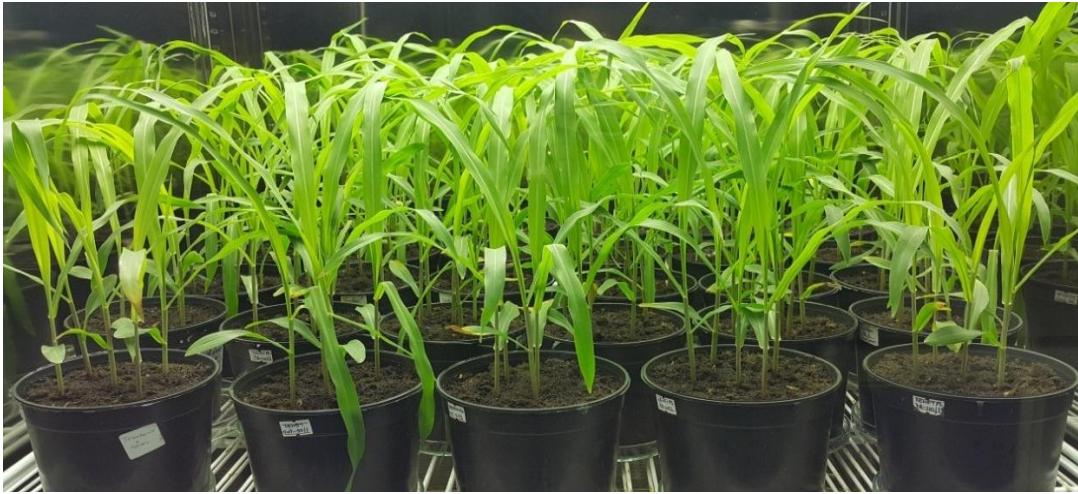
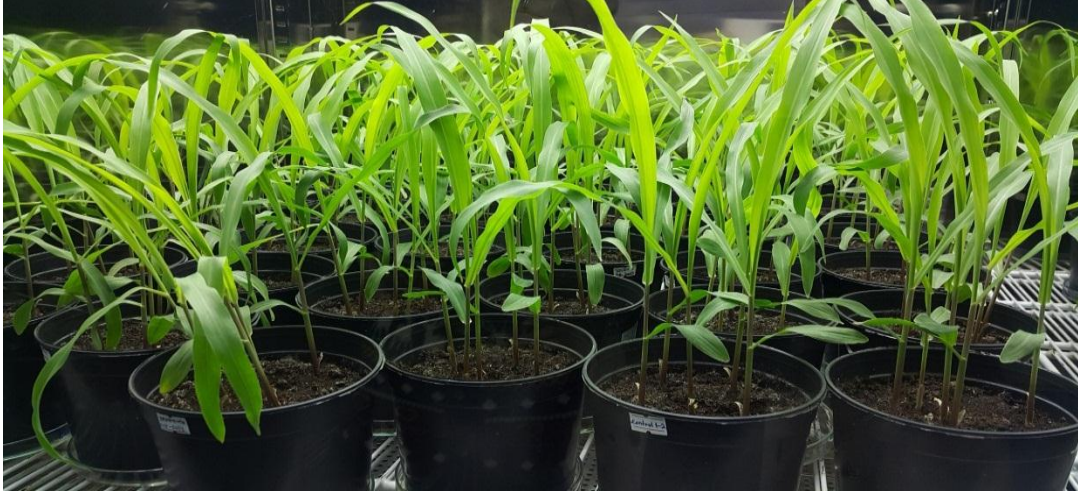
Tablo 16. Mısır saksı deney düzeneği.

Denekler	Açıklaması	Denekler	Açıklaması
Konrtol	Mısır	Pb100+MP7B	Mısır-Pb100 mg/kg+Bakteri
MP7B	Mısır+Bakteri	Pb200	Mısır-Pb200 mg/kg
Pb100	Mısır+Pb 100 mg/kg	Pb200+MP7B	Mısır-Pb200 mg/kg+Bakteri

Saksı deneyinde çimlenmenin 10. gününde (2 yapraklı hale geldiğinde) 600 nm'de $OD_{0,530}$ olacak şekilde hazırlanmış bakteri (*Bacillus thuringiensis* MP7B) süspansiyonundan 15 mL alınıp 50 mL'ye steril distile suyla tamamlandı (Şekil 28). 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 100 ve 200 mg kurşun solüsyonu uygulandı ve 7 gün daha saksılar inkübe edildikten sonra deney sonlandırıldı. Bu esnada mısır bitkisinin görsel değişimleri izlendi ve görüntüledi (Şekil 29)



Şekil 28. Saksı deneyi. a) 1. hafta görünümü, b) Saksı deneyi 2. hafta deney düzeneği görüntüleri.



Şekil 29. Saksı deneyinin. 3. ve 4. hafta gelişim görünüşleri.

Çalışmada toprak nemi ve mısır köklerinin su içeriği hesaplandı. Tüm deneme gruplarının ortalama yaş ve kuru ağırlıkları Tablo 17’de verildi. Kontrol grubunda nispi su içeriği azalırken bakteri ve Pb200 mM ortamında su içeriğinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Buna paralel olarak kontrol kök su içeriği düşük olduğu ancak stres faktörü olan kurşun varlığında ve bakteri varlığında kök su içeriğinin arttığı belirlendi.

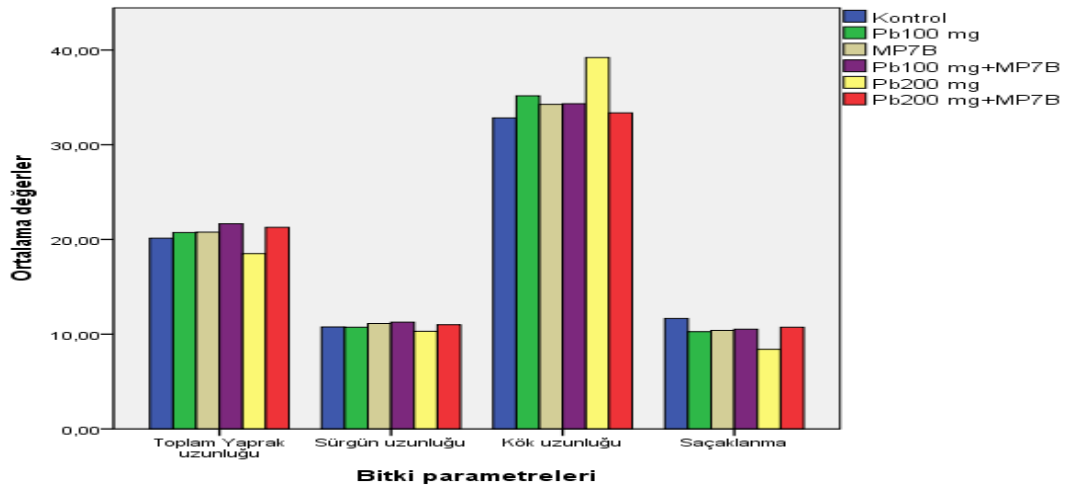
Mısır bitkisinin kök yaş ağırlığına bakıldığında kontrol grubunda yaş ağırlık en düşük iken (1,72 g) diğer test parametrelerinde su içeriği 2 ya da 3 katına çıkmaktadır. En yüksek yaş ağırlık MP7B+Pb200’de (7,117 g) gözlenirken bunu sıra ile MP7B+Pb100, MP7B, Pb100 ve Pb 200 şeklinde takip etti. Bu durum kurşun stresi arttıkça bakteri birlikteliğinde su tutma kapasitesinin de arttığını doğrulamaktadır. Köklerin su kapasitesi kontrol grubunda % 80 iken, diğer gruplarda % 93-94 aralığında belirlendi (Tablo 17). Bu sonuçlarda göstermektedir ki bitki stres koşullarında su tutma

kapasitesini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Bu durum kurşun stresi arttıkça bakteri birlikteliğinde su tutma kapasitesinin de arttığını doğrulamaktadır.

Tablo 17. Torak nemi ve mısır kökü yaş ve kuru ağırlıkları.

Deneme düzeni	Kök ağırlığı (g)		Bitki Nem Oranı (%)	Toprak ağırlığı		Toprak Nem Oranı (%)
	Yaş	Kuru		Yaş	Kuru	
Kontrol	1,72	0,342	80,12	10	4,143	58,57
Pb100	5,433	0,363	93,32	10	4,107	58,93
MP7B	5,847	0,370	93,67	10	3,877	61,23
MP7B+Pb100	6,357	0,400	93,71	10	4,047	59,53
Pb200	4,16	0,234	94,38	10	3,74	62,6
MP7B+Pb200	7,117	0,425	94,03	10	4,177	58,23

Kontrol grubuyla bakteri kontrol kıyaslandığında bakteri varlığında saçaklanma sayısı dışında tüm parametrelerde (sürgün, kök ve yaprak uzunluğu) artış olduğu tespit edildi. Total yaprak uzunlukları kontrole göre kıyaslandığında yalnızca 200 mg Pb varlığında azalma gözlenirken diğer parametrelerde artış bulunmaktadır



Şekil 30. Mısır bitkisinin saksı deneyi tüm verilerinin genel görünümü.

Grupların veri parametrelerini kendi içinde karşılaştırdığımızda kontrole göre 100 mg kurşun varlığında gelişimin çok etkilenmediği ancak 200 mg kurşun varlığında bitki gelişim parametrelerinin (kök uzunluğu hariç) düştüğü, bakteri varlığında ise bu verilerin olumlu yönde artış gösterdiği belirlendi (Şekil 30, Tablo 18, 19). Kontrole göre kurşun konsantrasyonu artışına paralel olarak kök uzunluğunda artışın olduğu,

saçaklanma sayısında ise azalmanın olduğu gözlemlendi. Bakteri birlikteliğinde ise 100 ve 200 mg'da kök uzunluğunu kurşun gruplarına göre azalttığı, saçaklanmayı ise arttırdığı belirlendi. Dolayısıyla bakteri varlığı ortamdaki kurşun stresini azalttığı kanısına varıldı.

Tablo 18. Saksı deneyi istatistiksel verileri.

		N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min.	Max.
Kontrol	Sürgün uzunluğu	15	10,7667	1,17817	0,30420	7,50	12,00
	Kök uzunluğu	15	32,8333	7,33306	1,8934	15,50	44,00
	Saçaklanma	15	11,6667	1,67616	0,43278	10,00	15,00
	Total	105	19,4000	11,0917	1,0824	4,00	44,00
Pb100 mM	Top. yaprak uzunluğu	60	20,7333	11,3707	1,4679	5,50	40,00
	Sürgün uzunluğu	15	10,7333	0,75277	0,19437	9,50	12,00
	Kök uzunluğu	15	35,1667	7,92750	2,0469	21,50	54,00
	Saçaklanma	15	10,2667	1,48645	0,38380	8,00	13,00
MP7B	Total	105	19,8714	11,9039	1,1617	5,50	54,00
	Top. yaprak uzunluğu	60	20,7750	11,0513	1,4267	6,00	38,50
	Sürgün uzunluğu	15	11,1333	0,51640	0,13333	10,00	12,00
	Kök uzunluğu	15	34,2667	5,4309	1,4023	22,50	40,00
Pb100 mM+ MP7B	Saçaklanma	15	10,4000	0,98561	0,25448	9,00	12,00
	Total	105	19,8429	11,3019	1,1029	6,00	40,00
	Top. yaprak uzunluğu	60	21,6583	11,1331	1,4373	5,00	38,50
	Sürgün uzunluğu	15	11,2667	0,65101	0,16809	10,00	12,00
Pb200mM	Kök uzunluğu	15	34,3333	4,6202	1,1929	27,00	42,00
	Saçaklanma	15	10,5333	0,91548	0,23637	9,00	12,00
	Total	105	20,3952	11,3289	1,1056	5,00	42,00
	Top. yaprak uzunluğu	60	18,5000	11,0837	1,4309	5,50	35,50
Pb200mM+ MP7B	Sürgün uzunluğu	15	10,3000	0,95991	0,24785	8,50	11,00
	Kök uzunluğu	15	39,2000	8,69483	2,24499	23,00	45,00
	Saçaklanma	15	8,4000	0,50709	0,13093	8,00	9,00
	Total	105	18,8429	12,88882	1,25782	5,50	45,00
Pb200mM+ MP7B	Top. yaprak uzunluğu	60	21,2750	11,7982	1,5232	0,00	38,00
	Sürgün uzunluğu	15	11,0000	1,45160	0,37480	9,00	13,00
	Kök uzunluğu	15	33,3667	4,31967	1,1153	26,00	39,00
	Saçaklanma	15	10,7333	1,75119	0,45216	8,00	13,00
Total	105	20,0286	11,5304	1,1253	0,00	39,00	

Tablo 19. Saksı deneyi korelasyon tablosu.

		Kontrol	Pb100	Bakteri	Pb100	Pb200	Pb200
		Kontrol	Kontrol	Kontrol	Bakteri	Kontrol	Bakteri
Kontrol	Pearson	1	0,893**	0,898**	0,913**	0,853**	0,826**
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	105	105	105	105	105	105
Pb100mM_Kontrol	Pearson		1	0,909**	0,920**	0,841**	0,868**
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)			0,000	0,000	0,000	0,000
	N		105	105	105	105	105
Bakteri_Kontrol	Pearson			1	,934**	0,893**	0,842**
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)				0,000	0,000	0,000
	N			105	105	105	105
Pb100mM_Bakteri	Pearson				1	0,900**	0,873**
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)					0,000	0,000
	N				105	105	105
Pb200mM_Kontrol	Pearson					1	0,808**
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)						0,000
	N					105	105
Pb200mM_Bakteri	Pearson						1
	Correlation						
	Sig. (2-tailed)						
	N						

** önemlilik derecesi $p < 0,01$

Kontrol grubunda ortalama sürgün uzunluğu 10,77 cm, ana kök uzunluğu 32,88 cm bulunurken saçaklanma sayısı 11,67 olarak belirlenmiştir. Ortalama dört yaprak haliyle sonlandırılan saksı deneyinde, 3. yaprak en uzun olup ortalama 33,50 cm şeklinde ölçümleri alındı (Tablo 18, Şekil 31).



Şekil 31. Kontrol grubu 4. Hafta saksı deneyi görünümü.

Bakteri (MP7B) grubunda, ortalama 4 yaprak oluşmuş, kontrole göre yaprak boyu daha uzun oldukları ve en uzun yaprak olan 3. yaprağın ortalama boyu 33,5 olarak tespit edildi. Fide uzunluğu 11,13 cm, ana kök uzunluğu 34,27 cm bulunurken saçaklanma sayısı 10,40 olarak belirlendi. Bakteri varlığında saçaklanma sayısı dışında tüm parametrelerde artış gözlenmiştir (Tablo 18, Şekil 32).



Şekil 32. Bakteri (MP7B) grubu 4. hafta görünümüleri.

Kurşun 100 mg uygulamasında kontrole kıyaslandığında sürgün uzunluğu ve kök saçaklanmasında azalma varken, ana kök ve toplam yaprak uzunluğunda az da olsa artışın olduğu gözlemlendi (Tablo 18, Şekil 33).



Şekil 33. 100 mg Kurşun uygulanmış kontrol grubunun 4. hafta görünümüleri.

Bakterinin 100 mg kurşun ile uygulanmasında (MP7B+Pb100) kontrole göre kıyaslandığında, saçaklanma ve toplam yaprak uzunluğunda azalma gözlenirken, diğer parametrelerde ise artış olduğu gözlemlendi. Sonuçlar Pb100 ve MP7B ile kıyaslandığında sürgün ve yaprak uzunluğu azaldığı, kök uzunluğu ve saçaklanma sayısının da her iki gruba göre arttığı gözlemlendi (Tablo 18, Şekil 34).

Kök uzunluğunun kurşunlu kontrolde 35,17 cm iken MP7B+Pb100 birlikteliğinde 34,33 cm'e düştüğü, saçaklanma sayısının da kontrole göre azaldığı gözlemlendi (Tablo 18, Şekil 34).



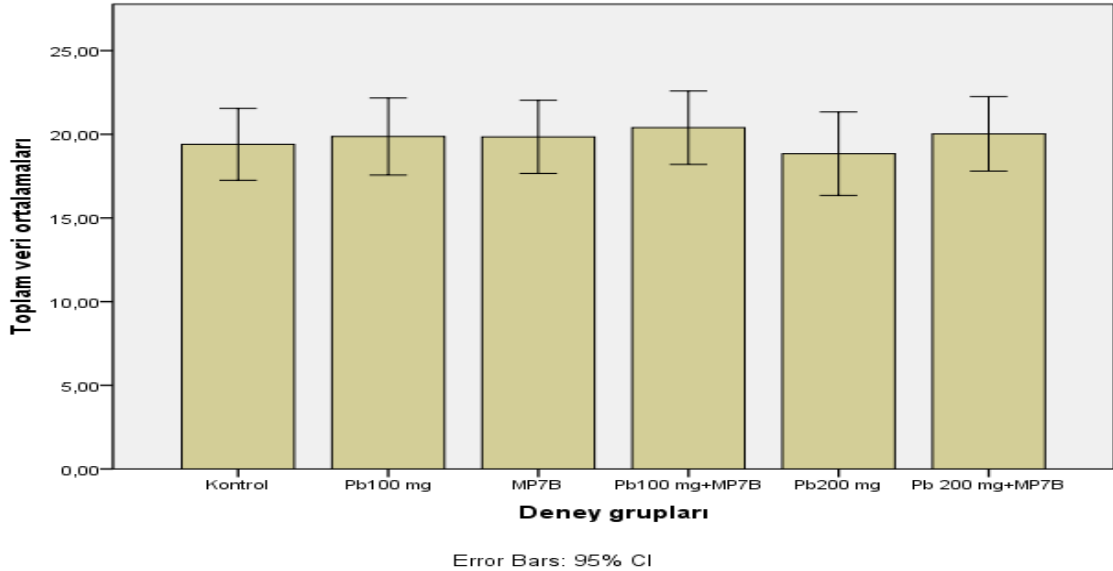
Şekil 34. 100 mg Pb+MP7B birlikte uygulanmış grubunun 4. hafta görünüşleri.

200 mg kurşun uygulanmış gruba bakıldığında tüm parametreler açısından istatistiksel olarak bir azalmanın olduğu fakat gözle görülür bariz bir etkilenmenin söz konusu olmadığı görülmektedir (Tablo 18, Şekil 34). Bakteriyle beraber 200 mg kurşun metali uygulandığında ise hem kurşunsuz kontrole hem de kurşunlu kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil, 35).



Şekil 35. 200 mg Pb+MP7B uygulanmış grubu (ilk 3 saksı) ile 200 mg Pb uygulanmış grubunun (son saksı) 4. hafta görünüşleri.

Toplam gruplar arasında kurşun varlığında ve yokluğunda mısır bitkisi gelişimi üzerine olan etkinliğe bakıldığı zaman kontrol (19,4000) grubuna göre kurşun 100 (19,8714) ve bakteri grubunda (19,8429) az da olsa bir artışın olduğu ancak kurşun 200 grubunda (18,8429) ise bariz bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Tablo 18, Şekil 36). Bakteri kurşun birlikteliğinde ise her iki (100 ve 200 mg) konsantrasyonlarda kontrole göre total veride artışın olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$).



Şekil 36. Mısır bitkisinin kurşun varlığında ve yokluğunda gelişiminin toplam veri analizine göre oluşturulan grafik.

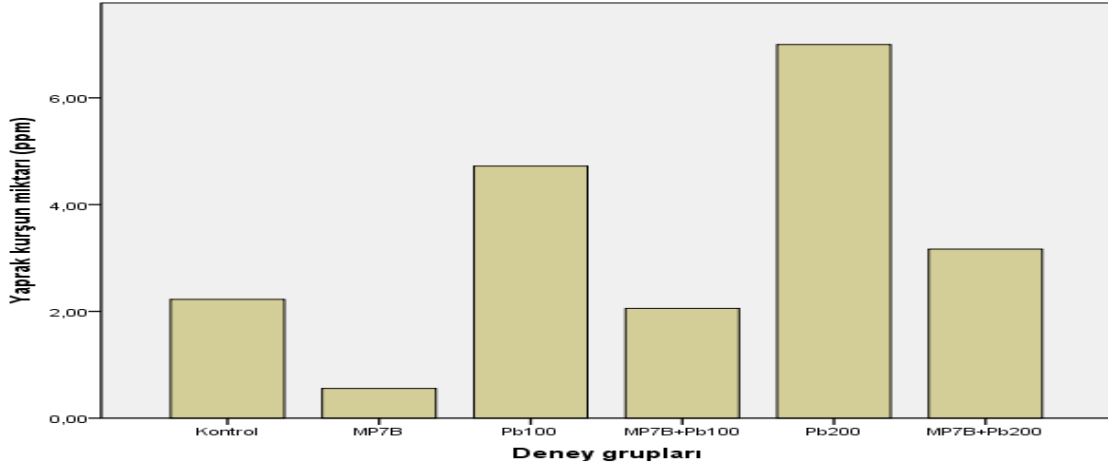
3.8. Saksı Deneyinde Kurşunun ICP-OES Analizi Sonuçları

Çalışmada saksı düzeneğinin hasatı sonucunda toprakta kalan kurşunun ve mısır bitkisinin kök ve yapraklarında biriken kurşunun tespiti için numuneler mikrodalgada yaş yakma yöntemiyle yakıldı. Daha sonra ICP-OES cihazında ölçümleri alındı (Tablo 20) ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmesine bakıldığında ölçülen tüm parametrelerin Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılım gösterdiği belirlendi ($p>0,05$).

Tablo 20. ICP-OES yaprak verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.

	N	Ortalama	Std. sapma	Std. hata	% 95 Ort. güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
Kontrol	3	2,2253	0,29255	0,16890	1,4986	2,9521	1,97	2,54
MP7B	3	0,5555	0,96221	0,55553	-1,8347	2,9458	0,00	1,67
Pb100	3	4,7220	5,01459	2,89518	-7,7349	17,1790	1,50	10,50
MP7B+Pb100	3	2,0555	0,63096	0,36429	0,4881	3,6229	1,33	2,50
Pb200	3	6,9997	0,33332	0,19244	6,1717	7,8277	6,67	7,33
MP7B+Pb200	3	3,1665	0,49998	0,28866	1,9245	4,4086	2,67	3,67
Total	18	3,2874	2,78359	0,65610	1,9032	4,6717	0,00	10,50

Yapılan çalışmada kontrol grupta, yapraklarda 2,2253 ppm kurşun belirlenirken bakteri olarak kullanılan MP7B suşunun varlığında yaprakta kontrol grubuna göre yapraktaki kurşun miktarını azalmış olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde ortama 100 mg kurşun ilavesinde bitki yaprağında kurşun miktarının kontrole göre arttığı, bakteri birlikteliğinde ise % 50 oranında alımın azaldığı gözlemlendi. Aynı şekilde 200 mg Pb varlığında yapraktaki kurşun miktarı 6,9997 ppm ölçülürken, bakteri birlikteliğinde yine % 50'den fazla yaprakta kurşun alımını azalttığı gözlemlendi (Tablo 20, Şekil 37). Sonuç olarak bakteri varlığında mısırın yapraklarında biriken kurşun miktarı % 50'den fazla azaldığı gözlenmektedir.



Şekil 37. Deneme grupları arasında yaprakta absorblanan kurşun miktarları.

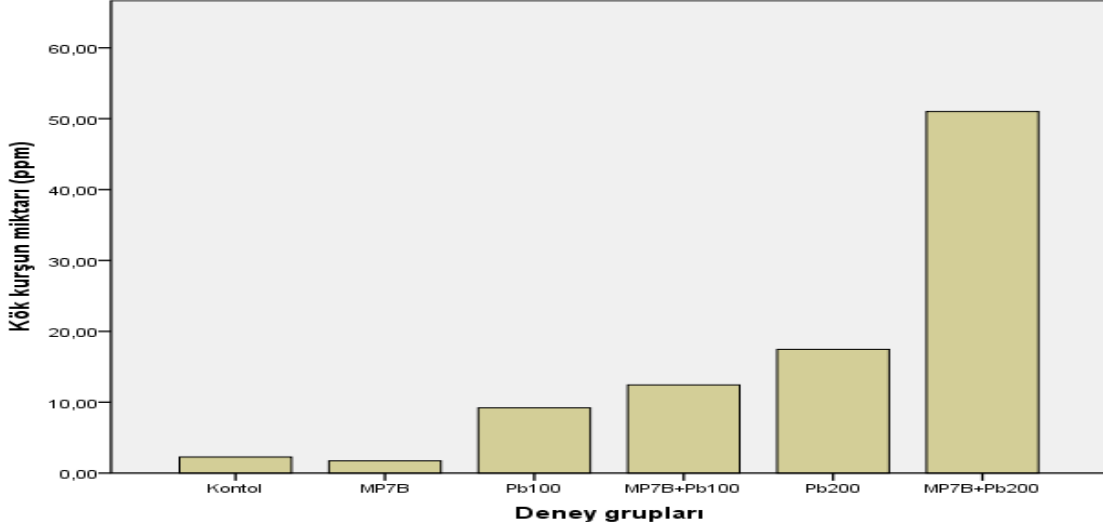
Kökte yapılan çalışmada, kontrole göre bakteri varlığında ortamda mevcut Pb'yi bakteri tarafından absorbe edildiği düşünülmektedir. Ancak 100 ve 200 mg Pb uygulandığında, Pb miktarı sırasıyla 9,2219 ppm ve 17,4437 ppm ölçülürken, bakteri varlığında bu oranın çok daha yüksek seviyelere ulaştığı gözlemlendi. Bu oran Pb100 mg+MP7B birlikteliğinde kurşun kontrole göre % 25,9 oranında, MP7B+Pb200'un Pb200 kontrolüne göre % 65,8 oranlarında kökte kurşun birikiminin arttığı belirlendi (Tablo 21, şekil 38).

Tablo 21. ICP-OES kök verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.

	N	Ortalama	Std. sapma	Std. hata	% 95 Ort. güven aralığı	Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır	
Kontrol	3	2,264	,898	,518	,034	4,493	1,33 3,12
MP7B	3	1,726	,485	,280	,522	2,930	1,17 2,01
Pb100	3	9,222	2,840	1,640	2,167	16,276	6,50 12,17
MP7B+Pb100	3	12,444	,510	,294	11,179	13,709	12,00 13,00
Pb200	3	17,444	,675	,389	15,771	19,117	16,67 17,83
MP7B+Pb200	3	50,998	41,427	23,918	-51,912	153,908	21,33 98,33
Total	18	15,683	22,339	5,265	4,574	26,792	1,17 98,33

Bu sonucun yeni kontrol grubunda bakteri varlığındaki toprakta Pb oranı azalırken, 100 ve 200 mg Pb ilave edildiğinden kökte tutulan Pb'nin bakterili ortamda 2 ve 3 katı daha fazla olduğu gözlemlendi. Yaprakta tam tersi durumun söz konusu olması köke ataç olmuş bakteri tarafından Pb'nin tutulduğunu, bu bakterinin yıkanamadığı ve dolayısıyla Pb'nin bu denli yüksek çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Şekil 36).

Çalışmada toprakta kurşun varlığı incelendiğinde veri grupları arasında varyans analizi testine göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlenmiştir.



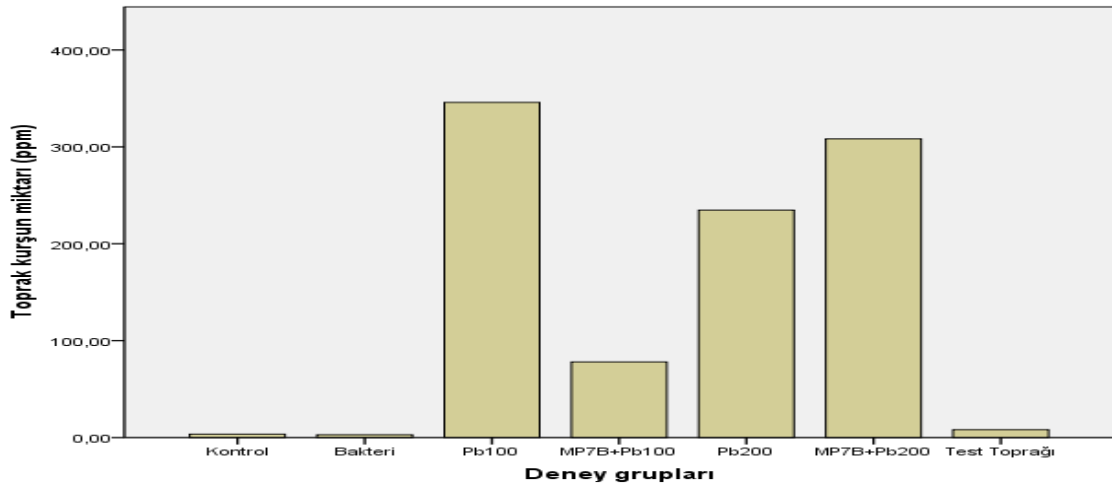
Şekil 38. Deneme grupları arasında kökte absorblanan kurşun miktarları.

İşlem yapılmamış test toprağında kurşun miktarının (8,110 ppm) mısır ekilmiş kontrol grubundakine (3,507 ppm) göre yüksek seviyelerde olduğu gözlemlendi. Buna göre her ne kadar Pb, mısır için gerekli eser element olmasa da bünyesine aldığı, topraktaki miktarı azalttığı gözlenmiştir, bu sonuç da mısır bitkisinin biyoakümülatör bir bitki olduğunu doğruluyor.

Bakteri varlığında da topraktaki miktarın azaldığı, dolayısıyla bakterinin de biyoakümülatör olduğu, kurşunu bitki köklerinde depo ettiği gözlenmektedir. Ortama 100 mg kurşun eklendiğinde bakterinin Pb miktarını kontrole göre düşürdüğü gözlemlendi. Ancak 200 mg'da buna paralel gözlenmediği bunun nedeni ise toprakta homojen dağılmadığı veya homojen örneklenme yapılamadığı düşünülmektedir (Tablo 22, Şekil 39).

Tablo 22. ICP-OES toprak verileri ortalama değerleri ve standart sapmaları.

	N	Ort.	Std.	Std.	%95 Ort. güven aralığı		Min.	Max.
			sapma	Hata	Alt sınır	üst sınır		
Kontrol	3	3,50	,489	,282	2,294	4,721	3,02	4,00
MP7B	3	2,94	1,018	,588	,415	5,474	1,83	3,83
Pb100	3	345,93	295,293	170,487	-387,618	1079,479	116,66	679,14
MP7B+Pb 100	3	78,05	28,814	16,635	6,476	149,629	58,66	111,16
Pb200	3	234,78	1,751	1,011	230,419	239,117	232,99	236,49
MP7B+Pb 200	3	308,26	54,020	31,188	174,073	442,458	255,16	363,15
Test Toprağı	3	8,11	,674	,389	6,438	9,784	7,33	8,50
Total	21	140,23	172,764	37,700	61,585	218,867	1,83	679,14



Şekil 39. Deneme grupları arasında toprakta kalan kurşun miktarları.

Toprakta normal olarak bulunan (8,1108 ppm) kurşunu mısır bitkisi geliştirildiğinde % 56,77'sini absorblayarak 3,5074 ppm'e azalttığı belirlendi. Bakteri varlığında ise topraktaki Pb azalma oranı % 63,7 şeklinde daha fazla olduğu gözlemlendi (Tablo 22).

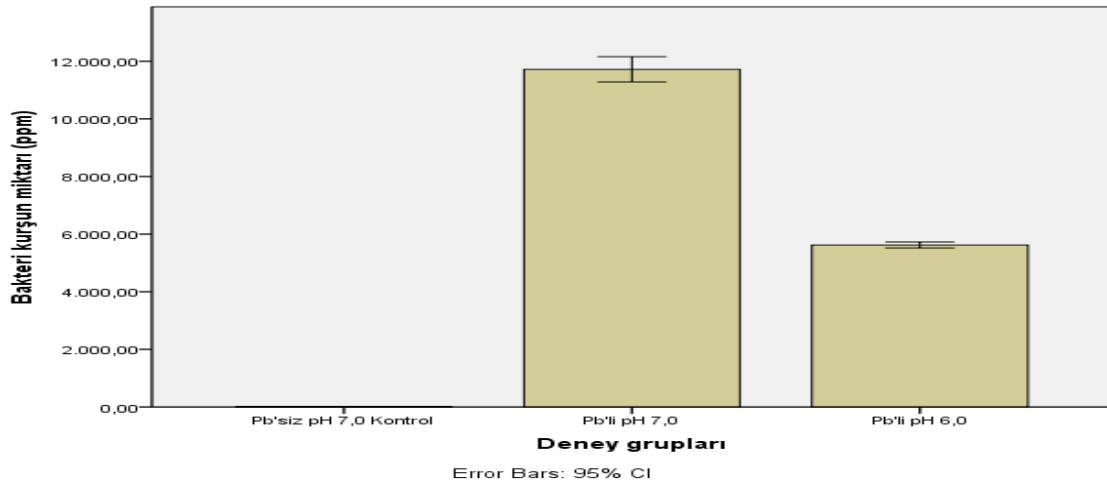
Pb100 kontrol uygulamasında topraktaki kurşun miktarı 345,93 ppm olarak ölçülmüş, bakteri birlikteliğinde ise (78,0524 ppm) bu miktar %54,87 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca kurşun oranı arttığında (Pb 200mg) topraktaki kurşun miktarı 234,7684 ppm, bakteri Pb birlikteliğinde ise 308,2654 ppm olarak ölçüldü. Bu uyumsuz sonucun toprak örneklemesini homojen olmayışından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kullandığımız bakterinin ortamdaki kurşun ağır metalini ne kadar absorblayabildiğini belirlemek amacıyla yeni bir deney dizayn edildi. Bu amaçla MP7B suşu, 3 mM Pb içeren ve pH 7.0'ye ayarlanmış MHB besiyerinde 36 °C'de 120 rpm'de 72 saat büyük hacimlerde kültür yapıldı. Kültürler inkübasyondan sonra 10 g'de santrifüj ile çöktürüldü. Sedim ve süpernatant kısım ayrılarak ICP-OES analizi yapıldı.

Bakteri pelletinde yapılan incelemede çoklu karşılaştırma testine göre Pb'siz pH 7.0 kontrol grubuyla Pb'li pH 7.0 ve pH 6.0 arasında anlamlı bir farklılık ($p<0,01$) gözlemlendi. Bakterinin kurşunu bağladığı, pH 7.0'da ise pH 6.0'a göre absorbansın daha yüksek olduğu (yaklaşık 2 katı kadar) gözlemlendi (Tablo 23, Şekil 40).

Tablo 23. Bakterinin absorpladığı kurşun miktarına ait verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları.

	N	Ort.	Std. sapma	Std. hata	% 95 Ort. güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
Pb'siz pH 7.0	3	7,389	0,822	0,475	5,346	9,431	6,83	8,33
Pb'li pH 7.0	3	11718,420	176,804	102,077	11279,216	12157,625	11514,54	11829,53
Pb'li pH 6.0	3	5623,664	41,842	24,158	5519,722	5727,606	5588,11	5669,77
Total	9	5783,158	5073,249	1691,083	1883,513	9682,802	6,83	11829,53



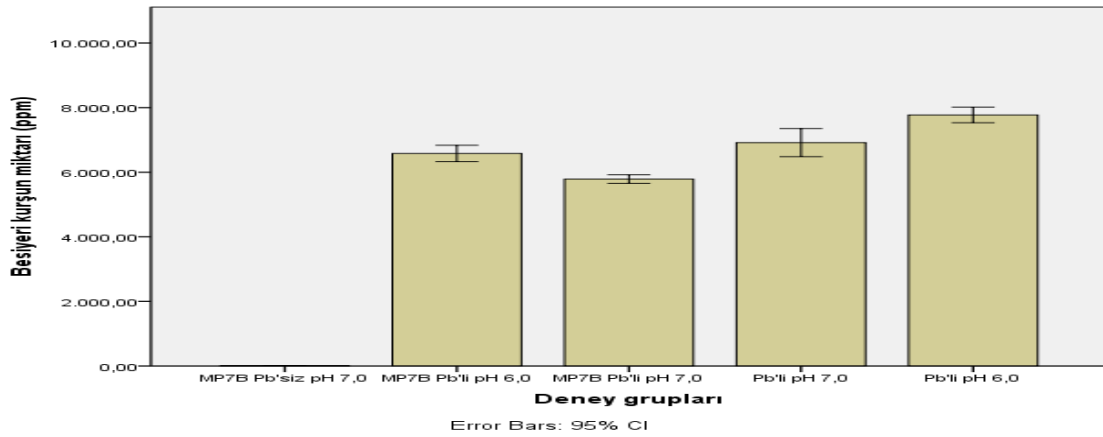
Şekil 40. Bakterinin absorpladığı kurşun miktarı.

Sıvı kültürde kalan kurşun miktarı incelendiğinde ise Tukey testine göre bakteri Pb'siz pH 7.0 kontrol ile bütün gruplar arasında kendi içinde anlamlı bir farklılık oluşturmuştur ($p<0,01$). Besiyerinde ki Pb miktarı bakteri varlığında pH 6.0 ve pH

7.0’de kontrollerine göre azalttığı, bu azalan miktarın bakteriyel pelletinde kaldığı gözlemlendi (Tablo 24, Şekil 41).

Tablo 24. ICP-OES bakteriyel sıvı ortamda kalan kurşun miktarı verilerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları.

	N	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata	% 95 Ort. güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
MP7B Pb'siz pH 7.0	3	2,055	0,769	0,444	0,143	3,9677	1,17	2,50
MP7B Pb'li pH 6.0	3	6581,404	102,139	58,970	6327,676	6835,132	6464,74	6654,73
MP7B Pb'li pH 7.0	3	5786,997	53,157	30,690	5654,946	5919,048	5728,10	5831,43
Pb'li pH 7.0	3	6915,845	175,003	101,038	6481,105	7350,565	6739,73	7089,72
Pb'li pH 6.0	3	7773,579	97,411	56,240	7531,596	8015,562	7696,36	7883,02
Total	15	5411,974	2877,862	743,060	3818,261	7005,677	1,17	7883,02



Şekil 41. Bakterinin absorplayamayıp besiyerinde kalan kurşun miktarının verileri.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

4.1. Bakterilerin Tanımlanması

Bu çalışmada, Pazar MYO uygulama bahçesinden 2012 - 2013 tarihleri arasında alınan 14 adet hastalıklı meyve örneklerinden izole edilen 34 adet Gram pozitif bakteri çalışıldı (Tablo 5). 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 özelliği bakımından pozitif, oksijen gereksinimine göre aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri oldukları gözlemlendi (Tablo 6, Şekil 3). Belirlenen bu özelliklere bakıldığında, izolatların Gram pozitif bakterilerin genel özellikleri yansıttığını ve *Bacillus* cinsine ait bakteriler olduğunu göstermektedir (Coneman vd., 1997).

İzole edilen bakterilerin farklı fiziksel ortam koşullarında ki toleranslarının belirlenebilmesi için bir dizi fiziksel özellikleri test edildi (Tablo 7). Bu testlerden biri olan NaCl tolerans testinde izolatların ortam tuzluluğuna toleransı araştırıldı. İzolatların 7'si % 10 tuz varlığında üreyemezken 27'si (% 79,41) üreme yeteneğine sahip olduğu, bunlardan da MP6A ve MP19A1 izolatlarının ise çok iyi (3+) üreyebildikleri gözlemlendi. Dahası yüksek tuz (% 15) varlığında 16 (% 47,06) izolatın ürettiği, MP6A, MP12A2 ve MP19A1 izolatlarının ise oldukça iyi (2+) üreme gösterdiği belirlendi. Bu izolatların % 10-15 tuz konsantrasyonlarında rahat üreyebilen halotolerant suşlar olduklarını ve tuzlu ortamlarda rahatlıkla üreyip ortama adapte olabileceğini göstermektedir. Ayrıca MP1B, MP1E, MP5MEA, MP9B, MP10C ve MP22E suşlarının % 10 ve % 15 tuz yoğunluğunda benzer konsantrasyonlarda ürettiği, dolayısıyla bu suşların da halotolerant suşlar oldukları ve böyle tuzlu topraklardan etkilenmeyeceklerinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Halofilik ortamlarda üreyebilen bu bakterilerin metal toleransları ya da bitki gelişimini teşvik eden özellikleri de belirlenirse metallere kontamine tuzlu toprakların biyoremediasyonunda başarılı olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

İzolatlarımızın 3'ü hariç (MP7C, MP7G ve MP12A1) tümünün 10-45 °C aralığında rahatlıkla üreyebildiği gözlemlendi. İzolatların farklı sıcaklıklarda üreme

yetenekleri incelendiğinde 3 izolat hariç tümünün geniş bir sıcaklık aralığında üreyebildiği belirlenmiştir. Özellikle MP5MEA, MP6A, MP10A, MP12A2 ve MP13A nolu izolatların hem 10 °C hem de 45 °C sıcaklıklarda çok iyi üreme göstermesi önemli bulunmuştur (Tablo 7). Farklı sıcaklıklarda bakterilerin rahat üreyebilmeleri, ekosistemdeki farklı sıcaklıklara kolaylıkla adapte olmalarını ve rahat üreyip çoğalmalarını sağlamaktadır. Böyle izolatlardan hazırlanacak biyopreparatların her türlü iklim koşullarına sahip ekosistemlere kolaylıkla adapte olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda bir izolatın (MP1B) dışında tümünün pH 4.5'ta üreyebildiği, 4 izolatın zorlandığı, MP6A, MP9A, MP12A1, MP19A1 ve MP22C izolatlarının ise pH 4.5-8.5 aralığında en iyi üreme özelliği gösteren suşlar oldukları belirlendi. pH 5.5 ve pH 8.5'ta ise izolatların tümünün iyi düzeyde üreme özelliği gösterdiği belirlendi. Sonuçlara baktığımızda düşük pH'daki üremelere kıyasla pH 5.5 ve pH 8.5'da ki üremelerin daha iyi olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla izolatların asidik ortamdansa bazik ortamı daha çok tercih ettiklerini söyleyebiliriz. Bununla birlikte büyük çoğunluğunun geniş pH aralığında üreyebildiği belirlenmiştir.

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. Ağır metallerin biyosorpsiyon üzerine yapılan ilk çalışmaları, biyosorpsiyon işlemlerinde etkili olan önemli faktörlerden birinin pH olduğunu göstermiştir. Metal katyonlarla elektronca zengin fonksiyonel grupların biyomasta yer alan etkileşimi, çevrenin pH değeriyle güçlü bir şekilde etkilenebilir. 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 adsorpsiyonu olduğunu göstermektedir.

Suşların geleneksel yöntemlerle tanımlanabilmesi ve bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için bir dizi testleri yapıldı. Triptofanaz enzimi, katalaz (hidrojen peroksid oksidoredüktase) enzimi, nitratları redükte edebilme yeteneğini veren enzimler ile glikozun fermentatif yolla organik asitlere metabolize edebilen enzimlerin varlığı belirlendi. Tüm bu özelliklerin belirlenmesi, bakterilerin karakterizasyonunda ve tür tanımlarının yapılmasında yararlanılmıştır. İzole edilen suşların 7'sinde güçlü sitrataz, MR reaksiyonu suşların çoğunda pozitif (% 79,41), indol üretimi izolatların tümünde negatif, KIA testine göre ise suşların çoğunun dip asit yüzey asit sonuç gösterdiği belirlendi (Tablo 8).

Çalışmada izole edilen sporlu bakterilerin geleneksel yöntemlere göre tür tanımları yapıldı ve tür dağılımları Tablo 9'da verildi. Toplam 34 izolattan 10'u yalnızca cins düzeyinde tanımlanırken diğerleri tür düzeyinde tanımlandı ve 8 farklı tür belirlendi. İzolatların 7'si *B. mycoides*, 4'ü *B. pumilis*, 4'ü *B. coagulans*, 3'ü *B. circulans*, 3'ü *B. cereus*, birer adet *B. polymxa*, *B. megaterium*, *B. fastidiosus* olarak tanımlandı.

4.2. Suşların Enzim Aktiviteleri ve Bitki Gelişimini Teşvik Edici Özellikleri

Ekosistemde önemli ayrıştırıcı olan bakteriler çeşitli enzimler salgılayarak organik ve bazı inorganik maddelerin parçalanmasına böylece biyodöngüye katılmasına aracılık eder. Çalışmamızda da test edilen suşların bazı enzim aktiviteleri araştırıldı. Bu enzim aktivitelerinden biri jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimidir. Bakteri ekstra sellüler protein karakterinde bir madde olan jelatinin iki aşamada (önce polipeptide sonra aminoasitlere) parçalamasını sağlar. Lesitinase ve fosfolipase enzim aktiviteleri bakteriye lipoprotein komplekslerini hidrolize edilebilme yeteneğini kazandırır. Üreinin hidrolizasyonu da spesifik bir enzim olan üreaz tarafından katalize edilerek sonunda 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana getirilir (Coneman vd., 1997).

Bakterilerin karakterizasyonu ve tür tanılarının yapılabilmesi için biyokimyasal özelliklerinin yanında enzim aktivitelerinin de belirlenmesi önemlidir. İzole edilen suşların üçünde güçlü kitinaz, 3'ü güçlü olmak üzere 11'inde amilaz, 15'inde CMC, 12'sinde lesitinaz, 15'inde jelatinaz, 27'sinde ise proteaz enzim aktiviteleri belirlendi (Tablo 10).

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Rosovitz vd., 1998; Wipat ve Harwood, 1999). Birçok *Bacillus*'lar, ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus* cinsine ait türlerden elde edilen birçok ekstrasellüler enzimlerin, endüstriyel öneme sahip olup, biyoteknolojik çalışmada kullanıldıkları bilinmektedir (Ito, 1997; Mawadza vd., 2000).

Çalışmamızda da test edilen 34 bakterinin çoğunun in vitro şartlarda birden fazla sayıda enzim üretebilme yeteneğine sahip oldukları gözlemlendi. Bu özelliğin doğal şartlarda muhtemelen daha güçlü olduğu ve çok sayıda enzimi üretebilecekleri gözlemlendi. Tablo 10'da verilen testlerden özellikle MP7B suşu kitinaz ve MP6A suşu kitinaz ve fosfat çözünürlüğü dışında tüm sonuçların olumlu olduğu ve güçlü enzim aktivitelerine sahip oldukları belirlendi.

Bitkiler, birçok hücre fonksiyonlarını etkileyen ve oksinler (örneğin, indol asetik gibi) olarak bilinen bitki hormonlarını kullanırlar (Glick vd., 1999). Çalışmada izole ve tanımlanmış suşların bitki gelişimini teşvik eden bakteri (PGPR) olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla; siderofor ile amonyum üretimleri, fosfat çözünürlüğü ve ACC deaminaz aktiviteleri araştırıldı (Tablo 10).

Mikroorganizmalar, pek çok bitki ve bazı yüksek organizmaların yeterli beslenmesi için gerekli demiri karşılamak üzere siderofor (demir taşıyıcı) adı verilen düşük molekül ağırlıklı demir şelatörleri üretirler (Neilands, 1995). Bitkiler ise, bir dizi heterolog demir alım mekanizmalarına sahiptirler (Yehuda vd., 1996). Masalha vd. (2000) yaptıkları çalışmada steril olmayan koşullarda yetiştirilen bitkilerin demir-eksikliği göstermediği, steril sistemde yetiştirilen bitkilerin ise demir eksikliği

gösterdiği, yani mikrobik aktivite sayesinde demir takviyesi yapıldığı belirlenmiş ve bu olay demir-bakteriyel-siderofor kompleksi olarak adlandırılmıştır. Sideroforun ürettiği çözünen komplekslerle, topraktaki çözünmeyen ferrik oksit gibi demir iyonlarını, bitkinin direkt olarak almasını sağlar (Glick vd., 1999) veya topraktaki kullanılabilir formdaki demiri bağlayarak bitki patojenlerinin kullanamayacağı forma dönüştürerek zararlıların gelişimini engeller (Ahmad vd., 2008).

Çalışmamızda da siderofor üretim yetenekleri Chrome azurol-S (CAS) agar metodu ile test edilmiş olup izolatların tümünde siderofor üretim özelliğinin var olduğu belirlendi (Tablo 10). İzolatların 4'ünde düşük (<10mm), 7'sinde orta (10-20mm) düzeyde ve 18'inde güçlü siderofor üretimi (≥ 20 mm) yeteneği tespit edildi. En yüksek aktivite sırasıyla MP4A, MP19C ve MP22A2 suşlarında (46, 40 ve 40 mm) gözlenirken MP7B suşunun 9 mm çaplı kolonisinin 26 mm yani üç katı bir zon oluşturması güçlü siderofor aktivitesinin varlığını işaret etmektedir (Şekil 5).

Bitkilerde fosfor enerji transfer sisteminin önemli bir parçasıdır. Genelde toprakta boldur ancak, yüksek reaktif doğası nedeniyle, bitkiler için uygun formları kısıtlıdır, eksikliklerinde yavaş ve bodur büyüme yol açarak verimi azaltır. Bu bitkiler tarafından kullanılan fosforlu gübre oranı % 5-25 mertebesinde olduğu tahmin edilmektedir (Wild, 1988). Fosfat çözündürme, asitlenme, şelasyon ve değişim reaksiyonlarının dahil olduğu süreçlerin bir dizisiyle oluştuğu varsayılmaktadır (Beckie vd., 1998). Fosfat çözündürücü mikroorganizmaların toprakta yaygın olarak bulunduğu (Chabot vd., 1996) 1950'lerden beri bilinmekte ve kolaylıkla izole edilmektedir.

Toprakta fosfor, genel olarak fazla miktarda (400 - 1200 mg/kg) olmasına rağmen çözünmeyen formda olmasından dolayı bitki gelişimini desteklememektedir. Bu çözünmeyen fosfat hem apatit 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 (Rodriguez ve Fraga, 1999; Richardson, 2001). Çalışmamızda test edilen suşların 11'i 4 ile 17 mm aralığında zon çapı oluşturarak fosfat çözebildiği gözlemlendi. En güçlü aktivite MP12A2

(17 mm), MP9A (15 mm), MP9D ve MP10C (14 mm) suşlarında gözlenirken, MP7B'de 11/17 mm şeklinde belirlendi (Tablo 10, Şekil 6).

Toplam 18 izolatta ACC deaminaz aktivitesi belirlenirken, 26'sında güçlü NH₃ üretim yeteneği belirlendi. Test edilen tüm suşlarda amonyum üretimi belirlenirken özellikle MP10A ve MP13A suşlarının oldukça güçlü (4+) aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 7). Test edilen suşların çoğunda (% 58,06) ACC deaminaz üretimi belirlenmiştir (Şekil 8). Genel olarak suşların siderofor üretim yetenekleri, ACC Deaminaz aktiviteleri ve amonyum çözünürlüklerinin iyi olduğu gözlenmiştir. Bitki gelişimini destekleyen özelliklerin tümü açısından bakıldığında MP7B, MP7C, MP9A, MP9D, MP12A2, MP14B, MP20D suşlarında test edilen dört testin de pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar suşların güçlü bitki gelişimi teşvik edici aktivite varlığını göstermektedir. Genel olarak bakıldığında ise hem üretilen zengin enzim içeriği bakımından hem de bitki gelişimini destekleyiciliği bakımından en iyi suşun MP7B olabileceği belirlenmiştir (Tablo 10).

Rizobakterilerin ihtiva ettiği ACC-deaminaz aracılığıyla ACC'nin alımı ve parçalanması, ACC miktarını dolayısıyla etilen miktarını da azaltır, böylece yüksek etilen konsantrasyonlarının potansiyel etkinliklerini de önler (Glick vd., 1998). Yüksek konsantrasyonlarda ağır metaller ile kontamine olmuş topraklar gibi stres koşullarına maruz kalan bitkiler için bu son derece önemli bir özelliktir (Grichka vd., 2000).

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 gözlenmiştir (Abeles vd., 1992).

Toprak mikroorganizmaları tarafından üretilen 1-aminosiklopropan ve 1-karboksilat (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). İndol asetik asit üretim yetenekleri

spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş olup suşların 13'ünde absorbands değeri iyi (10,0-15,0) 11'inde ise çok iyi (≥ 16) düzeyde aktivite tespit edilmiştir. En iyi aktivite gösteren suşun MP7B olduğu, bunu sırasıyla MP1G ve MP9D suşları izlenmiştir (Tablo 11).

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 artırması ya da iyileştirilmesinin önemi gelecekte 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, diğer bitki besin maddelerinin mineralizasyonu ve alımını artırabilmektedir (De Freitas vd., 1997; Çakmakçı vd., 1999, 2001; Şahin vd., 2004). Siderofor, 1,3 glukanaaz, kitinaz, antibiyotik ve siyanit üretimiyle patojenik mikroorganizmalara karşı etki göstererek dolaylı olarak bitki gelişmesini teşvik edebilmektedir (Dobbelaere vd., 2003). Bakterilerce serbest azot fiksasyonu, indol asetik asit, gibberellik asit ve sitokinin gibi hormonların üretimine ilave olarak, bitki taşıma sistemi ve iyon alımının teşvik edilmesi gelişmeyi artırdığı bildirilmektedir (Dobbelaere vd., 2003; Aslantaş vd., 2006; Çakmakçı vd., 2006, 2007). Hussen (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *Azotobacter vinelordii* Mac 259 ve *Bacillus cereus* UW85 suşlarının dâhil olduğu 14 toprak bakteri izolatında PGPR özellikleri in vitro olarak incelenmiş, 6'sında güçlü IAA üretimi, 4'ünde fosfat çözünürlüğü ve 7'sinde siderofor (Fe-III kenetleme maddesi) üretimi belirlenmiştir.

Fürnkranz vd. (2009) tarafından Bolivya'da 54 bakteri suşunda yapılan çalışmada, % 19'unu diazotrof, % 41 fosfat çözücü, % 10 etilen öncülü madesi olan 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) üretebilen ve % 17 fitohormon (IAA)

sentez özelliğini sergileyen bakteri olarak tanımlamıştır. Rizoid bakteriyal suşların sadece küçük bir kısmı in vitro deneylerde bitki patojeni özelliği göstermiştir.

Bitki bakteri ilişkilerinin değerlendirilmesi ve PGPB özelliğine sahip suşların seçilmesi tarımsal amaçlı yeni mikrobiyal aşuların geliştirilmesi, toprağın biyoremedie edilmesi, daha sağlıklı ve yüksek kalitede zirai ürün elde edilmesi bu gibi çalışmalar sayesinde mevcut durumdan ileri seviyelere taşınması söz konusu olacağı aşikârdır.

4.3. Bakterilerin Metal Toleranslarının Belirlenmesi

Esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin ekosistemdeki konsantrasyonlarının toksik düzeye ulaşması durumunda, ekosistemde yaşayan özellikle birincil üretici konumunda olan bitkiler etkilenmekte buradan da besin zinciri yoluyla hayvan ve insanlara kadar ulaşarak tüm canlıları olumsuz olarak etkilemektedir. Mikroorganizmalar ise bazı proteinlerinin sentezini arttırarak ya da azaltarak oluşan bu metal toksisitesine cevap verebilmektedirler. Bu amaçla incelenen *Bacillus* sp. suşlarının 4 farklı metal (Pb, Ag, Cu ve Zn) varlığında üreyebilme yetenekleri katı agar ortamında araştırıldı (Tablo 12). Çalışmada 16 suşun katı agar ortamında 1 mM gümüş varlığında üreyerek, şeffaf zon oluşturup koloni renginde kararmalara neden olduğu gözlemlendi. MP10D, MP5MEA, MP7B, MP9C, MP4A, MP12A1 ve MP7F nolu suşların ise yüksek konsantrasyonlarda da (10 mM) iyi üredikleri izlendi. Kültürlerin oda ısısında bekletildiklerinde büyük çoğunluğunda tüm konsantrasyonlarda olmak üzere kırmızıdan berraklaşan açılmaya kadar değişen zon oluşumları ve koloni renginde kararmalar izlendi (Tablo 12, Şekil 10).

Bakır tolerans testinde 1 mM konsantrasyonlarda MP22A, MP10E, MP22E, MP1B ve MP10C suşların dışındaki tüm izolatların ürediği ve kararmalar oluşturduğu, 20 suşun ise 2,5 mM'da da üreyebildiği gözlemlendi. Bakır konsantrasyonu arttıkça bakterilerden üreme gösterenlerin sayısının azaldığı, 5 mM'da sadece MP9C'nin üreyebildiği, 10 mM'da ise hiçbir suşun üremediği belirlendi (Tablo 12). Bu sonuç test edilen suşların bakır toleransının yalnızca $\leq 2,5$ mM olduğunu göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyonlar ise bakterinin üremesini inhibe etmektedir.

Bakır varlığında üreyen koloniler oda ısısında bekletildiğinde, besiyerinin maviden şeffafa değiştiği, kültürün renginde ise bariz bir renk değişiminin olmadığı gözlemlendi (Şekil 10). Ancak kültürlerin 30-40 gün gibi uzun sürelerde oda ısısında bekletilmeleri sonucunda ise kolonilerin bazılarında turunculaşmadan kahverengileşmeye kadar giden bariz renk değişimleri gösterdikleri, çoğunda ise kararmaların olduğu gözlemlendi (Şekil 10). Bu durumun muhtemelen metal tuzları bekledikçe bakteri yüzeyinde birikerek ya da bakteri metalleri yüzeyine adsorbe ederek indirgenmiş ve renk değişiminin oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Bu renk değişimini muhtemelen bakırı indirgemiş formundan kaynaklanmış olabileceği, besiyeri renginin değişmesinin ise besiyerine renk veren bakırlı bileşiğin bakteri tarafından adsorbe edilmesinden dolayı oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Suşların çinko toleranslarının diğer metallere göre daha düşük olduğu, tümünün en iyi 1 mM'da üreyebildikleri izlendi (Tablo 12, Şekil 10). Suşların 11'inin tüm konsantrasyonlarda zor da olsa üreyebildiği; MP22B, MP10E ve MP9D suşlarının ise 5 mM'a kadar dirençli oldukları gözlemlendi. Bu suşların çinko kontamineli ortamlarda potansiyel biyoremidant suş olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Katı agar ortamında kurşun toleransına bakıldığında, test edilen tüm suşların 1 mM ve 2,5 mM konsantrasyonlarında üreyebildiği, büyük çoğunluğunun (% 76,47) ise 5 mM'a da toleranslı oldukları belirlendi. MP7B ve MP13A suşlarının bütün konsantrasyonlarda üreyip reaksiyon (renk değişimi, hidroliz zonu vb.) oluşturma yeteneğine sahip oldukları gözlemlendi (Tablo 12). Kurşun varlığında üreyen kolonilerde bariz olarak renk değişimi ve şeffaf renkte hidroliz zonu oluştuğu gözlemlenmiş olup bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır (Şekil 11). Bunun muhtemelen metal ve bakteri etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu konuda daha detaylı ve spesifik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Kararmalar şeklinde gözlemlenen bu renk değişimlerinin, metallerin bakteri yüzeyinde birikmesinden ya da bakterinin metalleri yüzeyine absorbe ederek indirgenmiş olabileceğinden ve dolayısıyla besiyerinde zon oluşturarak açılmaları neden olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bakterilerin 2,5 ve 5 mM kurşunlu sıvı kültür ortamlarında kurşunu tolere ederek üreyebilme potansiyellerini incelemek için yapılan testlerde de benzer sonuçlar elde edildi. Sıvı kültür ortamlarında bakterilerin metal toleranslarının daha yüksek olduğu, fazla miktarlarda üreyebildikleri gözlemlendi. İncelenen her iki konsantrasyonda da bakterilerin üreyebildiği, kurşun yoğunluğuna bağlı olarak kültür renklerinde şeffaflaşma ve kararmalar oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 12’de ki sonuçlara bakıldığında aynı suşların kültürlerinde 2,5 mM’da şeffaflaşmalar gözlemlenirken, 5 mM’da kahverengileşmelerin gözlenmesi bakterinin indirgenme/yükseltgenme işlemlerini konsantrasyona bağlı olarak farklı reaksiyon basamaklarında gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Birçok özellikleri açısından en iyi olarak belirlenen 3 suşun (MP6A, MP7B ve MP9D) kurşun nitratin üremesini durduran ve öldüren dozlarının belirlenmesi için MIC ve MBC değerleri belirlendi. MP7B ve MP9D suşlarının kurşuna en dirençli (25 mM/L) suşlar olduğu, kontrol suş olarak kullanılan *B. subtilis* W168’in da dirençli olduğu ve 25 mM/L’de etkilendiği, ancak diğer suş olan MP6A’nın 12,5 mM/L konsantrasyona dirençli olduğu belirlendi. Bakterisit konsantrasyon (MBC) değerlerinin, kontrol suşu hariç diğer suşlarda birbirine benzer ve 100 mM/L’nin üzerinde oldukları gözlemlendi (Tablo 13, Şekil 13). Tablo sonucuna genel olarak bakıldığında seçilen suşların tümünün mevcut kaynaklardaki Pb tolerans değerleriyle kıyaslandığında daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Elsilk vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Cd, Cu, Co, Zn ve Pb metallerine değişik oranlarda dirençli olan *B. anthracis* PS2010 suşunda MIC değeri sırasıyla 0,6, 2,0, 0,8, 4,0 ve 3,0 mM olarak bildirilmiştir. Bu sonuca göre test edilen suşlarımızın kurşun MIC ve MBC değerlerinin oldukça yüksek olduğu, biyoremediasyon işlemlerinde kullanım potansiyellerinin iyi olabilecekleri düşünülmektedir.

Tamil Selvi vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, Güney Hindistan’da ağır metal (Zn, Cu, Cr, Hg ve Pb) dirençli bakteriler izole edilerek tanımlanması ve karakterizasyonu yapılmıştır. 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 metallerle dirençli suş bildirmişlerdir.

Chihomvu vd. (2014) tarafından nehir sularından izole edilen *Bacillus* genusunun da dâhil olduğu 16 suşun, 0,2-4 mM konsantrasyonlarındaki Cd, Cr, Cu Fe, Ni, Pb ve Zn metallere karşı toleransları MIC yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmada suşların Fe MIC değerleri 0,2-4 mM, bakır MIC değerleri ise 0,2-0,8 mM aralığında bildirilmektedir. Bakterilerin en çok çinkoya duyarlı oldukları (yanlızca 5 suşun 0,2-0,8 mM) en yüksek direnci ise kurşun metale karşı gösterdikleri (10 suşun 4 mM kurşun varlığında ürediği) bildirilmektedir.

Bakterilerdeki metallere karşı olan bu değişik direnç cevabı direnç mekanizmalarındaki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır (Abou Zeid vd., 2009). Ağır metallere dirençlilikteki değişiklikler kromozomlar, plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile olmaktadır (Gupta vd., 1999; Tenover ve McGowan, 1996; Ghosh vd., 2000). Özellikle plazmid aracılı direncin daha yaygın olduğu (Zolgharnein vd., 2007) çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız suşlarda muhtemelen plazmid aracılı direnç söz konusudur. Çünkü çalışma esnasında kurşun konsantrasyonu kademe kademe arttırıldığında direncin arttığı gözlenmiş ancak bu yönde başka bir çalışma yapılmamıştır. Seçilen suş biyoremediasyonda kullanılacağından direncin nedeninin bulunması önem arz etmektedir.

4.4. Kurşun Varlığında ve Yokluğunda Farklı pH'larda Bakterilerin Üreme Eğrisi

Çalışmada elde edilen veriler göre seçilen üç (MP6A MP7B ve MP9D) suşun yedi farklı pH (pH 5.0-7.5 aralığında) ortamında kurşun varlığında ve yokluğunda 48 saat boyunca üreme yeteneği (eğrisi) araştırıldı (Şekil 14-16). Test edilen tüm koşullarda seçilen üç bakterinin de üreyebildiği ancak, kurşun varlığında düşük pH'larda (5.0-5.5) üremenin bir miktar azaldığı gözlemlendi. Kurşun yokluğunda üç suşta da düşük pH değerlerinde bariz bir üreme artışı gözlenirken kurşun varlığında tam tersi bir durum söz konusu olmaktadır. Bu kurşun ya da metal varlığında düşük pH değerlerinde bakteri popülasyonunun etkilendiğini, dolayısıyla üremenin azaldığını göstermektedir. Bakteriyel izolatlar tarafından üretilen, ağır metaller için şelat etkisi gösteren organik asitlerin düşük pH'yı daha da düşürdüğü bildirilmektedir (Li vd., 2010). Verilerimizde de kurşun toksisitesinin düşük pH değerlerinde daha fazla etkili olduğunu, ortamın pH değerini daha da düşürerek bakteri üremesini azalttığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak kurşun metali varlığından en az etkilenen suşun MP7B olduğu, ikinci sırada MP9D suşunun geldiği belirlendi. İlginç bir şekilde suşların tümünde kurşunsuz ortamda orta asitli pH olan 6.0-6.5’da üremenin düşük olduğu, bu pH’nın altında ve üstünde daha iyi üreme gösterdikleri gözlemlendi. Özellikle pH 5.5’da ikinci bir logaritmik evrenin var olduğu gözlenmekte, bu durum ya da üreme artışının bu evrede ortama ekstra selüler madde salınımının yoğun olduğu için olabileceğini düşündürmektedir. Metal varlığında ise yüksek pH değerlerinde daha iyi üredikleri belirlendi. Biyoremidasyon uygulamalarında test edilen suşların üçünde kullanılabilirliği, ancak MP7B’nin Pb varlığında tüm pH değerlerinde daha iyi ürettiği ve en uygun suş olacağı kanısına varılmıştır.

Sulu ortamlarda metal iyonlarının uzaklaştırılmasında canlı hücrelerin kapasitesini sıcaklık, pH ve biyomas konsantrasyonu gibi çevresel gelişme koşullarından oldukça fazla etkilenmektedir (Chen ve Ting, 1995).

Yapılan çalışmada *Azotobacter chroococcum*, *B. megaterium* ve *B. mucilaginus* (Wu vd., 2006) ve *Bacillus* sp. RJ16 (Sheng vd., 2006) metal varlığında pH’nın düştüğünü, Cd, Zn ve Pb’nin biyoyararlanımlarının arttığını rapor etmişlerdir (Chen vd., 2005).

Toprak mikroorganizmaları kontamine toprağın biyoremidasyonunda, veriminde ve yapısında önemli rol oynar. Bakterilerin metal kullanılabilirliği ortamın pH, katyonik değişim kapasitesi (CEC) ve organik madde gibi toprağın ve metalin karakteristik yapısından etkilenir (Kayser vd., 2001; Lebeau vd., 2008). Ekosistemde çözünür olmayan fazlardaki ağır metallerin serbest çözünür fazlara dönüştürülmesi bakteriyel suşlar tarafından kolaylaştırılabilir (Arunakumara vd., 2013). Zaidi vd. (2006) tarafından belirtildiği gibi fosfat çözüldürücü *Bacillus subtilis* SJ-101 ile inoküle toprakta, pH 7.5’den 4.8’e azalması, muhtemelen metallerin çözüldürülmesi ve sonrasında bitkiler tarafından alımı için elverişli koşullar yaratmaktadır.

4.4. MP7B Suşunun Kurşun Absorbsiyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Bakterinin kurşun absorblama yeteneğine ortam sıvısının ne kadar etkili olabileceğinin belirlenmesi amacıyla su ve MHB besi ortamlarında standart eğrilerinin araştırılması sonucunda doğal olarak absorbans değerinin benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 17). Kaynaklarda kurşun nitratin, UV-Vis spektrumunda 10 ppm konsantrasyonlarında 235-340 nm dalga boyunda absorbans alındığı (URL 1), 2 değerlikli kurşunun pH 9.0'da ise 430 nm'de pik oluşturduğu (Nagalakshmi vd., 2011) belirtilmektedir.

Su ortamında Pb'nin 1,25-5 mM konsantrasyonlarında düzgün ve birbirinin aynı tek bir grafik oluşurken, MHB besiyerinin absorbansı kurşun konsantrasyonu arttıkça (2,5-5 mM aralığında) grafiğin absorbans değerinin az da olsa arttığı izlendi. Kaynaklarda Pb'nin 335-340 nm aralığında absorbans verdiği, grafiklerimizde de bu aralıkta zayıf bir pikin oluştuğu gözlenmektedir (Şekil 18).

Deney düzeneğinde sonuçlar 48, 72 ve 96 saat olarak incelendi ve absorbansın süre uzadıkça arttığı belirlendi (Şekil 19-21). Kırksekiz saat sonraki kurşun+MP7B birlikteliğinin kurşunsuz MP7B filtratı ve kurşunlu pH 5.0-7.5 aralığı ile kıyaslandığında en yüksek absorbansın MHB+Pb+MP7B'de olduğu gözlemlendi. Bu sonuç metallsiz ortamda üreme grafiğiyle kıyaslandığında bakterinin muhtemelen metali absorbladığını ve absorbans değerinin arttığının bir kanıtı olarak düşündürmektedir. Kültürün inkübasyon süresindeki uzamaya paralel olarak 320-340 nm dalga boyunda ve 420-450 nm dalga boylarında pikler gözlenmektedir. Burada MP7B+Pb varlığında gözlenen iki pikin kurşunsuz MP7B kültüründe olmadığı izlenmektedir. Bu durumun muhtemelen birinci pikin Pb'ye ait olduğu, ikinci pikin ise kurşuna veya bakterinin Pb varlığında artan bir protein ekspresyonuna ait olabileceği düşündürmektedir. Bu durumun netleştirilmesi için bu ekstraktların protein profillerinin incelenmesi veya daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Absorbans çalışmasında kurşun varlığında kültür süresi uzadıkça pH'nın önemini kaybettiği, pH 5.5-7.5 aralığında absorbansın birbirine benzer oranlarda ve iyi düzeyde olduğu belirlendi (Şekil, 20-21). Bu sonuç MP7B'nin geniş bir pH aralığında kurşun absorpsiyonunu yapabildiğini göstermektedir. Çalışmalarda daha yüksek pH ve daha

düşük pH aralıklarının denenmesinin yararlı olabileceği düşünüldü ancak kültürün üreme başarısını azaltabileceğinden dolayı bu aralıklar test edilmedi.

Canlı hücre sistemleri tarafından metal biyoalınımının kısmi kısıtlayıcıları önemlidir ki bunlar pH, yüksek metal yoğunluğu, tuz konsantrasyonu ve dış kaynaklı metabolik enerji gereksinimleri olarak bildirilmektedir (Dönmez ve Aksu, 2001). Torres vd. (1998) enstrümantel teknikleri kullanarak *Plectonema baryanum* alglerinde Zn, Mn, Pb ve Al birikiminde polifosfat (PPB) cisimciklerinin rol oynadıklarını göstermiştir. Canlı hücrelerdeki aktif alım sistemlerinde PPB içinde metallerin hapsedilmesi daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Suh vd. (1998) taramalı elektron mikroskobu (TEM) kullanarak *Saccaromyces cerevisia* hücrelerinde, kademeli olarak kurşun birikimi incelenmiş ve 2 saatten sonra sitoplazmada biriktiğini belirlemişlerdir. Bu olaylar üç basamakta gerçekleştiği, birinci basamakta ilk 3 dakikada hücre duvarına Pb'nin bağlanması gerçekleştiği, ikinci aşamada metabolizmaya bağlı olarak 4-24 dakikada gerçekleşen hücre duvarı/membranına birikme safhasını oluşturmaktadır. Üçüncü aşamada ise kurşun (24 saat) sitoplazmada biriktirildiği bildirilmektedir.

Canlı hücreler metalleri başlıca iki farklı metabolik yolla absorbe ederler (Velasques ve Dussan, 2009). Bunlardan birincisi aktif metabolik yol olup hücre içinde birikimi sağlar diğeri ise pasif metabolik yoldur. Bu yollardan bazıları ise S-tabakası proteinleri gibi bazı moleküllerin yüzeyine yapışması, yardımcı proteinlerin fosfor ve kükürt gibi esansiyel elementlerle birleşip hücre içinde biriktirilmesi ya da enzimatik ürünler tarafından indirgenmesi şeklinde gerçekleşir (He vd., 2010; Kuffner vd., 2010). Metal absorpsiyonunda pH önemli bir faktördür. Metal iyonlarının sıvı ortamda absorpsiyonu için, iyonik değişimi sağlayacak proton gerekli olduğundan asidik ortamda daha iyi gerçekleştiği bildirilmektedir (Velasques ve Dussan, 2009).

Oves vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis* OSM29 suşunun kurşun absorpsiyonunu pH 0.0-10.0 aralığında araştırmış, en uygun pH aralığının 5.0-7.0 olduğu, optimum absorpsiyonu ise pH 6.0'da elde ettiği bildirilmektedir.

Düşük pH değerlerinde bakteri hücre duvarındaki ligantlar H₃O ile sıkı olarak bağlanır ve böylece itme kuvvetinden dolayı metal iyonlarının ligantlara yaklaşımı kısıtlanır. Diğer taraftan yüksek pH değerleri bakteri hücre duvarının karboksil, fosfat, imidazol ve amonyum grupları gibi daha fazla sayıda liganta maruz kalmasına ve metabolik iyonların bir sonraki çekimi ile pozitif yüklenmesine ve de hücre yüzeyine tutunması ile bu metalik iyonların taşınmasına neden olduğu bildirilmektedir (Pardo vd., 2003).

Benzer şekilde çalışmamızda da absorbands değerleri en yüksek pH 5.5-7.5 aralığında gözlenmiştir. Kurşun varlığında farklı pH aralıklarında en iyi üreme yeteneğine sahip olduğu gözlenen *Bacillus thuringiensis* MP7B suşu bundan sonraki denemelerde kullanılmak üzere seçildi.

4.5. Kurşun ve Bakteri Varlığında Mısır Tohumunun Çimlenme Başarısı

Bitki gelişimini teşvik eden özellikleri iyi, metal toleransı yüksek ve metal varlığında farklı pH aralıklarında iyi üreyebilen 2 suşun (MP7B ve MP9D) mısır çimlenmesi üzerine olan etkileri, Pb (3 mM) varlığında ve yokluğunda test edildi (Tablo, 14). Çalışmada kurşun varlığının çimlenme başarısını geciktirdiğini ancak engellemediğini 7. günde % 100 çimlenme gerçekleştiği gözlemlendi. Test edilen iki bakteriden MP7B suşunun kurşun grubuna oranla daha fazla geciktirdiği ancak çimlenmeyi engellemediği gözlemlendi. MP9D suşunda ise çimlenme başarısını engellediği, dolayısıyla çimlenmede kullanıma pek uygun olmayacağı kanısına varıldı. Bakterilerin tek başlarına in vitro ortamda mısır bitkisi çimlenmesi üzerine olumsuz etkilerinin var olduğu ancak bu durumun toprak ortamında da denenerek etkinliğin doğal şartlarındaki durumunda belirlenmesi gerekmektedir. Doğal ortamda bu durumun farklı olacağı düşünülmektedir.

Bakteri kurşun birlikteliğinde ise her iki suşta da çimlenmeyi bakteri kontrollerine göre arttırdığı belirlendi (Tablo 14, Şekil 22-26). Bu sonuçtan 3 mM kurşun varlığı çimlenme hızını bir miktar azalttığı, bakterilerin ise kurşundan daha fazla azalttığı tespit edilmiştir. Çimlenmeden sonraki tüm ölçülen parametrelerde ANOVA testine tabi

tutulduğunda, kontrol bitkisine göre gövde ağırlığı hariç ($p<0,05$) diğer parametreler açısından $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bir farklılığı ortaya çıktığı gözlemlendi.

Bu sonuçlar göstermektedir ki tek başlarına uygulandığında hem Pb hem de bakteri çimlenme parametrelerini (saçaklanma hariç) olumsuz etkilemektedir. Ancak bakteri-Pb birlikteliğinde bakteri kurşun stresini azaltarak gelişme parametrelerini arttırdığı gözlemlendi. Bu durumda kurşun stresi varlığında bakterilerin özellikle de MP7B suşunun daha fazla olumlu sonuç oluşturduğu gözlemlendi. Stres karşısında bakterinin ekstraselüler ortama saldırdığı PGP faktörlerin ya da tohumun stresini azaltan faktörlerin etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir.

Cassan vd. (2009) yaptığı çalışmada, *Azospirillum brasilense* Az39 ve *Bradyrhizobium japonicum* E109 suşlarının mısır ve fasulye çimlenmesi üzerine olan etkinliği araştırılmıştır. Beşinci ve 8. gün her iki bitkinin çimlenmesine bakıldığında E109'un daha iyi olduğu, hipokotil, radikul ve gövde uzunluğuna bakıldığında Az39 suşunun daha etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada kök ve gövde uzunluğu ile gövde ağırlıklarına olan etkisi her iki bakterinin varlığında da uzamanın kontrole göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada saçaklanma veya nodül oluşumu kontrol grubunda bildirilmezken E109 suşu kullanıldığında yüksek bir saçaklanma ve nodül oluşumu gösterdiği bildirilmektedir. Az39 suşunda bu gözlenmezken E109 ve Az39 birlikte kullanıldığında E109 verilerinden daha fazla saçaklanma/nodül oluşumu bildirilmiştir.

Bakterilerin kültür ortamında gelişimlerini destekleyen bileşiklerin üreyebiliyor olması bu bileşiklerin konsantrasyonlarına göre genç tohum dokusunda morfolojik ve fizyolojik değişimleri meydana getiriyor olması aşikârdır. Böylesi fitohormonal şok bakteri formülasyonu ve tohum arasındaki ilk temasta meydana gelmekte ve başka çalışmalarda da belirtildiği gibi bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunmasına da gerek yoktur (Tien vd., 1979; Jain ve Patriquin, 1985). Bununla birlikte canlı bakterinin mevcudiyeti yerinde fitohormon üretimi için katkıda bulunmaktadır. *A. brasilense*'nin buğday kök yüzeyine kolarize olduğunda IAA üreten anahtar genin (ipdc-gene) indüklendiği bildirilmektedir (Rothballer vd., 2003).

Benzer şekilde, bitki çimlenme esnasındaki biyomass üretimindeki artışın bakteriyal gelişmeyi düzenleyiciler aracılığıyla ve bir kısım farklı embriyonel gelişmeyi indükleyiciler nedeniyle olabilir. Bu indükleyiciler su ile kaplı tohumlara yapışır ve su/mineral alımına eşlik ederek kök gelişimini hızlandırır. Bu görüş katkı hipotezi (additive) olarak Bashan vd. (2004) tarafından öne sürülmüştür. Biyomas artışı için biyolojik azot fiksasyonun önemi daha sonraki evrede uygulanmaktadır ve hatta tahıl üretimi için, bakterinin önemli bir sayıda bile bitki dokusunda yerleşik hale gelmiştir. Bu görüşe göre bakteri fitostimulasyonu çimlenme ve tohum gelişimi gibi gelişmenin erken evresinde çok önemlidir (Cassan vd., 2009).

Barbieri vd. (1991) *Azospirillum* sp.'nin fitohormon üreterek çimenin kök gelişimini modifiye edebilme yeteneğine sahip olduğu bildirmektedir. Burdman vd. (2006) aynı etkiyi *Azospirillum* sp. bakterisinin legüminate tohumlarında da bildirmiştir. Noel vd. (1996) Rhizobiaceae familyasının bir üyesi olan *Rhizobium leguminosarum* ile inoküle edilen nonlegüminase tohumların erken fide kök gelişimlerini önemli oranda arttırdığını ve bu etkinlik bakteriyel fitohormonların üretimine atfedilmiştir.

Dabbelaere vd. (1996) kök uzunluğunun ve ağırlığının artmasıyla birlikte kök uzunluğunun inhibisyonu, bakteriyel IAA üretime karşı tipik bir yanıt olduğunu göstermiştir ve tohum üzerine dışardan IAA uygulanmasını taklit edebilir.

Kolb ve Martin (1985), *A. brasilence* ile inoküle pancarda interal kök sayısı ve uzunluğunun arttığını gözlemişler ve bu etkilerin, tohuma inokülasyon için kullanılan bakteri kültür ortamındaki IAA konsantrasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Çalışmamızın sonuçları literatürlerde verilen bilgilerle benzerlik göstermektedir. Bakteri varlığında ikinci bir stres faktörü olarak metal verildiğinde bakterinin faydalı etkinliğinin daha arttığı, bu durumun kaynaklarda belirtildiği üzere fitohormon üretimiyle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

Çalışmada birçok özelliği incelenen suşlardan seçilen iki suştan birinin kullanılarak mısır bitkisinin gelişimine olan etkinliği araştırılması planlandı. Bitki gelişimini teşvik eden, kurşun toleransı yüksek ve bundan sonraki aşamalarda kullanılması düşünülen iki izolatın (MP6A ve MP7B) moleküler (16S rRNA sekans

analizi) yöntemler kullanılarak tür tanımlarının doğrulanması hedeflendi. MP6A izolatu *Bacillus* sp., MP7B izolatu ise *B. thuringiensis* şeklinde belirlendi (Tablo 15, Şekil 27). Bu tanımlamaya göre suşların tür olarak da biyoremidant bir tür olduğu belirlenmiş oldu.

4.6. Kurşun Varlığında Mısır (Saksı Deneyi) Bitkisi Gelişimi ve ICP-OES Analizi

4.6.1. Kurşun Varlığında Mısır Saksı Deneyi Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen MP6A ve MP7B suşlarında kıyaslama yapıldığında; amonyum üretimlerinin oldukça iyi olduğu, siderofor üretimlerinin *B. thuringiensis* MP7B (26 mm)'nin *Bacillus* sp. MP6A (8 mm) daha yüksek olduğu, ACC deaminaz aktivitesinin her iki suşta da pozitif olduğu belirlendi. Fosfat çözünürlüğü testine göre MP7B üreme gösterip zon oluştururken, MP6A suşunda ise üreme olmadığı gözlemlendi. IAA değerlerine bakıldığında MP6A suşunun aktivitesinde (14,22) iyi olduğu, MP7B suşunun en iyi aktivite (26,85) gösteren suş olduğu belirlendi. Ayrıca bu suşların güçlü amilaz, proteaz, karboksi metil selüloz, lesitinaz ve jelatinaz aktivitelerine sahip oldukları izlendi. MP7B suşu test edilen tüm fiziksel ve kimyasal parametrelerde çok iyi üreme gösterdiği, bitki gelişimini teşvik edici özelliklerinin diğer suşlara göre daha iyi olduğu belirlendi. MP7B suşunun denenen bütün metal ortamlarında üreyebildiği ve reaksiyon oluşturarak renk değişimleri oluşturduğu gözlemlendi. MP7B suşunun Pb toleransının da yüksek olduğu bütün konsantrasyonlarda üreyerek şeffaf zon ve kararmalar oluşturduğu izlendi. Tohum çimlenme deneyinde, çimlenme hızını en fazla arttıran suşun MP7B olduğu belirlendi. Yapılan fiziksel, biyokimyasal, metal toleransı test sonuçlarına ve bitki gelişimini teşvik edici özelliklerine bakıldığında en iyi suşun MP7B olduğu belirlendi ve saksı deneyinde de bu suşun kullanılması gerekliliğine karar verildi.

Çalışmada Tablo 16'a göre deney düzeneği oluşturulmuş, her aşamada deney fotoğraflararak farklılıkların görsele yansıyor yansımadağı kontrol edildi (Şekil 28, 29). Uygulama sonucunda saksılardaki toprak nemi ve mısır köklerinin su içeriği hesaplanarak grupların ortalama yaş ve kuru ağırlıkları test edildi (Tablo 17). Toprak nem oranları birbirine yakın olduğu ve tüm saksılarda % 58-62 aralığında değiştiği

tespit edildi. Bu sonucun saksılarda homojen bir sulamanın olduğunu doğrulamaktadır. Kontrol grubunda ortalama kök kuru ağırlık 0,342 g iken bakteri kontrolünde 0,370 g şeklinde arttığı gözlemlendi. En yüksek su içeriği kurşun 200 ve MP7B+200 mg birlikteliğinde olduğu, bakteri kontrollerinde ise bu oranın azaldığı, dolayısıyla stres faktörleri azaldıkça su içeriğinin de azalmış olabileceği yani bakterinin kurşun stresinin azaltması yönünde etkinliğinin olduğu sonucuna varıldı.

Kök yaş ağırlığına bakıldığında kontrol grubu kökleri 1,72 g olarak tartılırken diğer parametrelerin yaş ağırlıkları 2,4-4,14 katı daha fazla oldukları gözlemlendi. Su içeriği en az 2 kat Pb200'de ve en fazla 4 katı MP7B+Pb200 birlikteliğinde gözlemlendi. Bu sonuç bitkiye herhangi bir stres uygulandığında (bakteri ya da metal gibi) kök su tutma kapasitesini arttırdığını göstermektedir. Zira kuru ağırlıkları hesaplandığında en düşük kuru ağırlığın Pb200 mg parametrelerinde 0,425 g olarak belirlendi. Kontrol grubu 0,342 g iken bakteri kontrolünde 0,370 g olarak belirlendi. Başlıca üç grup olduğu, 1. grubun kontrol grubu, 2. grubun Pb100, MP7B ve MP7B+Pb100 birlikteliği ve 3. grubun MP7B+Pb200 ile Pb200 şeklinde gözlemlendi (Tablo 17).

Saksı deneyinde mısır bitkisinin metal varlığındaki genel değişimleri açısından incelendiğinde (Tablo 18, Şekil 28-36); çoklu varyans analizine göre değerlendirilmiş, kontrol grubu ile MP7B ve Pb200 faktörleri arasında 0,05 seviyesinde, diğer faktörler arasında ise 0,01 seviyesinde önemli farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. R kare değerleri (0,93; 0,94;0,91;0,94 ve 0,98) oldukça yüksekti ve kurulan hipotezin geçerliliğinin çok yüksek olduğunu ifade etmektedir. Yani bakteri metal varlığında bitki gelişimine destek sağladığı sonucuna varılmıştır.

Bazı bakteri türlerinin amonyum üretim kapasitesi, aynı zamanda bitki gelişimini arttırmaktadır. Marques vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada 6 bakteri izolatını mısır bitkisi gelişimini teşvik eden özellikler (amonyum üretimi, siderofor, IAA ve ACC de aminaz vb.) açısından incelenmiş ve mısır bitkisinin kök ve gövde gelişimini arttırdığını rapor etmiştir. Bakterilerin bitki gelişmeyi teşvik edici özellikleri ağır metallerin mevcudiyetinde etkilenebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Ramakrishna vd. (2011)'nin yaptığı çalışmada, kurşun varlığında bakterilerin IAA üretimi ve fosfat çözünürlüğü

yeteneklerinin önemli düzeyde ($P<0,05$) azaldığını bildirmektedir. Ağır metal bakteri etkileşimi rizoremidasyon için önemlidir.

Bakteriler tarafından bitki hormon sentezi ve fosfat çözünürlüğü, bitki büyümesini teşvik eder ve bu nedenle total metal alımını artıran bir özellik olduğu bildirilmektedir (Dell'Amico, 2008). Ahmad vd. (2008) *Azotobacter* ve *Pseudomonas* cinslerinde IAA düzeyini 2,13 ve 3,6 mg/L olarak, Graveletal (2007), *P. putida* ve *Trichoderma atroviride* türlerinde 3,3 ve 6,2 mg/L olarak rapor etmişlerdir. Rizobakterler tarafından düşük seviyede IAA üretimi başlıca kök uzamasına etki etmektedir. Rizobakterlerin düşük seviyede ürettiği IAA birincil kök uzamasını uyarmaktayken, yüksek seviyede üretimi ise lateral köklerin artmasına ve kök şekillenmesine neden olur, fakat pirimer kök gelişimini engellediği bildirilmektedir (Xie vd., 1996).

Çalışmamızda genel olarak tüm verilere bakıldığında; kurşun 200 mM seviyelerine çıktığında gelişme parametrelerinin düştüğü, dolayısıyla mısır bitkisi için toksik seviyelerin 200 mM ve üzeri konsantrasyonların olduğu söylenebilir. Bu gözlemler mısırın görsel olarak incelenmesinde de çok az da olsa 200 mM da daha fazla sararmaların olması şeklinde izlendi (Şekil 35). Bakterinin tek başına uygulaması, kontrole göre farkın az olmasına rağmen kurşun 200 mM kontrolüne göre daha iyi olduğu, kurşun–bakteri birlikteliğinde ise bakterinin etkinliği daha bariz ortaya çıktığı gözlemlendi. Dolayısıyla bakterinin tek başına varlığında, bitki gelişimine olumlu etki etmekle birlikte bu olumlu etkinlik metal stresinde daha da yüksek seviyelerde gözlenmektedir (Şekil 36). Kurşun uygulaması yapılan örneklerde kök uzunluğunun arttığı ancak saçaklanma sayısında ise azalmanın olduğu tespit edildi (Şekil 30).

Lamhamdi vd. (2011) buğday çimlenmesi üzerine kurşunun etkinliğini belirlemek için yaptığı çalışmada, tohumda kurşun absorpsiyonu ölçülmüş, 1,5 ile 3 mM konsantrasyonlarında absorpsiyonun önemli ölçüde ($p<0,01$) arttığı bildirilmiştir. Çimlenme başarısı üzerine etkisine bakıldığında kontrol grubunda % 98, 3 mM'da ise % 71 olduğu ayrıca çimlenme yüzdesinin Pb dozuna oranla azaldığı bildirilmektedir. Benzer şekilde bitki biyomasında, kök ve yaprak gelişiminde 1,5 ile 3 mM konsantrasyonların oldukça etkili olduğu ve gelişimini engellediği bildirilmektedir.

Kurşun en bol ve yaygın dağılımı olan toksik elementlerden biridir. Bu element bitki gelişiminde, enzim faaliyetlerinin engellenmesi, su, zar geçirgenliği ve mineral besinlerin dağılımlarındaki dengesizlik gibi değişiklikler nedeniyle, bitkilerin morfolojisi, büyümesi ve fotosentez süreçleri üzerinde ciddi olumsuz etkileri gözlenmektedir (Singh, vd., 1997; Sharma ve Dubey, 2005). Kurşun alımı ile ilgili çalışmalarda, buğday fidelerinin kurşun alımı, ortamdaki kurşun konsantrasyon arttıkça arttığı göstermiştir. Kurşun plazma membranı katyon kanalları ile özellikle de Ca^{+2} kanallarıyla ortamdaki kök hücrelerine doğru taşındığı bildirilmektedir (Seregin ve Kozhevnikova, 2008).

Çalışmamızda da mevcut sonuçlar, kurşun ile kontamine edilen mısır tohumlarında kurşunun toksik seviyelere ulaştığı ve kurşun birikerek mısırın gelişmesini engellediğini göstermektedir. Embriyoya nüfuz eden kurşun imbibisyonun son aşamasında çimlenmesini geciktirmektedir (Wierzbicka ve Obidzinska, 1998). Yapılan bir başka çalışmada da kurşun yüksek konsantrasyonları pirinç fidelerinin çimlenme başarısında bir düşüşe neden olduğu ve gelişmesini azalttığı gösterilmiştir (Mesmar ve Jaber, 1991). Yine yapılan çalışmalarda benzer şekilde kurşun konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan kurşun stresine cevaben biyoküttele önemli bir azalmanın meydana geldiği rapor edilmiştir (Saradhi, 1991; Mesmar ve Jaber, 1991; Rabey ve Zayed, 2005).

Mısır köklerin uzaması kurşun varlığı etkisine karşı çok hassas olduğu belirlendi. Bu parametre, kök hücrelerinin kurşun ile doğrudan temas halinde bulunmasından dolayı koleptil uzunluğu daha duyarlı bir parametre olmaktadır. Lamhamdi vd. (2011) çalışmasında da, çalışmamıza benzer şekilde 1,5 mM kurşun varlığında koleptil uzunluğu % 60'dan fazla azaldığı bildirilmektedir. Bazı çalışmacılar kök gelişimi engellendiği, hücresel membranların istikrarsızlaştırmanın varlığını, mikrotübül hasarını ve kök uçlarında hücre bölünmelerinde mitotik anormalliklerin varlığını bildirmektedir (Seregin ve Kozhevnikova, 2008).

Jiang vd. (2008), *Burkholderia* sp. J62 suşu ile üç bitkide (hint hardalı, mısır ve domates) yaptıkları bir çalışmada hint hardalının gelişimini bir miktar engellediğini, mısır ve domates bitkisinin gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Kurşun bakteri birlikteliğinde ise hint hardalında kök gelişimini arttırırken gövde gelişimini azalttığı,

ancak mısır ve domateste tüm parametreleri arttırdığı belirlenmiştir. Bu verilere bakıldığında MP7B'nin de mısır bitkisinde bakteri varlığında gelişimi azaltmış olmasına rağmen başka bir bitki kullanıldığında artırabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla bakterinin konak özgünlüğünü seçiyor olduğu sonucuna varılmaktadır.

Nithya vd. (2011), sedimentten izole ettikleri 46 suştan 24'ü, kurşun dâhil olmak üzere bir dizi ağır metale dirençli olduklarını bildirmişlerdir. *Bacillus pumilus* (S8-10) güçlü metal adsorbsiyon yeteneğine sahip olduğu ve kurşun adsorbsiyonu % 96,20 olarak bildirmiş olup toksik metallerin biyoremediasyonu için önerilmektedir. Bakteriler, antibiyotik ya da antibiyotik benzeri maddeler üreterek toprakta dolaylı olarak patojenleri engelleyerek (i) ve doğrudan besin ve su alımını artırarak (ii) bitkilerin gelişimini teşvik ettikleri ve böylece bitki biyokütlesini arttırdığı bildirilmektedir (Belimov vd., 2004).

Bakteriler, siderofor, bazı özel enzimler ve çözünebilir fosfor içeren organik asitler üreterek ve de atmosferik azotu fikse ederek, metal toksisitesine karşı bitkileri dayanma yeteneklerine yardımcı olabildikleri bildirilmektedir (Klopper, 2003). Borgmann (2000), *Kluyvera ascorbata* SUD165 suşunun ACC deaminaz enzim üretimi yoluyla *Brassica juncea* ve *Brassica campestris* bitkilerini Ni, Pb ve Zn toksisitesine karşı korunabildikleri bildirilmiştir. Bitki gelişimini teşvik eden rizoid bakteriler, IAA sentezini uyararak *Brassica* kök uzamasını arttırdığını bildirmiştir (Sheng ve Xia, 2006).

Aşılansız veya aşılansız olsun, bitki kök sistemlerinde metallerin birikiminin sürgünlerden daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu öncelikle ağır metallerin köklerden sürgünlere translokasyonlarının zayıf olmasından dolayıdır (Rajkumar vd., 2006).

Çalışmada uygulanan varyans analizine göre yaprak veri grupları arasında $p < 0,05$ (sig.0,036) düzeyinde anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi. Yaprakta en yüksek kurşun adsorbsiyonunun 200 mg kurşun varlığında olduğu, en düşük adsorbsiyon ise bakteri grubunda belirlendiği ve bakteri varlığında kontrolden daha az kurşun içerdiği gözlemlendi. Yapraktaki kurşun miktarının kontrol gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı, bakteri ile kurşun beraber verildiğinde ise % 50'ye yakın bir

azalma olduğu gözlendi (Tablo 20, Şekil 37). Bakteri varlığında yaprakta kurşun birikiminin genel olarak azaldığı gözlendi. Bu sonuç MP7B suşunun mısır bitkisinde kurşun alımını azalttığı veya kurşunu kendi içinde absorbe ettiğini düşündürmektedir.

Bu durum bitkide kurşun konsantrasyonu arttıkça yaprakta birikimde artmakta olduğunu bakteri varlığında ise birikimin yarı yarıya azaldığını göstermektedir. Bu azalmanın sebebi büyük olasılıkla, MP7B bakterisinin varlığında kurşun bakteri tarafından tutulmakta olup yaprağa iletimini engellemekte ve yaprakların sağlıklı bir şekilde gelişmesi sağlamaktadır.

Kurşunun 100 mg verildiği gruba bakıldığında yaprakta kurşun içeriği arttığı, 200 mg kurşun ortamında ise yapraktaki kurşun miktarının daha da yükseldiği gözlendi. Bakteri varlığında ise bu durum tersi yönde ilişki göstermiş olup kurşun absorpsiyonunu arttırdığı gözlendi (Tablo 20, Şekil 37).

Çalışmada kullanılan kurşunlu ve kurşunsuz besiyeri ortamlarında MP7B suşunun kültürü yapıldığında; kontrol grupda besiyerinin içinde bulunan minimal miktarda kurşun varlığından dolayı hem sıvı hem de pellette kurşun miktarı düşük olarak gözlenmiştir. *Bacillus thuringiensis* MP7B suşunun besi ortamındaki kurşunu kullanmak amacıyla bünyesine almış olacağından dolayı pellette doğal olarak kurşun miktarı daha yüksek olarak belirlenmiştir (Tablo 23, Şekil 40).

Besiyeri ortamına 3 mM kurşun ilave edildiğinde sıvı ortamındaki kurşun miktarı ile pelletin kurşun miktarı arasında doğru orantılı olarak kurşun artışı gözlenmektedir. Bu sonuç bakterinin ortamdaki kurşun konsantrasyonunun artmasıyla Pb bağlama ya da absorblama kapasitesinin de önemli ölçüde arttığını göstermektedir (Tablo 24, Şekil 40).

Sıvı kültürde kalan kurşun miktarı incelendiğinde ise Tukey testine göre bakteri Pb'siz pH 7.0 grubu ile bütün gruplar arasında kendi içinde anlamlı bir farklılık oluşturduğu gözlendi ($p < 0,01$). Besiyerinde ki Pb miktarı bakteri varlığında pH 6.0 ve 7.0'de kontrollerine göre azalttığı, bu azalan miktarın bakteri pelletinde kaldığı gözlenmiştir (Tablo 24, Şekil 41). Bakterinin katı ortamda metali absorblama deneyine

bakıldığında varyans analizine göre tüm gruplar arasında $p < 0,001$ (sig.0,000) düzeyinde anlamlı bir farklılık gözlemlendi.

Braud vd. (2006), göre *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* aşılması, toprağın değişebilir fraksiyonundaki Pb içeriğinin % 113 artış ile sonuçlandığını bildirmiştir. Bununla birlikte, Pb konsantrasyonu, serbest Mn oksitler, organik madde ve artık fraksiyonunda sabit kalmış rezidüle bağlıdır. Bir çok yazarlar tarafından bildirildiği üzere, bir topraktaki kullanılabilir metal içeriği, toplamdaki total metal içeriğinin % 1'den az bir kısımdır (Whiting vd., 2001; Braud vd., 2006).

Bitki tarafından elementlerin emilim derecesi, bitki doğası, kirleticinin kimyasalın yapısı, toprağın pH'sı ve elementlerinin konsantrasyonuna ve de diğer metaller ile etkileşimine bağlıdır (Zurera Cosano vd., 1989). Toprakta, çevrede ve suda biriken, gübre, kanalizasyon orjinli kirleticiler ile toksik metaller canlılar için ciddi endişe kaynağıdır. Ağır metaller nörotoksik, teratojenik, mutajen ve hatta çok düşük konsantrasyonlarda kanserojen etkilere sahip olduğu bir çok çalışmalarda bildirilmiştir (Waalkes vd., 1994; Al Saleh vd., 1996).

Mikroplar ve bitki kökleri (rizosfer) arasındaki ara yüz, hem besin alınımı artışı hem de metal toksisitesinin azalması üzerine büyük bir etkinliğe sahip olabilecekleri bildirilmektedir (Smith, 1994). Mikroorganizmalar tarafından bitkilerde ağır metal toksisitesinin iyileştirilmesinde me olabilir bitkiler tarafından metal alımının azaltılması (Vivas vd., 2006) ya da alımı üzerine herhangi bir etkisi olmaksızın ağır metallerin neden olduğu zarar verici etilen stres miktarının azaltılması yoluyla olabildiği bildirilmektedir (Burd vd., 1998; Rajkumar vd., 2006).

Yapmış olduğumuz çalışma sonucuna özetle bakıldığında, toprakta bulunan birçok mikroorganizmanın toprak yapısının gelişimine katkı sağladığı, metalleri absorbladığı veya daha az toksik forma soktuğu, bitki gelişimini desteklediği sonucunu bir kez daha doğrulamıştır. İncelenen suşların her birinin belli başlı özelliklere sahip oldukları, ihtiyaç duyulduğunda bu özelliklerin kullanılabileceği ve çevre dostu biyopreparatları oluşturabileceği gözlenmiştir.

İncelenen suşlardan MP7B'nin test edilen parametrelerden pek çoğunda olumlu sonuç alınmış olup, potansiyel biyopreparat ajanı olduğu, diğer suşlarında buna yakın özellikleri taşıdığı sonucuna varılmıştır. Bu suşların özellikle kendi ekosistemlerinde biyopreparat olarak kullanımları ekolojik açıdan da ayrı bir önem taşımaktadır. Ülke ekonomisi açısından ise diğer bir önem arz eden husus olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle son 5 yıldır Doğu Karadeniz'de çay tarımının organik üretime dönüştürme çabalarına bir nebze katkı sağlayacağı, biyolojik preparat oluşturma çalışmalarına destek oluşturacağı düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Çalışmada 34 adet rizoid bakteri araştırılmış, geleneksel yöntemlerle fiziksel ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. 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. Bu metallere karşı etkinlikleri de test edilmelidir.

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 kurşun varlığında test edilmiş olup diğer ağır metallerin de varlığında bu çalışmaların laboratuvar şartlarında test edilmesi gerekmektedir.

Bakterilerden sadece MP7B suşu kurşun varlığında mısır gelişimine olan etkinliği test edilmiştir. Oysaki ön çalışmalarda bu suş kada hatta daha iyi olan suşların bulunduğu ve bu suşların da aynı testlere tabi tutulup etkinliklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bitki bakteri ve kurşun birlikteliği çalımları laboratuvar şartlarında test edilmiştir. Bilindiği üzere in vitro ve in vivo çalımların 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 olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E., 1992.** Ethylene in Plant Biology. Academic Press, ISBN: 978-0-12-041451-2, 414 s., 330-342.
- 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, 4, 372-383.
- Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M. and Umar, S., 2008.** Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. International Journal of Plant Production, 2, 353-366.
- Aksu, E. and Yıldız, N., 2004.** Heavy metal stress and tolerance of plants. International soil congress on natural resource management for sustainable development, Erzurum, 7-10 Haziran 2004, 143.
- 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, 7, 131-137.
- Allan, R., 1997.** Introduction: Mining and metals in the environment. Journal of Geochemical Exploration, 58, 95-100.
- Arunakumara, K.K.I.U., Walpola, B.C. and Yoon, M.H., 2013.** Agricultural methods for toxicity alleviation in metal contaminated soils. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer, 6, 73-80.
- Aslantas, R., Çakmakçı, R. and Şahin, F., 2007.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. Scientia Horticulturae, 111, 371-377.
- Aydoğın, M.N., Algur, Ö.M. and Özdemir, M., 2013.** Isolation and Characterisation of Some Bacteria and Microfungus Solving Tricalcium Phosphate. Adyutayam, 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, 112 s., 75.
- Ayhan, K., 2000.** Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44.
- Backman, A.C., Bengtsson, M. and Witzgall, P., 1997.** Pheromone release by individual females of codling moth, *Cydia pomonella*. Journal of Chemical Ecology, 23, 807-815.

- Backman, O.C., 1997.** Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: Perspectives for future agriculture. *Plant Soil*, 194, 11-14.
- Bais, H.P. et al., 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Bakker, A.J.M., 1987.** Metal tolerance. *New Phytologist*, 106, 93-111.
- Bakker, A.J.M. and Brooks, R.R., 1989.** Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements-A Review of Their Distribution Ecology and Phytochemistry. *Bio-Recovery*, 1, 81-126. DOI: 11-2011-011001-1-22.
- Barbieri, P., Baggio, C., Bazzicalupo, M., Galli, E., Zanetti, G. and Nuti, M.P., 1991.** *Azospirillum*-Gramineae interaction: effect of indole-3-acetic acid. In *Developments in Plant and Soil Sciences; Nitrogen Fixation*. Polsinelly, M., Materassi R. and Vincenzini, M., (Eds), 48, 161-168.
- Baker, A.J. and Walker, P.I., 1990.** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, In: *Heavy metal tolerance in plants evolutionary aspects* Shaw A.J. (Ed.). CRC Press Online, 155-178.
- Bashan, Y., Holguin, G. and E., D.B.L., 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 521-577.
- Beckie, H.J., Schlechte, D., Moulin, A.P., Gleddie, S.C. and Pulkinen, D.A., 1998.** Response of alfalfa to inoculation with *Penicillium bilaii* (Provide). *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 91-102.
- Belimov, A.A., Kojemiakov, P.A. and Chuvarliyeva, C.V., 1995.** Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil*, 173, 29-37.
- Belimov, A.A., Hontzas, N., Safronovaa, V.I., Demchinskayaa, S.V., Piluzzac, G., Bullittac, S. and Glick, B.R., 2004.** Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.), Elsevier, 37, 241–250, DOI:10.1016/j.soilbio.2004.07.033
- 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. *Journal of Basic Microbiology*, 47,468-473.
- Berkeley, R.C.V. and Logan, N., 1997.** *Bacillus*, *Alicyclobacillus* and *Paenibacillus*. In: Emmerson, A.M., Hawkey, P.M., Gillespie, S.H. (eds). *Principles and practice of Clinical Bacteriology*, 185.
- Bilgehan, H., 2004.** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 4. Baskı, ISBN: 9789756751046, 777 s., 256-287.

- Bonwart, G.J., 1989.** Basic Food Microbiology. Springer, 2nd ed., ISBN: 1468464558773, 774 s., 526.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S. and Lebeau, T., 2009.** Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr, Hg and Pb contaminated soil by bioaugmentation with siderophoreproducing bacteria. *Chemosphere*, 74, 280-286.
- Breckle, S.W., 1991.** Growth under stress. Heavy metals. In: Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds), *PlantRoots: The Hidden Half*, Marcel Dekker Inc., 351-373.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974.** Bergeys manual of determinative bacteriology. The Williams Company, 8. ed., ISBN: 978-0683006032, 787.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R., 1998.** A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in plant seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3663-3668.
- Burdman, S., Jurkevitch, E. and Okon, Y., 2000.** Recent advances the use of plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In *Microbiol Interactions in Agriculture and Forestry*. Pub. Inc. UK, Subba, R.N., Dommergues, Y.R. (eds), 2(10), 29-250.
- Burton, K.W., Morgan, E. and Roig, A., 1984.** The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forests II green house experiments. *Plant Soil*, 78, 271-282.
- Caceres, E.A.R., Anta, G.G., Lopez, J.R., DiCiocco, C.A., Basurco, J.P. and Parade, J.L., 1996.** Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. *Arid Soil Res Rehabil*, 10, 13-20.
- Carlisle, G.E. and Falkinham, J.O., 1989.** Enzyme Activities and Antibiotic Susceptibility of Colonial Variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 3026-3028. DOI:0099-2240/89/113026-03
- Cassán, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V. and Ruiz, O., 2009.** Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45, 12-19. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2008.08.003
- Chaney, R.L., Angle, J.S., McIntosh, M.S., Reeves, R.D., Li, Y.M., Brewer, E.P., Chen, K.Y., Roseberg, R.J., Perner, H. and Synkowski, E.C., 2005.** Using Hyperaccumulator Plants to Phytoextract Soil Ni and Cd. *Zeitschrift Naturforschung*, 60, 190-198.
- Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M.P., 1996.** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil*, 184, 311-321.

- Chen, P. and Ting, Y.P., 1995.** Effect of heavy metal uptake on the electrokinetic properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 171,107-12.
- Chen, H. and Cutright, T., 2003.** Preliminary Evaluation of Microbially Mediated Precipitation of Cadmium, Chromium, and Nickel by *Rhizosphere consortium*. *Journal of Environmental Engineering*, 129, 4-9.
- Chen, Y.X., Wang, Y.P., Lin, Q. and Luo, Y.M., 2005.** Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. *Environment International*, 31, 861-866.
- Chihomvu, P., Stegmann, P. and Pillay, M., 2014.** Identification and Characterization of Heavy Metal Resistant Bacteria from the Klip. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8, 1130-1140.
- Compant, S. Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E.A., 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4951-4959.
- 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., ISBN: 0-397-51529-4, 651-688 p., 1295-1395.
- Çabuk, A., Akar, T., Tunali, S. and Tabak, O., 2006.** Biosorption characteristics of *Bacillus* sp. ATS-2 immobilized in silica gel for removal of Pb(II). *Journal of Hazardous Materials*, 136, 317-323.
- Çakmakçı, R., Kantar, F. and Algur, Ö.F., 1999.** Sugar beet and barley yield in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162, 437-442.
- Çakmakçı, R., Kantar, F. and Şahin, F., 2001.** Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 527-531.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A. and 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.
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F. and Erdoğan, Ü., 2007.** The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 189-199.
- Çepel, N., 1997.** *Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar*. TEMA Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayınları, ISBN: 9789757169031, 111 s., 234.

- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y., 1997.** Gıda Mikrobiyolojisi Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları. Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi, No: 007, 124.
- Dash, H.R., Mangwani, N. and Das, S., 2013.** Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. Environmental Science and Pollution Research, 21, 2642-2653. DOI: 10.1007/s11356-013-2206-8
- 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 and Fertility of Soils, 24, 358-364.
- De Freitas, J.R., 2000.** Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var Norstar) inoculated with rhizobacteria. Pedobiologia, 44, 97-104.
- Dell'Amico, E., Cavalca, L. and Andreoni, V., 2008.** Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Soil Biology-Biochemistry, 40, 74-84.
- Dimkpa, C.O. Merten, D., Svatos, A., Büchel, G. and Kothe, E., 2009.** Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. Journal of Applied Microbiology, 107, 1687-1696. DOI: 10.1111/j.1365-2672
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Büchel, G. and Kothe, E. 2009.** Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. Soil Biology-Biochemistry, 41, 154-162.
- Dimkpa, C., Svatos, A., Merten, D., Büchel, G. and Kothe, E., 2008.** Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. Canadian Journal of Microbiology, 54, 163-172.
- Diels, L., Spaans, P.H., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Wouters, H., Walter, E., Winters, J., Macaskie, L.E., Finlay, J., Pernfuss, B. and Pumpel, T., 2003.** Heavy metals removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. Hydrometallurgy, 71, 235-241.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J and Okon, Y., 2003.** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit Rev Plant Sci, 22, 107-149.
- Doğan, M. ve Çolak, U., 2009.** *Triticum aestivum* L. cv. Tosunbey'e uygulanan kurşunun bazı fizyolojik özelliklere etkisi. Ekoloji dergisi, 19, 73, 98-104.
- Doğan, M., Demirörs Saygıdeğer, S. and Çolak, U., 2009.** Effect of lead toxicity on aquatic macrophyte *Elodea canadensis* Michx. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83, 249-254.

- Döbereiner, J., 1997.** Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology-Biochemistry*, 29, 771-774.
- Dökmeci, İ. ve Dökmeci A., 2005.** Toksikoloji zehirlendirmede tanı ve tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 4. Baskı, ISBN : 9789754204322, 547 s., 416.
- Donmez G and Aksu Z., 2001.** Bioaccumulation of copper(II) and nickel(II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* spp. *Water Research*, 35, 1425-34.
- Drepper, T., Raabe, K., Giaourakis, D., Gendrullis, M., Masepohl, B. and Klipp, W., 2002.** The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen via regulation of nif A and anf A expression. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 215, 221-227.
- Dürüst, N., Dürüst, Y., Tuğrul, D. and Zengin, M., 2004.** Heavy Metal Contents of *Pinus Radiata* Trees of İzmit (Turkey). *Asian Journal of Chemistry*, 16, 1129-1134.
- Dworken, M. and Foster, J., 1958.** Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75, 592-601.
- Ediz, N. ve Beyatlı, Y., 2005.** *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3, 1-22.
- Elbadry, M., Gamal Eldin, H. and Elbanna, K., 1999.** Effects of *Rhodobacter capsulatus* inoculation in combination with graded levels of nitrogen fertilizer on growth and yield of rice in pots and lysimeter experiments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 393-395.
- Elsilk, S, El-shanshoury, A and Ateya, S., 2014.** Accumulation of some heavy metals by metal resistant avirulent *Bacillus anthracis* PS2010 isolat from Egypt. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 1266-1276. DOI: 10.5897/AJMR2013.6551
- Farago, M.E. and Müllen, W.A., 1979.** Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-prolinecomplex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorganica Chimica Acta*, 32, 93-94.
- Francis, I., Holsters, M., and Vereecke, D., 2010.** The grampositive side of plant microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 1, 1-12.
- Fravel, D.R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359.
- 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, 149-155.

- Garbisu, C., Gonzalez, S., Yang, W.H., Yee, B.C., Carlson, D.L., Yee, A., Smith, N.R., Otero, R., Buchanan, B.B. and Leighton, T., 1995.** Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*. *BioFactors*, 5, 29-37.
- Gilis, A., Corbisier, P., Baeyens, W., Taghavi, S., Mergeay, M. and Van der Lelie, D., 1998.** Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 61-68.
- Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999.** *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, ISBN: 978-1860941528, 249.
- 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.2005.7
- Gül, K., 2013.** Kurşun (Pb) ile kirlenmiş topraklarda ayçiçeği ve mısırın fitoekstraksiyonu üzerine EDTA ve DTPA'nın etkileri. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26, 109-113.
- Ghani, A., 2010.** Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Iranian Journal of Toxicology*, 3, 325-334.
- Ghosh, A., Singh, A., Ramteke, P.W. and Singh, V.P., 2000.** Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27, 6-11.
- Groudev, S.N., Spasova, I.I. and Georgiev, P.S., 2001.** In situ bioremediation of soils contaminated with radioactive elements and toxic heavy metals. *International Journal of Mineral Processing*, 62, 301-308.
- Gupta, A., Phung, L.T., Chakravarty, L. and Silver, S., 1999.** Mercury resistance in *Bacillus cereus* RC607: transcriptional organization and two new open reading frames. *Journal Bacteriology*, 181, 6-7080.
- Gupta, K., Chatterjee, C. and Gupta, B., 2012.** Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India *Biologia*, 67/5, 827-836. DOI: 10.2478/s11756-012-0099-5
- Hafez, M.B., 2002.** Accumulation of some metal ions on *Bacillus licheniformis*. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 2, 249-252.
- Handlesman, J. and Staab, E., 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell Reports*, 8, 1855-1869.

- Haferburg, G. and Kothe, E., 2007.** Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 453-467.
- He, C.Q., Tan, G.E., Liang, X., Du, W., Chen, Y.L., Zhi, G.Y. and Zhu, Y., 2010.** Effect of Zn-tolerant bacterial strains on growth and Zn accumulation in *Orychophragmus violaceus*. *Applied Soil Ecology*, 44, 1-5.
- Hecht Buchholz, C., 1998.** The apoplast habitat of endophytic dinitrogen fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonlegumious plants. *Z. Pflanzenernähr Bodenk*, 161, 509-520.
- Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N. and Delcour, J., 1994.** Use of expression secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for α -amilase and Levanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1401-1403.
- Howard, H., 2001.** Heavy Metal Poisoning Chapter 395 Harrison's Principles of Internal Medicine. By The McGraw-Hill Companies, 15th Edition.
- Hussen, E., 2003.** Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro) Indonesian. *Journal of Agricultural Science*, 4, 27-31.
- Ito, S., 1997.** Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus* Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, 1, 61-66.
- Jackson, M.L., 1967.** Soil chemical analysis. Prentice Hall, 498.
- Jacobsen, B.J., 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.
- Jain, D.K. and Patriquin, D.G., 1985.** Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hair. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 206-210.
- Jalal, M.A.F. and Van der Helm, D., 1991.** Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. In *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates* Winkelmann, CRC Press, G., (ed.), 235-269.
- Jankiewicz, B., Ptaszyński, B. and Türek, A., 1999.** Spectrophotometric Determination Of Copper (II). In *Samples Of Soil From Selected Allotment Gardens In Lodz*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 8, 35.
- Jiang, C.Y., Sheng, X.F., Qian, M. and Wang, Q., 2008.** Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. Elsevier, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.02.006

- Johansson, J.F., Paul, L.R. and Finlay, R.D., 2004.** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 1-13.
- Johnson, M.S. and Eaton, J.W., 1980.** Environmental contamination through residual trace metal dispersal from a derelict lead-zinc mine. *Journal of Environmental Quality*, 9, 175-179.
- Kacar, B., 2012.** Bitki, toprak ve gübre analizleri, Nobel Kitap, ISBN: 9786051332802, 423 s., 224-227.
- Kacar, B., Katkat, V. ve Öztürk, Ş., 2013.** Bitki fizyolojisi. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayınları, ISBN: 9789755918334, 570 s., 432.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., 2004.** Metallerin çevresel etkileri-I. *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
- Kandler, O. and Weiss, N., 1986.** Regular, nonsporing gram positive rods, in: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.(Eds.), *Bergey & Wilkins, Baltimore, 1986, pp.'s Manual of Systematic Bacteriology, Williams.*
- Kayın, E., 2001.** Bazı atasal ve muhtemel mutant bakterilerin termobiyoplastik (PHB) üretimlerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 96 s., 43.
- Kayser, G., Korckritz, T. and Markert, B., 2001.** Bioleaching for the decontamination of heavy metals. *Wasser Boden*, 53, 54-58.
- Khan, M.R., Talukdar, N.C. and Thakuria, D., 2003.** Detection of *Azospirillum* and PSB in rice rhizosphere soil by protein and antibiotic resistance profile and their effect on grain yield of rice. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 246-250.
- Khan, M.S., Zaidi, A. and Wani, P.A., 2007.** Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 29-43.
- Kiss, T. and Farkas, E., 1998.** Metal-binding ability of desferrioxamine B. *J. Inclusion Phenom. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 32, 385-403.
- Klaassen, C.D., 2009.** Ağır metaller ve ağır metal antagonistleri. Nobel tıp yayınları, Süzer, Ö. (Ç. Ed.), *Tedavinin Farmakolojik Temeli*, 264-280.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, K. and Zablutowicz, R.M., 1989.** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*, 7, 39-43.
- Kloepper, J.W., 2003.** A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. In: *Sixth international PGPR Workshop, Calicut*, 81-92.

- Kolb, W. and Martin, P., 1985.** Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology, 215-221. Edited by W. Klingmüller.
- Korentajar, L., 1991.** A review of the agricultural use of sewage sludge. Benefits and potential hazards. *Water SA*, 17, 189-196.
- Krewulak, K.D. and Vogel, H.J., 2008.** Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781-1804.
- Kuc, J., 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 7-12.
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Strauss, J. and Rivelli, A.M., 2010.** Sessitsch A. Bacteria associated with Zn and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1471-1484.
- Lacey, L.A. and Undeen, A.H., 1986.** Microbial control of black flies and mosquitoes, *Annual Review of Entomology*, 31, 265-296.
- Lane, S.D. and Martin, E.S., 1977.** A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytologist*, 79, 281-286.
- Lambert, B. and Perferoen, M., 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience*, 42, 112.
- Lebeau, T., Braud, A. and Jézéquel, K., 2008.** Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153, 497-522.
- Leisinger, K.M., 1999.** Biotechnology and food security. *Current Science*, 76, 488-500.
- Li P, Zeng GM, Xu WH, Zhang C and Jiang M., 2010.** Effects of organic acids on zinc and lead leaching from contaminated sediments. *China Environmental Science*, 30, 1235-1240
- Lidon, F.C. and Henriques, F.S., 1991.** Limiting Step on Photosynthesis of Rice Plants Treated With Varying Copper Levels. *Journal of Plant Physiology*, 138, 115-118.
- Lidon, F.C., Ramalho, J. and Henriques, F.S., 1993.** Copper Inhibition of Rice Photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 142,12-17.
- Lin, S., 1997.** Identification of Contamination Sources of *B. cereus* in Pasteurized Milk. Master Thesis. Faculty of Graduate Studies of University of Guelph, Canada, 109.

- Logan, N.A. and Turnbull, P.C.B., 1999.** *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 357.
- Lobartini, J.C., Orioli, G.A. and Tan, K.H., 1997.** Characteristics of soil humic acid fractions separated by ultrafiltration. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 28, 787-796.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.R., 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 86, 1-25.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P., 1997.** Brock's Biology of Microorganisms. Benjamin Cummings, 8 th, 978-0132192262, 1088 s., 857-864.
- Marques, A.P.G.C., Oliveira, R.S., Rangel, A.O.S.S. and Castro, P.M.L., 2006.** Zinc accumulation in *Solanum nigrum* is enhanced by different arbuscular mycorrhizal fungi. Chemosphere, 65, 1256-1265. DOI: 10.1080/10643380701798272.
- Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L., 2010.** Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. Soil Biology-Biochemistry, 42, 1229-1235. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.04.014
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö. and Mengel, K., 2000.** The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biology and Fertility of Soils, 30, 433-439.
- Mawadza, C., Kaul, R.H., Zvauya, R. and Mattiason, B., 2000.** Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology, 83, 177-187.
- McLaughlin, M.J., Parker, D.R. and Clark, J.M., 1999.** Metals and micronutrient food safety issues. Field Crops Research, 60, 143-63.
- McGrath, S.P. and Zhao, F.J., 2003.** Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. Current Opinion in Biotechnology, 14, 227-282. DOI: 10.1080/10643380701798272
- Miethke, M. and Marahiel, M.A., 2007.** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71, 413-451.
- Mignone, C.F. and Avignone Rossa, C., 1996.** Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 78-88.

- Miranda, M.G. and Ilangoan, K., 1996.** Uptake of lead by *Lemna gibba* L. influence on specific growth rate and basic biochemical changes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 1000-1007.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I. and Moragrega, C., 2002.** Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology*, 5, 169-175.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F., 2001.** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Munzuroğlu, Ö. and Geçkil, H., 2002.** Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 203-213.
- Nagalakshmi, B.N., Vallinath, G.V.S. and Chandrasekhar, K.B., 2011.** Derivative spectrophotometric determination of Lead (II) using 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy benzaldehyde isonicotinoyl hydrazone (DMHBIH). *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1, 82-88.
- Nedelkoska, T.V. and Doran, P.M., 2000.** Characteristics of Heavy Metal Uptake by Plants Species with Potential for Phytoremediation and Phytomining. *Minerals Engineering*, 13, 549-561.
- Neilands, J.B., 1983.** Siderophores. In *Advances in Inorganic Biochemistry* Eichhorn, L. and Marzilli, L.G. (eds), Elsevier, ISBN: 978-0387136493, 137-166.
- Neilands, J.B., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26723-26726.
- Neubauer, U., Furrer, G., Kayser, A. and Schulin, R., 2000.** Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 2, 353-368.
- Nies, D.H. and Silver, S., 1995.** Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 186-199.
- Nithya, C., Devi, M.G. and Pandian, S.K., 2011.** A novel compound from marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in Gram positive and Gram negative species. *Biofouling*, 27, 519-528.
- Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C., K, Pharis, R.P. and Hynes, M. F., 1996.** Rhizobium leguminosarum as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 279-283.

- Obroucheva, N.V., Bystrova, E.I., Ivanov, V.B., Anupova, O.V. and Seregin I.V., 1998.** Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant Soil*, 200, 55-61.
- Ouzounidou, G., Eleftheriou, E.P. and Karataglis, S., 1992.** Ecophysical and Ultrastructural Effects of Copper in *Thlaspi ochroleucum*. *Canadian Journal of Botany*, 70, 947-957.
- Ouzounidou, G., 1994.** Root growth and pigment composition in relationship to element up take in *Silene compacta* plants treated with copper. *Journal of Plant Nutrition*, 17, 933-943.
- Öztürk, A., Çağlar, O. and Şahin, F., 2003.** Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166, 1-5.
- Pal, S.S., 1999.** Interaction of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant Soil*, 213, 221-230.
- Pardo, R., Herguedas, 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.
- Porter, A.G., Davidson, E.W. and Liu, J.W., 1993.** Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *FEMS Microbiology Reviews*, 57, 838-861.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B. and Barceló, J., 1989.** Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology*, 90, 1365-1371.
- Pulsawat, W. et al., 2003.** Anions effects on biosorption of Mn(II) by extracellular polymeric substance (EPS) from *Rhizobium etli*. *Biotechnology Letters*, 25, 1267-1270.
- Rai, U.N., Tripathi, R.D. and Vajpayee, P., 2002.** Bioaccumulation of Toxic Metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of *Euryale Ferox* Salisb. *Chemosphere*, 46, 267-272.
- Rajkumar, M., Nagendran, R., Lee, K.J. and Lee, W.H., 2006.** Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁺⁶ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 62, 741-748.
- Rajkumar, M. and Freitas, H., 2008.** Effects of inoculation of plant growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresour Technol*, 99, 3491-3498.
- Rajkumar, M., Noriharu, A.E., Vara Prasad, M.N. and Freitas, H., 2009.** Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 1452-1460. DOI:10.1016/j.tibtech.2009.12.002

- Ranjard, L., Nazaret, S. and Cournoyer, B., 2003.** Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3784-3790.
- Raven, J.A., Evans M.C.W. and Korb, R.E., 1999.** The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂- evolving organisms. *Photosynthesis Research*, 60, 111-49.
- Reeves, R.D. and Baker, A.J.M., 1999.** Metalaccumulating plants. In *Phytoremediation of toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, I Raskin, I. And Ensley, B.D. (eds), 193-229, John Wiley&Sons Inc.
- Rether, A., 2002.** Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. Doktora Tezi, Mühim Teknik Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühim, Almanya, 137 s., 115-117.
- Richardson, A.E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28, 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
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I. and Chambliss, G.H., 1998.** *Bacillus*, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology. Ninth Edition, Vol. 2, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Pres, New York, 1152-1162.
- Rothballer, M., Schmid, M. and Hartmann, A., 2003.** In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis*, 34, 261-279.
- Saber, M.S.M., 2001.** Clean Biotechnology for sustainable farming. *Engineering in Life Sciences*, 1, 217-223.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seregin, I. and Kozhevnikova, A., 2008.** Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 1-22.
- Schallmeyer, 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.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.

- Schilling, G., Gransee, A., Deubel, A., Ležovič, G. and Ruppel, S., 1998.** Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd*, 161, 465-478.
- Sharma, P. and Dubey, R.S., 2005.** Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35-52.
- Sharmila, P. and Pardha Saradhi, P., 2002.** Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy. In: Prasad M.N.V. and Strazlka, K. (eds) *physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, Kluwer, Dordrecht, 179-199.
- Sheng, X.F. and Xia, J.J., 2006.** Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64, 1036-1042.
- 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*, Springer-Science-Business Media LLC, 3rd ed., 4, 530-654.
- Sienko, R.A., 1983.** Temel Kimya (Chemistry: Principles and Properties). Savaş Yayınları, Gündüz, N., Gündüz, T., Tüzün, C., Pulat, E., Üneri, S., Zeren, A., Özgüner, S. (Ç.Ed.), *Fen Bilimleri Dizisi*, 213 s., 178.
- Singh, R.P., Dabas, S., 1997.** Inhibition in growth and nitrate assimilation in roots and leaves of mung bean (cv Pusa baishakhi) seedlings in presence of heavy metal lead. *Jeevanti*, 15, 1-10.
- Sneath, P.H.A., 1986.** Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, edited by Sneath, P.H.A, Mair, N.S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. William and Wilkins, 1104-1139.
- Steffens, J.D., 1990.** The Heavy Metal-Binding Peptides of Plants. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*, 41, 533-575.
- Stresty, T.V.S. and Madhava Rao, K.V., 1999.** Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 3-13.
- Sukhovitskaya, L. A., 1998.** Survival rates and growth-stimulating effects of *Bacillus megatherium* and *Arobacterium radiobacter* strains introduced into soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34, 81-83.
- Sudha, S.N., Jayakumar, R. and Sekar, V., 1999.** Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Current Microbiology*, 38, 163-167.
- Suh, J.H., Kim, D.S., Yun, J.W. and Song, S.K., 1998.** Process of Pb⁺² accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 20, 153-6.

- Sultan, S. and Hasnain, S., 2006.** Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr(VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 883-888.
- Şahin, F., Çakmakçı, R. and 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.
- Tamil Selvi, A., Anjugam, E., Archana, D., Madhan, R.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 Sciences*, 3, 34-41.
- Taubman, S., 1992.** Genus *Bacillus*. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 355-356.
- Taboada Castro, M.M., Dieguez Villar, A. and Taboada Castro, M.T., 2002.** Effect of Soil Use and Agricultural Practices on Heavy Metal Levels in Surface Waters. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33, 2833-2849.
- Tenover, F.C. and McGowan, J.E., 1996.** Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *The American Journal of the Medical Sciences*, 311, 9-16.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H. and Hubbell, D.H., 1979.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1016-1024
- Tiwari, V.N., Lehri, L.K. and Pathak, A.N., 1989.** Effect of inoculating crops with phospho-microbes. *Experimental Agriculture*, 25, 47-50.
- Torres, M., Goldberg, J. and Jensen, T.E., 1998.** Heavy metal uptake by polyphosphate bodies in living and killed cells of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae). *Microbios Journal*, 96, 141-147.
- Usta, K., Arcak, S. ve Erpul, G., 1995.** Yol kenarındaki topraklarda trafikten kaynaklanan ağır metallerin birikimi. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 19, 423-431.
- Van Assche, F., Ceulemans, R. and Cljters, H., 1980.** Zinc Mediated Effects on Leaf CO₂ Diffusion Conductance and Net Photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynthesis Research*, 1, 171-180.
- Vasil, I.K., 1998.** Biotechnology and Food security for 21st century: A real world perspective, *Nature Biotechnology*, 16, 399-400.
- Velásquez, L. and Dussan, J., 2009.** Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 713-716.

- Verma, S. and Dubey, R.S., 2003.** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
- Weyens, N., Van Der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L. And Vangronsveld, J., 2009.** Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnology*, 27, 591-598.
- Wild, A., 1988.** Plant nutrients in soil: Phosphate in Soil Conditions and Plant Growth. Longman Scientific and Technical, 695-742.
- Wipat, A. and Harwood, C.R., 1999.** The *Bacillus* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 1-9.
- Whiting, S.N., De Souza, M.P. and Terry, N., 2001.** Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environment Science Technolgy*, 15, 3144-3150.
- Wu, Q.T., Deng, J.C., Long, X.X., Morel, J.L., Schwartz, C., 2006.** Selection of appropriate organic additives for enhancing Zn and Cd phytoextraction by hyperaccumulators. *Journal Environment Science*, 18, 1113-1118.
- Xie, H., Pasternack, J.J. and Glick, B.R., 1996.** Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indole acetic acid. *Current Microbiology*, 32, 67-71. DOI: 10.1007/s002849900012.
- Yehuda, R., Teicher, M.H., Trestman, R.L., Levengood, R.A. and Siever, L.J., 1996.** Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis. *Biological Psychiatry*, 40, 79-88.
- Yıldız, N., 2001.** Toprak Kirleticisi Bazı Ağır Metallerin (Zn, Cu, Cd, Pb, Co ve Ni) Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32, 207-213.
- Yıldız, S., 2004,** Konya Ana Tahliye Kanalında Ağır Metal Kirliliğinin ICP - AES Tekniği İle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 20.
- Yılmaz, M., 2003.** Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 138 s., 79-138.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R. and Musarrat, J., 2006.** Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64, 991-997.

- Zemek, J., Augustin, J., Borris, R., Kuniak, L., Svaboa, M. and Pacova, Z., 1981.** Polysaccharide-Hydrolyzing Enzymes in the genus *Bacillus*. Folia Microbiologica, 26, 403-407.
- Zengin, F.K. ve Munzuroğlu, Ö., 2004.** Fasulye Fidelerindeki (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) Sitokinin İçeriği Üzerine Ağır Metallerin (Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ ve Pb⁺⁺) Etkileri. Doğu Anadolu Araştırmaları Dergisi (Research of Eastern Anatolia Region), 2, 48-54.
- 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.academia.edu/2065179/COMPARATIVE_ANALYSIS_FOR_metal_binding_capacity_of_cysteine_by_using_uvvis_spectrophotometer (18.06.2015)

EKLER

EK-1: MP 6A

CGAAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTTTTAAGAAAGTTAGCGGCGGACGGG
AGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACGG
GCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGGGGA
TGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTACGGCTCACCAAGGCAAC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC
TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT
GTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
CCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCT
GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATT
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGTACACCCGAAGTCGGTGGGGTACCTTTT

EK-2: MP 7B

CGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGC
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTGCTAGTT
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATT
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTT
CTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATC
TCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGT
CGGTGGGGTAACTTTTG

ÖZGEÇMİŞ

Emel UZUNALIOĞLU, 28 Mayıs 1990 tarihinde Rize’de doğdu. Ortaöğretim ve lise eğitimini Rize’de tamamladı. 2008 yılında başladığı Rize 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. Uzunalioğlu, E., Yılmaz, Y., Günay, B., Atmaca, B. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2014.** Çeşitli Meyvelerde bozulma Etkeni Mikrofungusların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 1414.
- 2. Uzunalioğlu, E., Yılmaz, Y., Bozdeveci, A., Çelik, A., Şahin, R. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2014.** Çeşitli Meyvelerinden İzole Edilen Maya Mantarlarının Tanımlanması ve Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir/Türkiye, 1504.
- 3. Uzunalioğlu, E., Bozdeveci, A., Çilingir, G., Ayhan, E., Üreyen, Ü.Z. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2014.** Meyvelerden İzole Edilen *Bacillus*’ların Tanımlanması Ve Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 1362.
- 4. Bozdeveci, A., Uzunalioğlu, E., Yılmaz, Y., Üreyen, Ü.Z. ve Alpay Karaoğlu Ş., 2014.** Toprağın Gübreleme Öncesi ve Sonrası Mikroflorası ve Floranın Antimikrobiyal Özellikleri. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 1375.
- 5. Üreyen, Ü.Z., Uzunalioğlu, E., Bozdeveci, A. ve Alpay Karaoğlu, Ş., 2014.** Toprak Kökenli Bakterilerde Metal Toleransı ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Faktörlerin Araştırılması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 1453.
- 6. Yılmaz, Y., Alpay Karaoğlu, Ş., Tosun, G., Bozdeveci, A., Uzunalioğlu, E., Özdemir, T., Terzioğlu, S. ve Yaylı, N., 2014.** Bal Peteklerinden İzole Edilen Sporlu Basillerin Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 1444.
- 7. Alpay Karaoğlu, Ş., Üreyen, Ü.Z., Uzunalioğlu, E., Güzel, Ş., Bozdeveci, A. and Bilgin, A., 2015.** 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), Baku.
- 8. Üreyen, Ü.Z., Yeşilyurt, A.M., Uzunalioğlu, E., Güzel, Ş. and Alpay Karaoğlu, Ş., 2015.** *Bacillus* sp. 5O5Y11 strain ameliorates copper stress induced damages in maize seedlings. 1st Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015), Baku, Azerbaijan, 94.