

**BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİ BAKTERİLERİN
KARAKTERİZASYONU**

Alper DEDE

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz - 2013

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1109F148

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Alper DEDE' nin “*Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakterilerin Karakterizasyonu*” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 19.07.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ	
Üye	: Doç. Dr. Yasemin EVRENESÖĞLU	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİ BAKTERİLERİN KARAKTERİZASYONU

Alper DEDE

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman Prof Dr. Kıymet GÜVEN

2013, 102 sayfa

Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler (PGPB) pek çok bitki türü ile ilişkili olup, çeşitli ortamlarda bulunmaktadır. Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin en çok çalışılan grubu kök yüzeyini ve rizosferi kolonize eden bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) dir. Serbest yaşayan rizobakteriler bitki büyümesini teşvik edici ve bitki hastalık etmenlerini (fitopatojenler) kontrol edici bazı mekanizmalar kullanırlar. PGPR'ler ile biyokontrol için en çok çalışılan mekanizmalar ekolojik bir niş veya substrat için yarışma, inhibe edici kimyasalların üretimi ve çok sayıda patojene karşı konuk bitkide sistemik direnç uyarımıdır. Bu nedenle de biyolojik kontrol tarımda kimyasalların kullanımını azaltan bir alternatif veya yardımcı yol olarak görülmektedir.

Bitkilerle ilişkili bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici ve bitki büyümesini ve sağlığını düzenleyen ajanlar olarak potansiyel kullanımını içeren çok sayıda çalışma vardır. Bu güne kadar yapılan çalışmalar patates, domates, soğan gibi bitkilerin rizosferindeki bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada ise zeytin, ceviz, elma gibi bazı çok yıllık meyve ağaçlarının rizosfer toprağından bakteriler izole edilmiş ve bu bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özellikleri araştırılmıştır. Mikroorganizmaların identifikasyonu için geleneksel biyokimyasal testler yanında, yağ asitleri metil esterlerinin analizi (FAME) testi de kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PGPB, PGPR, Antagonistik Aktivite, FAME

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA CHARACTERIZATION

Alper DEDE

Anadolu University, Graduate School of Sciences

Biology Department

Supervisor: Prof Dr. Kıymet GÜVEN

2013, 102 pages

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are associated with many plant species and are commonly present in many environments. The most widely studied group of PGPB are plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) which colonizes the root surfaces and the rhizosphere. Free-living rhizobacteria use some of the mechanisms to promote plant growth and control phytopathogens. The widely recognized mechanisms of biocontrol mediated by PGPB are competition for an ecological niche or a substrate, production of inhibitory chemicals, and induction of systemic resistance in host plants to a broad spectrum of pathogens. Biological control is thus being considered as an alternative or a supplemental way of reducing the use of chemicals in agriculture.

There has been many studies describing potential uses of plant associated bacteria as agents stimulating plant growth and managing soil and plant health. Studies so far concentrated on the plant growth promoting features of rhizospheric bacteria of potato, tomato, onion plants. In this study, bacteria were isolated from rhizosphere of some of perennial plants, such as olive trees, walnut trees and apple trees and tested for their plant growth promoting activities. In addition to traditional identification tests, the bacteria were identified by using fatty acid methyl ester (FAME) analysis.

Key words: PGPB, PGPR, Antagonistic Activity, FAME

TEŞEKKÜR

Çalışmanın ortaya çıkartılması, fikir alış verişinin hiçbir zaman durmamasını sağlayan, tezin yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübeleriyle gelişmeme yardım eden, maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN' e teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca çalışmaların sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Erdoğan ÇAKIR ve Ar. Gör. Gülçin IŞIK' a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve manevi destek sağlayan 'genel mikrobiyoloji araştırma lab., enzimoloji lab. ve moleküler laboratuvarında' çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her ne olursa olsun, ne yaparsam yapayım, verdiğim kararların arkasında olacaklarını bildiğim ve beni bu süre boyunca yalnız bırakmayan aile fertlerime sonsuz defa teşekkür ederim.

Alper DEDE

Temmuz, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix

1.GİRİŞ	1
1.1. Rizosfer	2
1.2. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler (PGPB).....	6
1.2.1. Pseudomonas.....	8
1.2.2. <i>Bacillus</i>	8
1.2.3. Diazotrofik PGPR (Diazotrophic PGPR)	9
1.2.4. Rhizobia	9
1.3. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Özellikler	10
1.3.1. Fosfat Çözünübilirliği	10
1.3.2. Bitki Hormonu Üretimi.....	10
1.3.3. PGPB Tarafından Gerçekleştirilen Azot Fiksasyonu	11
1.3.4. PGPB Antagonistik Özellikler	12
1.4. PGPB Özelliğindeki İnokulantların Tarımsal Kullanım Alanları	14
1.4.1. İnokulantlar İçin Optimum Taşıyıcı Özellikleri.....	14
1.4.2. İnokulantlar İçin Varolan Taşıyıcı Çeşitleri.....	15
1.4.3. İnokulantların Ticari Olarak Dağıtım Formları	16

2. MATERİYAL ve METOD	18
2.1. MATERİYAL	18
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	18
2.1.1.1. Triptik Soy Agar (TSA).....	18
2.1.1.2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	18
2.1.1.3. Peptone Water	19
2.1.1.4. Nütrient Broth/ Agar (NB/ NA).....	19
2.1.1.5. Modifiye Nütrient Agar	20
2.1.1.6. Modifiye Chrome Azurol S (CAS) agar.....	20
2.1.1.7. National Botanical Research Institute' s Phosphate Growth Medium (NBRIP)	21
2.1.1.8. King' s B Broth/ Agar	22
2.1.1.9. Potato Dextrose Agar (PDA)	22
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Reagentler.....	23
2.1.2.1. Kimyasallar	23
2.1.2.2. Reagentler	23
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Topraklar	23
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	24
2.2. METOD.....	25
2.2.1. Topraklardan Bakteri İzolasyonu ve Saklanması.....	25
2.2.2. Antagonistik Aktivite Testleri.....	26
2.2.2.1. Antibakteriyel Aktivite Testi	26
2.2.2.2. Antifungal Aktivite Testi.....	27
2.2.3. Hidrosiyonik Asit Üretimi Testi.....	27
2.2.4. Siderofor Üretim Testi	27
2.2.5. Fosfat Çözünübilirliği	28

2.2.6. İndol Asetik Asit Üretim Testi	28
2.2.7. Amonyak Üretim Testi	29
2.2.8. Bakteriyal İdentifikasyon.....	29
2.2.8.1 Yağ Asidi Metil Esterleri Analizi (FAME)	29
2.2.8.2. API 20E (Gram negatif Bakteri) Analizi	30
2.2.9. Toprak Analizleri	30
2.2.9.1. Toprak Örneklerinin Toplanması	30
2.2.9.2. Toprak Örneklerinin Analize Hazırlanması.....	31
2.2.9.3. Toprak Reaksiyonu (pH)	31
2.2.9.4. Toprağın Fiziksel Analizi	31
2.2.9.5. Toprağın Kireç Analizi.....	31
2.2.9.6 Toprağın Toplam Azot Miktarının Tayini.....	32
2.2.9.7. Toprak Neminin Hesaplanması.....	32
3. BULGULAR	33
3.1. Topraklardan Bakteri İzolasyonu ve Saklanması	33
3.2. Antagonistik Aktivite Testlerinin Sonuçları	36
3.2.1. Antibakteriyel Aktivite Test Sonuçları.....	36
3.2.2. Antifungal Aktivite Test Sonuçları	44
3.3. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterileri Belirleme Testleri.....	52
3.3.1. Hidrosiyonik Asit Testi (H.A.T)	52
3.3.2. Siderofor Üretim Testi (S.Ü.T)	53
3.3.3. Fosfat Çözünübilirliği Testi (F.Ç.T).....	54
3.3.4. İndol Asetik Asit Testi (İ.A.A.T)	55
3.3.5. Amonyak Üretim Testi (A.Ü.T).....	56
3.4. Bakteriyel İdentifikasyon.	57
3.4.1. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analizi.....	57

3.4.2. API 20E (Gram Negatif Bakteri) Analizi	63
3.5. Toprak Analizi Sonuçları	64
3.5.1. Toprak Reaksiyonu.....	64
3.5.2. Toprak Fiziksel Analizi	64
3.5.3. Toprak Kireç Analizi	64
3.5.4. Toprak Toplam Azot Miktarı Tayini	65
3.5.5. Toprak Nem Tayini	65
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	66
5. KAYNAKLAR	74
Ek: Deney Sonuçları	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

- 3.1. 1 numaralı petri Elma ağacı yüzey toprağı örneğine (10^{-3} dilüsyon), 2 numaralı petri zeytin 4 ağacı 17 cm derinliğindeki toprak örneğine (10^{-3} dilüsyon) ve 3 numaralı petri ise ceviz ağacının 30 cm derinliğindeki toprak örneğine (10^{-2} dilüsyon) aittir 33
- 3.2. 1 numaralı petride Z.30.4.1 numaralı izolatın *Pseudomonas pv. glycine* üzerine etkisi, 2 numaralı petride E.F.9 ve E.F.11 numaralı izolatların *Pseudomonas pv. phaseolicola* NCPP B52 üzerine etkisi ve 3 numaralı petride ise Z.10.1.8 numaralı izolatın *Pseudomonas syringae* üzerindeki etkisi görülmektedir. 37
- 3.3. Z.30.3.1, Z.10.3.3, Z.30.3.2 izolatları ve kontrol grubu olarak seçilen antifungal ajanların *A. parasiticus* NRRL 2999 üzerindeki etkileri 45
- 3.4. Hidrosiyonik aktivite pozitif izolat Z.10.1.1. (soldaki petri) ve negatif izolat Z.50.1.1. (sağdaki petri) 53
- 3.5. Siderofor üretimi testi sonuçları meydana gelen turuncu halkasal oluşumlar pozitif sonuçları göstermektedir. 54
- 3.6. Sağdaki petride fosfat çözdüğü bilinen *E. coli* ATCC 25922' de görülen etki sonucuna bağlı olarak soldaki petride fosfat çözebilen bakterilerin 2, 3 ve 4 numaralı örnekler olduğu gösterilmiştir 55
- 3.7. Soldaki şekil zeytin 3 ağacından kaydedilen pozitif ve negatif örnekleri göstermektedir. Sağdaki şekilde ise 1 numaralı ependorf bakteriyel bir gelişme olmayan ve kimyasalları içermektedir. 2, 3 ve 4 numaralı ependorflar ise pozitif olarak nitelendirilen renkleri temsil etmektedir 56
- 3.8. 22 numaralı deney tüpü Z.30.5.8 numaralı izolat olup ortadaki deney tüpü (bakteri içermemekle beraber Nessler' s reagenti uygulanmıştır) ile aynı renge sahiptir. 12 numaralı deney tüpünde ise pozitif olarak adlandırılan üyelerin oluşturduğu renk gösterilmiştir 57
- 3.9. *E. coli* ATCC 25922 bakterisinin API 20E profili 63

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Triptik soy agar içeriği	18
2.2. Sabouraud Dextrose Agar içeriği.....	18
2.3. Peptone water içeriği	19
2.4. Nutrient agar içeriği	19
2.5. Modifiye nutrient agar.....	20
2.6. Modifiye CAS agar	20
2.7. NBRIP içeriği	21
2.8. King' s B agar içeriği	22
2.9. Potato dextrose agar içeriği	22
2.10. Kullanılan toprak örnekleri ve toplandıkları lokaliteler	23
2.11. Çalışmada kullanılan bakteriler	24
2.12. Çalışmada kullanılan funguslar.....	25
3.1. Toprak örneklerindeki toplam canlı bakteri sayıları	33
3.2. Saf olarak elde edilen bakteri izolatları.....	34
3.3. Ceviz ve elma topraklarının yüzey ve rizosfer bölgelerindeki izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	38
3.4. Fidan rizosferinden elde edilen izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	39
3.5. Zeytin 1 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	40
3.6. Zeytin 2 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	41
3.7. Zeytin 3 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları	42
3.8. Zeytin 4 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	43

3.9. Zeytin 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyal aktivite test sonuçları.....	44
3.10. Elma ve ceviz ağaçlarının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri	46
3.11. Fidan rizosferinden elde edilen bakterilerin antifungal etkileri.....	47
3.12. Zeytin 1 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri.....	48
3.13. Zeytin 2 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri.....	49
3.14. Zeytin 3 ve 4 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri	49
3.15. Zeytin 4 ve 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri	50
3.16. Zeytin 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri.....	51
3.17. Antifungal ajanların bitki patojeni küflere karşı etkileri	52
3.18. Amonyak üretimi negatif olan bakteri üyeleri.....	56
3.19. Elma ve Ceviz ağaçlarından elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan bakteriler	58
3.20. Fidanlardan elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan bakteriler	58
3.21. Zeytin 1 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar	59
3.22. Zeytin 2 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar	60
3.23. Zeytin 3 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar	61

3.24. Zeytin 4 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar	62
3.25. Zeytin 5 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar	62
3.26. Toprak reaksiyonu sonuçları.....	64
3.27. Toprağın fiziksel analizi sonuçları	64
3.28. Toprak kireç analizi sonuçları.....	65
3.29. Toprağın toplam azot miktarı tayini sonuçları.....	65
3.30. Toprak nemi sonuçları.....	65

1. GİRİŞ

Bitki büyümesini teşvik edici bakteriler (plant growth promoting bacteria= PGPB) rizosfer tabakasında bulunan farklı bakterilerden oluşan bir gruptur. Bu bakteriler kök yüzeylerinde ve kök ile birleşmiş halde bulunup, bitki büyümesini ya da bitki yayılmasını arttırıcı etkilerini direk veya indirek olarak göstermektedirler. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler bitki büyümesini arttırıcı olarak, ürün verimi artışında, patojenlerin infekte özelliklerinin giderilmesinde, biyotik ve abiyotik bitki streslerinin azaltılmasında bitkiye patojen özellik göstermeden bulunabilirler (Welbaum ve ark. 2004; van Loon ve Bakker, 2005; Lugtenberg ve Kamilova, 2009).

Bitki büyümesini teşvik edici rizobakterilerde (plant growth promoting rhizobacteria= PGPR) indirek mekanizmalar, patojenik bakterilere karşı antibiyotik korunması, rizosferdeki bitki patojenlerinin demir alımlarının azaltılması, fungal hücre duvarlarını lize edici enzimlerin kullanılması ve patojenik mikroorganizmalar ile rekabet olarak bilinmektedir.

Direk mekanizmalar ise PGPR'lerin bitki büyümesine; fosfor alımı, nitrojen fiksasyonu, sideforlar ile demir alımı, bitki hormonlarının üretimleri (oksin, sitokinin ve giberelin) ve bitki etilen seviyesinin düşürülmesi ile katkıda bulunması şeklindedir (Glick 1995; Glick ve ark. 1999).

Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin laboratuvar ortamında belirlenebilmesi için, bitkilerin büyümesini arttırıcı özellikteki indolasetik asit (indol asetik asit = IAA) üretilip üretilmedikleri, antimikrobiyal etkileri, fosfat çözünebilirliği, amonyak üretim aktivitesi (NH_3) ve hidrosiyonik asit (HCN) üretimi gibi bazı özellikleri araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, zeytin, ceviz ve elma ağaçlarının yüzey ve farklı rizosfer bölgeleri ile zeytin, ceviz ve elma fidanlarının rizosferinden PGPB özelliğindeki bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu amaçlanmış olup, bitki büyümesini teşvik eden özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

1.1. Rizosfer

Lorenz Hiltner'in rizosfer tanımını yapmasından sonra kök sistemi ve buralardaki mikrobiyal yoğunluk ve aktivitesi birçok çalışma ile rapor edilmeye başlanmıştır (Hiltner 1904; Smalla ve ark. 2006). Bazı rizosfer mikroorganizmaları diğer mikroorganizma gruplarının konakları ile iş birliği yaparak bitki büyümesinde nötr, zararlı ya da yararlı etki gösterebilirler (Raaijmakers ve ark. 2002; Welbaum ve ark. 2004).

Köklerden organik madde salınımı gerçekleştiği için toprağı saran legümen köklerindeki etkilerinden dolayı rizosfer yüksek mikrobiyal aktiviteye sahiptir. Rizosfer toprağı kök sistemine yapışık halde bulunan gevşek topraktan oluşmuş ince bir tabakadır. Rizosferi daha iyi tanımlamak gerekirse; dış rizosfer, iç rizosfer kök yüzeyi ve kök çevresi olarak sınıflandırılabilir.

20. yüzyılın sonlarına kadar mikroorganizmaların bitki büyümesini teşvik etme yetenekleri bir ekosistem ajanı olarak değerlendirilmemiştir. Enerji ve gelişim konusunu kısaca özetlemek gerekirse, ekosistemin özellikleri, biyosfer fonksiyonları ile ekosistem özellikleri belirlemede önemli bir role sahip olmasıdır. Öncelikle gelişim esnasında rizosfer dünya üzerindeki en geniş ekosistemdir. İkinci olarak ise bu sistem üzerindeki enerji akışı çok yüksek seviyededir. Bazı araştırmacılar, bitkilerin kökleri sayesinde %20 ile %50 arasında değişen fotosentez salınımları olduğunu göstermişlerdir (Botner ve ark. 1999; Buchenauer 1998). Böylece rizosfer etkisi biyosfer fonksiyonlarının ana etkisini oluşturmaktadır.

1980'lerden günümüze kadar birçok çalışmada rizosfer içerisindeki yararlı mikroorganizmaların koloni oluşturma özelliklerine odaklanılmıştır. Genellikle rizosfer tabakasının 1 gramında yaklaşık olarak 10^7 - 10^9 koloni oluşturan birim (KOB) kültüre edilebilir bakteri bulunmuştur (Benizri ve ark. 2001), oysaki rhizoplanede (kök yüzeyinde) 1gram toprakta 10^5 - 10^7 KOB bakteri sayılmıştır (Benizri ve ark. 2001; Walker ve ark. 2003).

Bakteriyel çeşitlilik taksonomik, genetik ve fonksiyonel çeşitlilik yapıları ile tanımlanabilmektedir (Zak ve ark. 1994). Rizosferde bakteriyel popülasyonun

metabolik çok yönlülüğü, bakterilerin genetik çeşitliliğine, ökaryotik ve prokaryotik canlılardan (örneğin bitkiler gibi) birisi ile muhtemel ilişkilerine bağlıdır.

Kolonileşme bazı kök hücrelerinin bütün yüzeyinde meydana gelebilen bir oluşumdur ve hatta bazı bakteriler mikrokoloniler ve biyofilmler oluşturabilirler (Benizri ve ark. 2001). Rhizoplane kolonileşmeleri sadece laboratuvar ortamında değil bitkilerin yetiştiği yüksek mikrobiyal çeşitlilik içeren doğal topraklarda da çalışılmaktadır. Rizosfer ve rhizoplane, bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin (plant growth promoting bacteria= PGPB) gelişimi için yeterli içeriklere sahiptirler. PGPB bitkiye edeceği etkiden önce rizosfer ya da rhizoplane içeriklerine ihtiyaç duymaktadır (Compant ve ark. 2007). PGPB güçlü mikrobiyal bir yarışın içerisine girerek rizosfer ya da rhizoplane tabakasına kolonize olabilmektedirler.

Fotosentez ile karbon fiksasyonunda kök bölgesinde kök salgıları salınmaktadır (Walker ve ark. 2003). Çeşitli karbonhidratlar, amino asitler, organik asitler ve diğer bileşikler rizosferde bulunan kök ile ilişkili bakteriler için besin kaynağı durumundadır (Walker ve ark. 2003). Mikroorganizmalar rizosfer ve rhizoplane tabakalarında kemotaktik ya da salgılara doğru hareket ederek buralarda koloniler oluştururlar (Lugtenberg ve Kamillova 2009).

Konak bakteri ilişkilerinde belirgin tanıma ve birleşme olayları gözlenmektedir (Benizri ve ark. 2001). Salgıların içerikleri kültür bitkisinin çeşidine, bitkinin ne kadar strese maruz kaldığına, bitkinin büyüme aşamasına bağlı olarak değişir ve bu aşamalarda da bakteri komunitelerinde değişiklikler görülmektedir (Haichar ve ark. 2008). Kök salgısındaki değişiklikler kolonileşme sürecini de etkileyen bir durumdur (Lugtenberg ve ark. 2001). İlaveten bazı kök salgıları bakteri strainleri açısından negatif etki gösterirler.

Kök salgısı toprakta heterojen olarak bilinmektedir. Bazı salgı maddeleri bazı kök bölgelerinde daha yoğun olarak bulunmaktadır. Farklı bölgelerin farklı miktarda salgıladıkları salgılar ile ilişkili olarak rizobakteriler bu bölgelerde daha iyi bir gelişim göstermektedirler (Gamalero ve ark. 2004). Fotosentez salgılarının

miktarı ve kök salgılarının çeşitliliği toprak tipi ve besin alımına bağlıdır (Krafczyk ve ark. 1984; Peterson ve Guinel 2000). Bu olaylar göz önünde bulundurulduğunda kökün farklı bölgelerinde rizobakteriyal komuniteler için farklı gelişimsel süreçler görülür ve bu süreçler konaklarına bağlılık gösterir.

Kök salgılarına ek olarak bazı bakteriler kök müsilaajlarına bağlı durumdadırlar. Örneğin bilinen bitki gelişimi bakterilerinden *Azospirillum* spp. strainleri mısır bitkisinin kökünde üretilen müsilaaj tabakasının oluşumunda etkilidirler (Mandimba ve ark. 1986). Buna zıt bir örnek vermek gerekirse; *P. fluorescens* strain SBW25 kök bölgesinde müsilaaj oluşumuna engel olmaktadır (Humphris ve ark. 2005). Kök sistemindeki farklı bakteriyel kolonileşmenin anlaşılması açısından kök müsilaajı önemli bir kriterdir. Kök salgısı ve müsilaaj türevi besin maddeleri nötral bakterileri, yararlı bakterileri, zararlı bakterileri, fungusları ve diğer toprak organizmalarını çekmektedir (Walker ve ark. 2003). Bu nedenle PGPB üyelerinin kök bölgesine kolonize olmaları diğer organizmalara göre daha yüksek bir oranda gerçekleşmektedir.

PGPB tarafından üretilen ve salgılanan enzimler rizosferdeki bitki patojenlerinin büyümesini engellemektedirler. Ek olarak bazı PGPB üyeleri de kolonize oldukları yerde antibiyotik salgılamaktadırlar (van Loon ve Bakker, 2005). Bitki konaklarında yerleşim gösteren bazı bakteriyel strainler kök çevresindeki durumlarına göre bir veya daha fazla sayıda salgı maddesi üretebilirler (Haas ve Défago, 2005).

Birçok bakteri grubu sadece rizosfer ya da rhizoplane tabakalarında kolonize olmaz bunlar ayrıca bitkinin dış yapılarına kolonize olarak onların büyümesini teşvik etmektedirler (Hallmann 2001; Compant ve ark. 2005b, 2007; Sessitsch ve ark. 2004; Hallmann ve Berg 2007). Viktor Galippe (1887) toprak mikroorganizmalarının sağlıklı bitki organlarını delerek buralara kolonize olduklarını varsaymıştır. Son yapılan çalışmalar ile birlikte birçok mikroorganizma grubunun bitki dışı koloniler oluşturdukları (Idris ve ark. 2004; Krechel ve ark. 2004; Berg ve ark. 2005) ve bu endofitik bakterilerin rizosfer tabakasından kökenlendiklerini (Sessitsch ve ark. 2002, Compant ve ark. 2005a; Hardoim ve ark. 2008) doğrulanmış durumdadır. Endofitler, endoriza (kök

içerisine giren) oluşturabilen rizobakterilerin bir alt grubu halindedir. Genellikle endofitik bakteriler rizosferde kolonize olmuş olan bakterilerden daha etkili olarak bitki büyümesini teşvik ederler (Conn ve ark. 1997; Chanway ve ark, 2000).

Bazı rizosfer ve rizoplane kolonileri yani toprak kaynaklı mikroorganizmalar köklere, ksilem kanallarına vejetatif bitki dokularına, çiçeklere, meyvelere ve tohumlara girebilmektedirler.

Bitki kökleri direkt olarak bunları saran mikrobiyal popülasyonlarla ilişkilidir, rizosferdeki mikroorganizmalar bitki büyümesi üzerinde göze çarpan şekilde etkilidirler. Mikrobiyal popülasyonların rizosferdeki eksikliğinde bitki büyümesi azalmaktadır (Dommergues 1978).

Mikroorganizmalar tarafından salınan alleopatik (antagonistik) içerikler amensal (salgıladığı maddelerle diğer canlıya zarar vermesi) etkileşimlerle rizosferdeki bitkilerin bünyesine katılırlar. Bazı alleopatik içerikler habitat içerisindeki diğer bitkilerin saldırılarından korunmak içinde kullanılırlar ve bunlar bitki ile rizosferdeki mikroorganizmalar arası sinerjetik ilişkilerle sağlanmaktadır. Son 28 yıllık sürede tekrarlayan bir biçimde bitkilerin mikroorganizmalarca sarıldıkları, mikroorganizmaların rizosfer kaynaklı oldukları ve birçoğunun da bitki büyümesini ya da sağlığını geliştirdikleri bilinmektedir (Sturz ve Nowak 2000; Hardoim ve ark. 2008).

Birçok kolonileşmenin de değişik bitki organlarında olduğu görülmüştür (James ve ark. 2002; Compant ve ark. 2005b, 2007). Bununla beraber farklı mikrobiyal komüniteler çeşitli bitki organlarında bulunmuşlar ve her bir bakteriyel strainin farklı bir bitki bölgesine kolonize olduğu görülmüştür. Bakteriyel popülasyon içerisindeki hücreler ayrı olarak izole edilememekte fakat belli aktivitelerde koordinasyonlu şekilde çalışmaktadırlar. Bu iletişim hayatta kalmanın anahtarı olarak gösterilmektedir ve çevre içerisinde çok hızlı olan değişimlere cevap verebilme yeteneğini arttırmaktadır (Prosser 2002). Bakteri grupları *quorum sensing* (QS) olarak bilinen ve birbirleri arasında iletişim sağlamalarına olanak sağlayan karmaşık bir olay gerçekleştirebilme yeteneğindedirler.

Quorum sensing bakterial domaininde çok yüksek seviyede birbirleri ile rekabet edebilme özelliği vermekte ve daha karmaşık nişler içerisinde hayatta kalma şanslarını arttırmaktadırlar. Bu olay ayrıca bazı bakteriyel bitki patojenlerinin enfeksiyon oluşturmalarına da neden olmaktadır (*Xanthomonas campestris* ve *Pseudomonas syringae* arasındaki ilişki gibi) (Fray 2002).

Quorum sensing ile meydana gelen bakteriyel iletişimde ortam üzerinde sinyal molekülleri salınır ve üretilir, bunlara oto indükleyiciler adı da verilmektedir. Bakteriler sinyali fark ettikleri anda belirli bir genin ifadesi ile üretim ya durdurulur ya da artırılmış olur. Konjugasyon ile DNA transferi, siderofor üretimi, biyoluminesans, biyofilm oluşumu ve bazı bakterilerin hareketini sağlayan olaylar quorum sensing ile gerçekleşmektedir (Quiñones ve ark. 2004; Swift ve ark. 1996).

1.2. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler (PGPB)

Rizosfer tabakasında bulunan ve bitkilere yararlı olan bakteri gruplarına PGPR denilmektedir (Schuhegger ve ark. 2006). Bazı bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (Bashan ve Holguin 1998) ya da bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler (Klopper ve Schroth 1978) bitki büyümesini artırıcı olarak, ürün verimi artışında, patojenlerin enfekte özelliklerinin giderilmesinde, biyotik ve abiyotik bitki streslerinin azaltılmasında bitkiye patojen özellik göstermeden bulunabilirler.

Kabul edilen PGPR üyelerinin sayıları bitkiyi inoküle eden ve olumlu etki gösteren bakteri komüniteleri olarak belirlenir. Genel olarak rizosferdeki bakterilerin %2'si ile %5'i arasındaki PGPR grubu üyeleridir (Barriuso ve ark. 2005). Bu oran aralığına bağlı olarak da yabancı bitki türlerinin rizosferinden elde edilen izolatlar bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler olarak gösterilmektedir (Lucas ve ark. 2001; Kloepper ve ark. 1980).

PGPB üyeleri bitki gelişimini iki yolla etkilerler: (i) bitki metabolizmasını direk olarak etkileyerek bitkinin kısa vadede besin almasını sağlarlar. Bu

bakteriler atmosferik azotu fikse etme, fosfor ve demir çözebilme ve bitki hormonu üretiminin arttırılmasını sağlarlar. Ek olarak bitkiyi stres faktörlerine karşı koruma görevleri vardır. Bunlar arasında; kuruluk, yüksek tuzluluk, metal toksisitesi ve pestisid yüklemeleri sayılabilir. Bir veya daha çok özelliği bitki büyümesi ve gelişmesi sırasında gösterebilmektedirler. (ii) bir grup PGPB biyokontrol PGPB olarak adlandırılırlar (Bashan ve Holguin 1998). Bu grup üyeleri bitkiyi bitki patojeni bakterilere, funguslara, nematod ve virüslere karşı korumalarıyla bilinmektedir.

Eğer PGPB ile bitki birleşimleri sağlanırsa verimli kök kolonizasyonu gerçekleşmektedir ve bunu izleyen işlemler şunlardır: (i) patojen tarafından infekte edilmesinden sonra hastalığa neden olabilirler; (ii) hastalık antifungal metabolitler (AFMs) sayesinde kontrol edilir; (iii) bitkinin uyarılması, örneğin bitki hormonları sayesinde büyüme etkisi görülür (iv) biyofertilizasyon, örneğin bazı mikroplar sayesinde bitkinin besin kaynakları alımında (azot, fosfat, mikro besinler gibi) artış; (v) çok daha fazla mikroorganizmanın topraktan izole edilmesiyle zararlı kimyasal maddelerin doğaya salınmaları indirgenmektedir, ayrıca kökte ki kolonizasyon ile göze çarpan şekilde bitki iyileştirmesi önem kazanmaktadır (Lugtenberg ve Dekkers, 1999).

Bazı PGPR üyeleri ticari olarak üretilerek tarımda kullanılmaktadırlar, fakat bu bakteriler topraktaki mikrobiyal komüniteleri ve bunları toprak içerisindeki dağılımlarını etkileme özelliğindedirler. Bu değişimler mutlaka incelenmelidir, çünkü mikroorganizmalar bitki kökündeki biyogübreler (biyofertilizer) ile yakından ilişkili durumdadırlar (Antuon ve Prévost 2005; Lucas ve ark. 2004). Öte yandan birçok çalışmada PGPR üyelerinin çok fazla değişiklik gösterdiği ve PGPR üyelerinin sadece belli bazı durumlarda etkin oldukları belirlenmiştir (Bashan ve Holguin 1988).

Pseudomonas, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* ve *Serratia* grubu üyeleri bitki büyümesini teşvik ettikleri yönünde rapor edilmişlerdir (Kloepper ve ark. 1989).

1.2.1. *Pseudomonas*

Gram negatif toprak bakterisi olan bu gruptaki bakteriler, rizosferdeki en baskın grup olarak karşımıza çıkmaktadır. PGPR aktivitesi uzun yıllardır bilinen bu bakteri cinsi birçok mekanizmanın oluşturulmasında görev almıştır (Antoun ve Prévost 2005; Patten ve Glick 2002).

Pseudomonas cinsinin ekolojik çeşitliliği çok yüksek olmakla birlikte bazı belirli türler, dünya üzerindeki birçok bitki ve değişik topraktan izole edilmiştir. *Pseudomonas* strainleri metabolik aktivitelerinde yüksek seviyede değişkenlik göstermektedirler. Antibiyotikler, sideroforlar ya da hidrojen siyanid gibi pek çok metabolit salgılamaktadırlar (Jensen ve Pedersen 2006).

Tarla mahsüllerinde tohum ve tohum parçalarındaki yararlı etki *Pseudomonas* spp. ile yapılmıştır. Patates tohumlarına *Pseudomonas fluorescens* ve *P. putida* süspansiyonu uygulanarak etkinlik derecesi belirlenmeye çalışılmıştır (Burr ve ark. 1978).

1.2.2. *Bacillus*

Bacillus ve *Paenibacillus* türlerinin büyük çoğunluğu *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* alt türlerinden oluşmaktadır. Bu alt türler bitki patojenlerini baskılama özelliklerine sahiptirler (Kumar ve ark. 2011). Bitki büyümesini teşvik eden *Bacillus* ve *Paenibacillus* türleri kök bölgesine kolonize olmalarıyla bilinirler (Kloepper ve ark. 2004; Idris ve ark. 2007).

Bununla beraber %95'i gram pozitif olan PGPB üyesi toprak basillerinin cinsi *Bacillus* olarak bilinmektedir. Diğer %5'lik kısımda ise *Frankia* ve *Arthrobacter* cinsleri yer almaktadır (Garbeva ve ark. 2003). *Bacillus* üyesi olan bakteriler zor şartlar ile karşılaştıklarında spor oluşturabilen, bazıları diazotroflar olarak bilinen (*Bacillus subtilis*) (Timmusk ve ark. 1999), bununla beraber diğer üyeleri çok değişik PGPR aktivitelerinde rol alan ve son olarak da büyümeyi aktive edici birçok unsurun rapor edildiği bir gruptur (Lucas ve ark. 2004; Kokalis-Burelle ve ark. 2002; Probanza ve ark. 2002).

1.2.3. Diazotrofik PGPR (Diazotrophic PGPR)

Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerden serbest azot fikse eden bakteri üyeleri ilk rizobakteriler arasında bilinirler ve bitki büyümesini teşvik ederler. *Azospirillum* strainleri 1970'lerden beri izole edilerek kullanılmaktadırlar (Steenhount ve Vanderleyden 2000). Bu cins çok geniş olarak çalışılmıştır.

Azoarcus sp., *Burkholderia* sp., *Glucocetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp. ve *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* cinsleri nitrojen fikse edebilme özelliklerinin yanında bitki büyümesine katkıda bulunurlar (Vessey 2003). Bu strainler değişik bitki türlerinden (pirinç, şeker kamışı, mısır, ananas ve kahve çekirdeği gibi) sıklıkla izole edilmişlerdir.

Azoarcus yüksek genetik ve metabolik çeşitliliğinden dolayı daha yeni yeni dikkatleri üzerine çeken bir gruptur. Pirinçlerde endofit olarak bulunur ve nitrojen fikse edici endofitler içinde model olarak görülmektedir (Hurek ve Reinhold- Hurek 2003). Üç değişik cinse dağılmış durumdadır. Bu cinsin *Azovibrio*, *Azospira* ve *Azonexus* cinsi bakterilerden ayrılmasını sağlayan en önemli özellik karboksilik asit ya da etanol içeren (şeker gibi) ortamlarda ve optimum olarak 37-42 °C'de gelişebilmesidir (Reinhold- Hurek ve Hurek 2000).

1.2.4 Rhizobia

Rizosferde bulunan diğer bakteri gruplarına rizobia adı verilmektedir. Strainler PGPR üyeleri gibi davranabilmektedirler ve legümsüz bitki köklerine belirgin olmayan bir birliktelikle kolonizasyon yapmaktadırlar. Bu gruptaki mikroorganizmalar bitki büyümesinde etkin olan büyüme arttırıcıları, sideroforlar ya da hidrojen siyanide ya da fosfat alımı aktivitesini arttıran salgılar salgırlar (Antoun ve ark. 1998). Legümen olmayan bitkilerin kesimi sonrası rotasyon işlemlerinde rizosfer popülasyonunun artması ile karşılaşmıştır (Yanni ve ark. 1997). Böylelikle daha sonra tarımı yapılacak bitkilere yarar sağlanmış olmaktadır (Lupwayi ve ark. 2004).

1.3. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Özellikler

1.3.1. Fosfat Çözünübilirliği

Fosfor bitki makrobesinlerinden biridir ve bitki metabolizması için çok önemli bir role sahiptir. Metabolik yollardaki anahtar enzimlerin fonksiyonel olarak işleyebilmesi için önem arz etmektedir (Theodorou ve Plaxton 1993). Fosfat çözebilen mikroorganizmalar toprakta bol miktarda bulunmakla beraber bitki rizosferinden kolaylıkla izole edilebilmektedir (Kucey 1983). Kayaçalarda bulunan fosfatın, fosfat çözebilme yeteneğinde olan mikroorganizmalar tarafından bitkilerin fosfat alımını arttırması yoğun olarak çalışılmıştır (Laheurte ve Berthelin 1988; Illmer ve ark. 1995). Bununla beraber bazı bakteri gruplarının organik asitlerin parçalanması ile birlikte inorganik fosfatı çözebilme yeteneğinde oldukları belirlenmiş durumdadır (Hoberg ve ark. 2005).

1.3.2. Bitki Hormonu Üretimi

Bitki hormonları (absisik asit, oksinler, sitokininler, etilen, giberelinler, jasmonik asit, salisilik asit) kök oluşumu, uzama, yapıların meydana gelmesi ve kökçüklerin oluşumunda görev almaktadır (Fukaki ve Tasaka 2009; Woodward ve Bartel 2005; Swarup ve ark. 2007). Bitki gelişimini etkileyen bazı bakterilerin indol-3-asetik asit (IAA), sitokinin ve giberelin ürettikleri bilinmektedir (Bottini ve ark. 2004; Bloemberg ve Lugtenberg 2001). Bitki gelişimine katkısı olan bakteriler IAA sentezini triptofan bağımlı yollar ile gerçekleştirirler. Bununla beraber bakteriyel IAA' nın bitki gelişimine etkisi tam olarak belirlenememesiyle beraber köklerdeki hızlı gelişim ilk olarak ilk köklerde ya da yan köklerde başlayarak genç tohumların kendilerini toprağa bağlamasını sağlayarak çevrelerinden su ve besin maddelerinin alınmasını arttırdıkları bilinmektedir (Patten ve Glick 2002). Giberellinler (giberelik asit; GA) bitki hormonlarından birisidir ve bitki morfolojisi ve bitki yapılarının uzamasında etkilidir (Salisbury 1994). PGPR tarafından üretilen GA nadir olarak görülmesiyle beraber *Bacillus pumilus* ve *Basillus licheniformis* tarafından 4 değişik GA formunun üretildiği kanıtlanmıştır (Gutie ve Talon 2001). Sitokininler bitki büyümesi ve gelişiminde,

bitki yapılarının yenilenmesinde ve sürgün oksin üretimini engelleyici olarak rol almaktadır (Fukaki ve Tasaka 2009). Son çalışmalar sitokininlerin lateral kök gelişimini negatif olarak düzenlediği yönündedir (Mason ve ark. 2005).

1.3.3. PGPR Tarafından Gerçekleştirilen Azot Fiksasyonu

Toprakta serbest olarak yaşayan rizobakterilerden *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* ve *Azoarcus* üyelerinin atmosferik azotu fikse edici özellikleri olduğu bilinmektedir. Bu bakteriler nitrojenaz kompleksleri kullanarak spesifik olmayan birliktelikler oluştururlar (Steenhoudt ve Vanderleyden 2000). *Azospirillum* bakterileri rizosferde baskın olarak kolonileşmeye başlarlar oysa diğer bakteri üyeleri ise kök, gövde ve yapraklarda endofit olarak bulunmuşlardır. Azot fiksasyonu, azot asimilasyonu ve azot regülasyonunda görev alan genler *Azospirillum* üyelerinde tanımlanmış durumdadır. Birçok nif geni diğer serbest yaşayan azot fikse edici bakterilerde de rastlanmıştır bununla beraber bütün nitrojenaz kompleksleri benzerlik göstermektedir. Farklı olarak *Azoarcus* üyelerinde ise nitrojenaz kompleksleri 3 değişik gen tarafından kodlanmaktadır (Bloemberg ve Lugtenberg 2001). Azot fikse eden bakteri aktiviteleri sonucu toplam azot konsantrasyonu seviyesi, bakteri inokulasyonu yapılan tohumlarda yapılmayanlara göre çok yüksek seviyede bulunmaktadır (Toledo ve ark. 1995). Azot fiksasyonu ve bitki büyüme gelişimi, etkili bir biyogübre ortaya çıkarılmasında önemli bir faktördür. Serbest yaşayan azot fikse edici bakterilerin tohumlara inokule edilmesiyle bitki büyümelerine etkileri gösterilmiş ve bitki büyümesini teşvik edici rizobakteri (PGPR) terimi buradan üretilmiştir (Kloepper ve ark. 1980; Bashan ve Holguin 1998).

1.3.4. PGPB Antagonistik Özellikler

Birçok bitki türünde yaprak patojenlerine karşı üretilen direnç genleri bulunmaktadır bununla beraber bütün dünyada görülen toprak kökenli patojenler hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bitkiler, rizosfer çevresinde bulunan toprak kökenli patojenlere karşı direnç sağlayabilmek için düzenleyici ve destek verici stratejiler geliştirerek belirli antagonistik etkiye sahip yararlı, nötral ve zararlı mikroorganizma ile ilişkiye girmek için evrimleşmişlerdir (Andrews ve Harris 2000; Cook ve ark. 1995). Bitkiler çok büyük miktarda organik madde kaybını engellemek için köklerden toprağa doğru salgı, lizat ve gaz salımları sağlayarak kök bölgesi etrafındaki mikrobiyal popülasyonun içeriği ve zenginliğini korumaya çalışmaktadırlar (Campbell ve Greaves 1990; Morgan ve Whipps 2001; Whipps 2001). Ekilen her tür ve varyetede köklerden kaybedilen materyal çeşitlilik ve miktar olarak değişiklik göstermektedir (Atkinson ve ark. 1975; Marschner ve ark. 2004; Miller ve Ark. 1989; Wieland ve ark. 2001).

Antagonistik mikroorganizmalar patojenleri baskılamak için bir veya daha fazla mekanizma kullanırlar. Bunlar karbon ve azotun besin veya sinyal şeklindeki formları ile rekabet ederek, demir için rekabet ederek, sistemik direncin arttırılması, antimikrobiyal metabolitlerin (antibiyotikler, HCN gibi) salgılanması ile direk olarak, enfekte edilen bölgelerdeki mikroorganizmalar ile yer değiştirme şeklinde görülebilmektedir. Kısacası bazı antagonistler bitki büyümesini direk olarak uyarırken, bazıları ise indirek etki gösterirler (Chin-A-Woeng ve ark. 2003; Glick 1995; Haas ve Defago 2005; Haas ve Keel 2003; Raaijmakers ve ark. 2002, 2006; van Loon ve ark. 1998).

Haas ve Defago (2005) tarafından yapılan çalışmada altı antibiyotik fenazinler, floroglukinoller, pyoluteorin, pirolbitrin, siklik lipopeptidler (difüze olabilir niteliktedirler) ve hidrogen siyanid (HCN uçucu niteliktedir) (bu grupların etkileri tam olarak belirgin değildir) olarak sınıflandırılmış olup kök hastalıklarının biyokontrolünde rol sahibi oldukları belirtilmiştir.

Poliketid antibiyotik olan 2,4-DAPG (diacetylphloroglucinol) antiviral, antifungal, antibakteriyal, antihelminth ve bitkitoksik içeriklere karşı etkili bir

bileşiktir. Bu bileşim bitki kök ve tohum hastalıklarının biyokontrolünde anahtar role sahiptir (Bangera ve Thomashow 1999; de Souza ve ark. 2003a, b; Haas ve Keel 2003; Isnansetyo ve ark. 2003; Kamei ve Isnansetyo 2003; Keel ve ark. 1992). Bununla beraber rizosferde bulunan toprak kaynaklı patojenlere karşı üretilen 2,4-DAPG ile birlikte hastalık etmeni patojenlerin indirgendikleri görülmüştür (Iavicoli ve ark. 2003; Weller ve ark. 2004).

Antifungal aktivite testlerinin uygulanabilmesi için siderofor ve hidrojen siyanid üretimi ya da bu ikisi veya diğer metabolitler ile sinerjik etkileşimde bulunmaları gerekmektedir. Bununla beraber bu örneklerin kitinaz hidrolizi için kitinaz negatif olmaları beklenmez. Sideroforlar, diğer ikincil metabolitler ve litik enzimlerin üretimi bakımından *Pseudomonas* grubunun bitki kökü patojenlerine hatta *Fusarium oxysporium* ve *Rhizoctonia solani* türleri ve bunların kontrolüne en etkili grup olduğu birkaç çalışmada gösterilmiştir (O’Sullivan ve O’Gara 1992; Nagraj Kumar ve ark. 2004).

Sideroforlar birçok bitki patojeni fungi üzerinde örneğin, *Phytophthora parasitica* (Yang ve ark. 1994; Xiao ve ark. 1998) *Phythium ultimum* (Hamdan ve ark. 1991), *Fusarium oxysporum* *vari danti* (Buysens ve ark. 1996) ve *Sclerotinia sclerotiorum* (McLoughlin ve ark. 1992) büyüme inhibe edici olarak bilinmektedir. Sideroforlar üretici mikroorganizmasına bağlı olarak değişen kimyasal yapılar içerirler ve bazı vejetatif hücrelere bu metabolitleri sağlarlar. Bu metabolitler, antogonistik özellikleri kapasitelerine göre patojenik mikroorganizmaların üremesini engelleyerek bitki büyümesini teşvik edici olarak rol alırlar (Bashan 1986).

Hidrojen siyanid PGPB üyelerinin çok sayıda ürettiği düşük moleküler ağırlığa sahip antifungal özellikteki metabolitlerinden en bilinenidir. Genellikle pseudomonadlar tarafından üretilirler (Bashan ve de-Bashan 2005).

1.4. PGPB Özelliğindeki İnokulantların Tarımsal Kullanım Alanları

1.4.1. İnokulantlar İçin Optimum Taşıyıcı Özellikleri

Tarımsal alanlardan fabrika ortamlarına kadar canlı mikroorganizmaların taşınması taşıyıcılar ile gerçekleşmektedir. Toprakta bulunan mikroorganizmalar için yaygın bir taşıyıcı ya da formül bulunmamaktadır (Trevors ve ark. 1992). Taşıyıcı, bakterinin ana bileşenini (hacim ya da ağırlık) içermektedir. Taşıyıcı değişik şekillerde formüle edilebilmekle beraber sulu karışım ya da toz şeklinde olabilmektedir. İyi bir taşıyıcı doğru sayıda ve fizyolojik olarak iyi durumda olan ve yaşayan hücrenin taşınma kapasitesine sahip olmalıdır (Bashan 1986b, 1991; Fages 1990; Smith 1992; Trevors ve ark. 1992). İyi bir inokulantın takip eden özelliklere sahip olması gerekmektedir.

(i) Kimyasal ve fiziksel özellikler: İnokulantın kısmen ya da tamamen ve kolaylıkla steril edilebilmesi, kimyasal ve fiziksel olarak homojen olabilmesi gerekmektedir. Ayrıca bakterinin devamlı olarak kalitesinin, yüksek su tutabilme kapasitesine sahip olması (nemli taşıyıcılar için) ve birçok bakteri türü ve grubu ile birlikte çalışabilmesi gerekmektedir.

(ii) Üretim özellikleri: İnokulant kolaylıkla üretilmeli ve varolan endüstriler ile birlikte kullanılabilir, besin maddelerini alabilir, pH kolaylıkla ayarlanabilir ve üretilmesi sırasında hammaddelerin fiyatları makul olmalıdır.

(iii) Tarımsal uygulama özellikleri: İyi olarak nitelendirilen bir inokulantın kolaylıkla uygulanabilir olması (çiftçi için en önemli özelliktir) en hızlı şekilde bakterinin toprağa salınımının mevcut tarım makineleri ile uygulanabilmesi gerekmektedir.

(iv) Çevresel özellikleri: İnokulant toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve kirletici özellik barındırmamalıdır. Hücrelerin yayılması sırasında çevresel riskler azaltılarak atmosfer ve yer altı suyunun kirletilmesi durumu en aza indirilmelidir.

(v) Saklama özellikleri: İnokulantın belirli bir raf ömrünün olması (bir veya iki yıl oda sıcaklığında saklanabilir olmak) gerekmektedir (Bashan 1998).

1.4.2. İnokulantlar İçin Varolan Taşıyıcı Çeşitleri

Rhizobia üyeleri için en iyi taşıyıcı turba ya da bataklık kömürü olarak bilinen yapıdır. Taşıyıcılar dört ana gruba bölünerek incelemektedir.

(i) Topraklar; turba, kömür, kil ve inorganik topraklar (Chao ve Alexander 1984; Kotb ve Angle 1986; Packowski ve Berryhill 1979; Singh ve Sharma 1973).

(ii) Bitki artığı materyaller; bitki artıklarının çürümesiyle oluşan gübreler, çiftlik gübreleri, soya küspesi (Iswaran ve ark. 1972), soya küspesi ve yerfıstığı yağı (Kremer ve Peterson 1982a, b), buğday kepeği (Jackson ve ark. 1991), preslenmiş çamur (şeker endüstrinden elde edilen bir ürün, Philip ve Jukari 1984), tarımsal atık materyalleri (Sadasivam ve ark. 1986), mantar üretimi sonrasında ortaya çıkan küspe (Bahl ve Jauhri 1986) ve ağaç talaşı (Richter ve ark. 1989) örnek verilebilir.

(iii) Etkisiz materyaller: Vermikulit (Paau ve ark. 1991; Sparrow ve Ham 1983a, b), perlit, kaya fosfatı, kalsiyum sülfat, poliakrilamid jeller (Dommergues ve ark. 1979) ve alginat boncukları (Bashan 1986a; Jung ve ark. 1982; Aino ve ark. 1997).

(iv) Liyofilize edilmiş mikroorganizma kültürleri (Mohammadi 1994).

Etkili bakteriyel grupların formüle edilmesi inokulantların oluşturulması için önemli bir durumdur. Ayrıca bakteriyel grupların biyolojik ajanların başarılı ve başarısız olmalarının belirlenmesinde önem arz etmektedir. Ticari olarak üretilen ürünlerin endüstriyel olarak formüle edilmeleri laboratuvar çalışmaları ile gerçekleştirilmektedir. Tarımsal ürünlerin kimyasal formülleri uzun raf ömrüne sahip olmaları, kolay kullanılmaları ve çiftçiler tarafından kötü kullanılmaları engellemek adına gerçekleştirilir. Mikrobiyal inokulantların formüle edilmeleri sırasında karşılaşılan zorluklar arasında; (i) kısa zaman aralıklarında kullanılması

gereken ve soğutma ortamı bulunmayan ortamlarda saklanamamaları (gelişmekte olan ülkelerdeki buzdolabı bulunduramama) ve (ii) uzun raf ömrüne sahip ve -5°' den 30°C aralığında özelliğini kaybetmeden saklanabilen ürün dağıtma sistemleri sayılır. Özetle ürünlerin sıcaklık toleransı olmaması durumu tarımsal satış yapılan durumlarda kabul edilebilir bir durum değildir (Kenney 1997; Lethbridge 1989).

1.4.3. İnokulantların Ticari Olarak Dağıtım Formları

(i) Tozlar. Bu form bitki ekilmeden önce tohum kaplaması şeklinde kullanılmaktadır. Partikül boyutu ne kadar küçük ise inokulantın tohuma etkisi arttırılmış olur, standart boyutlar 0.0075' den 0.25 mm boyutuna kadar değişim gösterir ve 200- 300 g/ hektar olarak uygulanır. Bu inokulantlar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tang ve Yang 1997).

(ii) Sulu karışımlar. Bu inokulant tipi toz tipteki form ile sıvının (genellikle su) karıştırılması ile oluşturulur. Karışım direk olarak karık (saban izi) üzerine ya da alternatif olarak ekimden önce tohumların karışıma daldırılması şeklinde uygulanır (Bashan 1998).

(iii) Granülerler (tanecikli). Bu inokulant tipi direk olarak saban izine tohumlar ile birlikte uygulanır. Boyutları 0.35' ten 1.18 mm' ye kadar değişiklik gösterir. Rhizobia inokulantı 5' ten 30 Kg/ hektara kadar uygulanabilir. Bu inokulantlar ticari olarak 1975' ten beri başarılı şekilde ticari olarak satılırlar ve popüler duruma gelmişlerdir (Tang 1994; Tang ve Yang 1997).

(iv) Sıvılar. Bu inokulantlarda sıvı besiyerleri ya da su, mineral ya da organik yağların sıvı formülleri kullanılır. Tohumlar ekim öncesi bu sıvıya daldırılır ya da spreyl şeklinde uygulanır. Biyokontrol ajanları olarak seyreltilerek yaprak hastalıklarına karşı kullanılırlar (Daayf ve ark. 1995). Alternatif olarak sıvı inokulant tohumların ekilmesinden önce saban izine direk olarak spreyl şeklinde kullanılır.

Bashan (1998)'nın yaptığı bir çalışmada; sayısız üretici firma (genellikle küçük ya da orta ölçekli) bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin üretimlerini birçok yıldır devam ettirmesinden bahsedilmekte ve bitki toprağında inokulumlar

şeklinde yaygın olarak kullanımının saptandığı belirtilmektedir. Örneğin steril olmayan turbalık granülü olan toprak implantı (Soil implant®) yaygın olarak bir fabrika tarafından satılmaktadır. Buna rağmen rhizobia için diğer şekillerde hazırlanmış tiplerde vermikülit içerikli Gold Coat™ *Rhizobium* inokulantı satış mağazalarında yerini almış durumdadır (Smith 1995). BioCoat™ adındaki ürün ise *P. fluorescens* ile üretilmekte ve *Fusarium* sp. baskılanmasında kullanılmaktadır (Kepmf ve ark. 1997).

Jha ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada PGPB üyelerinin biyogübre olarak geliştirilebileceğini gösterdiği çalışmada Hindistan’ da üretilen mikrobiyal bir karışım (IARI Microphos culture) ve Fosfat çözebilen bakteri (Phospate solubilizing bacteria= PSB) adı verilen bakteriyel izolatlar, biyogübreler ve kimyasal gübreler ile fasülyeler üzerinde gerçekleştirilen deney sonrasında elde edilen izolatların etkinliği gösterilmiş ve yaygın olarak kullanımı için daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir.

Baconguis ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada ticari olarak satılan çeşitli biyogübrelerden Bio-N®, Bio-Spark® ve Vital N® üzerinde içerik, kullanım alanları ve üreticileri hakkında bilgilendirme yapmıştır.

Azotobacter serbest yaşayan, azot fıkse edici bakteri ve birkaç bitki büyümesini teşvik edici içeriği üretmesiyle bilinen bir gruptur. PEAK AZAD adı altında sıvı biyogübre olarak satılmaktadır (Anonim 2013a).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Triptik soy agar (TSA) (Merck, Almanya)

Çizelge 2.1. Triptik soy agar içeriği.

İçerik	Miktar
Kazeinden elde edilen pepton	15 g
Soya özütünden elde edilen pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Fransa)

Çizelge 2.2. Sabouraud Dextrose Agar içeriği

İçerik	Miktar
Enzimatik olarak özümmlenen kazein	10 g
Dekstroz	20g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.3. Peptone Water (Acumedia, USA)

Çizelge 2.3. Peptone water içeriği

İçerik	Miktar
Peptone	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.4. Nütrient Broth/ Agar (NB/ NA) (Merck, Almanya)

Çizelge 2.4. Nütrient agar

İçerik	Miktar
Etten elde edilen pepton	5.0 g
Et özütü	3.0 g
Agar- agar	12 g
Distile su	1000 ml

Nütrient agar besiyerinde agar- agar ilavesiyle, Nütrient broth ise agar- agar kullanılmadan hazırlanmıştır. Besiyerleri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.5. Modifiye Nütrient Agar

Çizelge 2.5. Modifiye nütrient agar

İçerik	Miktar
Etten elde edilen pepton	5.0 g
Et özütü	3.0 g
Glisin	4.40 g
Agar- agar	12 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika ısıtılma maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.6. Modifiye Chrome Azurol S (CAS) Agar

Çizelge 2.6. Modifiye CAS agar

İçerik	Miktar
Chrome azurol S (CAS)	60.50 mg
Demir (III) solüsyonu	10 ml
Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA)	72.90 mg
Agar- agar	15 g
PIPES	30.24 g
%50’ lik NaOH solüsyonu	
Dionize distile su	90 ml
Distile su	900 ml

60.5 mg CAS, 50 ml dionize suyu karıştırılır arkasından 10 ml demir (III) solüsyonu (1 mM FeCl₃.6h₂O, 10 mM HCl) eklenmiştir. 40 ml su ile çözünen 72.90 mg HDTMA ile yavaşça karıştırılıp, meydana gelen mavi sıvı 121 °C’ de 15 dakika otoklava koyulmuştur.

Aynı anda 900 ml distile su, 15 g agar, 30.24 g PIPES karıştırılır ve %50' lik NaOH çözeltisi ile pH 6.80' e getirilmiş ve 121 °C' de 15 dakika otoklava koyulmuştur.

Otoklavlanan iki örnek sabunlaşmanın önüne geçilerek steril cam kaba alınarak petrilere dökülmeye hazır hale gelmiştir.

2.1.1.7. National Botanical Research Institute' s Phospate Growth Medium (NBRIP)

Çizelge 2.7. NBRIP içeriği

İçerik	Miktar
Glukoz	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
KCl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
Agar- agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C' de 15 dakika ısıl işleme maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.8. King' s B Broth/ Agar

Çizelge 2.8. King' s B agar içeriği

İçerik	Miktar
Proteose pepton	20 g
K ₂ HPO ₄	1.50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.50 g
Gliserol	15 ml
Agar- agar	15 g
Distile su	1000 ml

King' s B agar besiyerinde agar- agar ilavesiyle, King' s B broth ise agar- agar kullanılmadan hazırlanmıştır. Besiyerleri otoklavda 121 °C' de 15 dakika ısıtılma işlemine maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.1.9. Potato Dextrose Agar (PDA) (Fluka, İsviçre)

Çizelge 2.9. Potato dextrose agar içeriği

İçerik	Miktar
Patates ekstraktı	4 g
Dekstroz	20 g
Agar- agar	15 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri otoklavda 121 °C' de 15 dakika ısıtılma işlemine maruz bırakılarak steril edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Reagentler

2.1.2.1. Kimyasallar

Ortofosforik asit, %2' lik sodyum karbonat, %0.5' lik pikrik asit, ketakonazol ve nistatin kullanılmıştır.

2.1.2.2. Reagentler

Salkowski reagenti (1 ml 0.5 M FeCl₃ solüsyonuna 50 ml %35' lik HClO₄ eklenir) ve Nessler reagenti (Fluka, İsviçre) kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Topraklar

Toprak örnekleri toplanmasında baz alınan özellikler; farklı lokalitelerde bulunmaları ve farklı toprak yapılarına sahip olmaları olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2.10. Kullanılan toprak örnekleri ve toplandıkları lokaliteler

Örnek numarası ve derinlik	Toprak çeşidi	Toplandığı bölge
1. Zeytin yüzey	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
1. Zeytin 10cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
1. Zeytin 30 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
1. Zeytin 50 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
2. Zeytin yüzey	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
2. Zeytin 12 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
2. Zeytin 30 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
2. Zeytin 56 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
3. Zeytin yüzey	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
3. Zeytin 10 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
3. Zeytin 30 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
3. Zeytin 55 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı

Çizelge 2.10. (Devam) Kullanılan toprak örnekleri ve toplandıkları lokaliteler

4. Zeytin yüzey	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
4. Zeytin 17 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
4. Zeytin 30 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
4. Zeytin 52 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
5. Zeytin yüzey	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
5. Zeytin 15 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
5. Zeytin 30 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
5. Zeytin 52 cm	Zeytin toprağı	Balıkesir/ Havran otoyolu kenarı
1. Elma yüzey	Elma toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Elma 20 cm	Elma toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Elma 30 cm	Elma toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Elma 50 cm	Elma toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Ceviz yüzey	Ceviz toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Ceviz 30 cm	Ceviz toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
1. Ceviz 60 cm	Ceviz toprağı	Balıkesir/ İvrindi otoyolu kenarı
Ceviz fidan	Ceviz toprağı	Ticari olarak fide satan işletme
Elma fidan	Elma toprağı	Ticari olarak fide satan işletme
Zeytin fidan	Zeytin toprağı	Ticari olarak fide satan işletme

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan tüm mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

Çizelge 2.11. Çalışmada kullanılan bakteriler.

Mikroorganizma	Kod
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B-130
<i>Pseudomonas</i> pv. <i>tomato</i>	32-P
<i>Pseudomonas tobacco</i>	8-P
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	33-P
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> NRL B-1459	75-3
<i>Pseudomonas syringae</i>	1-P
<i>Pseudomonas</i> pv. <i>glycine</i>	PG1-T

Çizelge 2.11. (Devam) Çalışmada kullanılan bakteriler.

<i>Pseudomonas</i> pv. <i>phaseolicola</i> NCPPB52+	N52
<i>Pseudomonas</i> <i>gingeri</i>	3146
<i>Pseudomonas</i> <i>gladioli</i> pv. <i>agricola</i>	RR3-1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	04.12.2012

Çizelge 2.12. Çalışmada kullanılan funguslar.

Mikroorganizma	Kod
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 163	2
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	3
<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL 1866	4
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 321	5
<i>Penicillium notatum</i> NRRL 807	6

2.2. METOD

2.2.1. Topraklardan Bakteri İzolasyonu ve Saklanması

Fidan örnekleri hariç her bir toprak örneğinden birer kilogram toprak alınmıştır. Her bir toprak örneğinden 10 gram mikroorganizma tayini için diğer kısımlar ise toprak analizi sırasında kullanılmak üzere steril siyah poşetler içinde saklanmıştır (toprak örnekleri ve derinlikleri şekil 2.10.' da gösterilmiştir). Rizosferin heterojen yapıda olmasından ve yoğun miktarda mikroorganizma içermesinden dolayı örnek seçimi birden fazla olacak şekilde belirlenmiştir (Torsvik ve ark. 1998; Giller ve ark. 1997; Franklin ve Mills 2003). Örnek alımı sırasında toprağın heterojen yapısı göz önünde bulundurularak toprağın farklı kısımlarından örnekler ile karşılaştırılması adına çok dikkatli çalışılmıştır (Grundmann ve ark. 1999; Trevors 1998).

Ceviz, zeytin ve elma ağaçlarının yüzey, kök bölgeleri ve ticari olarak satılan fidelerinden ise sadece kök bölgelerinden alınan toprak örnekleri ile seyreltme işlemleri yapılmıştır (steril distile su ile 1:9 olacak şekilde). Seyreltme

işleminde sonra bu örneklerden 100 µl alınarak steril besiyerlerine aseptik şartlarda aktarılmış ve yayma ekim yöntemiyle yayılarak 28 ±2°C' lik sıcaklıkta iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İki gün sonrasında sayılabilir aralıkta mikroorganizma içeren petriler üzerinden sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sayım işlemi sonrası tek halde bulunan bakteri kolonileri izole edilerek saflık dereceleri çizgi ekim yöntemi ile belirlenmiştir. Saflığından emin olunan örnekler %15 veya %20' lik gliserol içerisinde stoklanarak daha sonra yapılacak işlemlerde kullanılmak üzere -86°C' lik ultra soğutucuya kaldırılmıştır. Saf olarak elde edilen örnekler çizelge 3.2.' de gösterilmiştir.

2.2.2. Antagonistik Aktivite Testleri

2.2.2.1. Antibakteriyel Aktivite Testi

Antibakteriyel aktivite testi uygulamasında Mehmood ve arkadaşları (1999) tarafından belirlenen metodun modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Elde edilen bakteriyel izolatlar genel bakteri ortamlarından Nütrient Broth besiyerinde 2 gün inkübe edildikten sonra Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilen ve bitki patojeni oldukları bilinen bakteriler (Çizelge 2.11.) ile çalışılmıştır.

Patojen bakteriler ve izolatların üretilmesinin ardından aseptik koşullarda 100 µl patojen bakteri yayma ekim yöntemi ile King's B agar yüzeyine ekilmiş ve ekildikten sonra agar delici ile 8 mm' lik çukurlar açılmıştır. Açılan çukurlara 100 µl' lik bakteri süspansiyonu eklenerek 28±2 °C' de 2 gün boyunca inkübe edilmişlerdir.

2 günlük inkübasyon sonucunda ortaya çıkan şeffaf zonların çapları ölçülerek elde edilen izolatların patojen bakteriler üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

2.2.2.2 Antifungal aktivite testi

Antibakteriyel aktivite testi uygulamasında Mehmood ve arkadaşları (1999) tarafından belirlenen metodun modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Elde edilen bakterilerin genel bakteri broth (NB) ortamında üretilmesinin ardından bitki patojeni oldukları bilinen funguslar (çizelge 2.12) ise SDA üzerinde geliştirilmiştir. Küf sporları dilüsyon işlemine tabi tutularak (0.1 ml, 10^5 CFU/ml) SDA üzerine ekilmiştir. Agar üzerine 8 mm' lik çukurlar açılarak buralara 200 µl bakteri süspansiyonu (2 günlük inkübasyon) eklenmiştir. Nütrient broth negatif kontrol ajanı olarak, antifungal antibiyotik ajanlardan ketakonazol ve nistatinin değişik konsantrasyonları kullanılmıştır. Petrilerin 5-6 gün 28 ± 2 °C' de inkübasyonu sonrasında oluşan zonların ölçümleri ile etkinlikleri belirlenmiştir.

2.2.3. Hidrosiyonik Asit (HCN) Üretimi Testi

Çalışma öncesinde bakteriyel etkinin daha iyi gösterilebilmesi için daha önce izole edilen bütün izolatların nütrient agarda çoğaltılması işlemi yapılmıştır. Elde edilen izolatlar Lorck (1948) tarafından bulunan tekniğin geliştirilmesi ile oluşan deney ile test edilmiştir. Nütrient broth 4.4 g/ L glisin ile karıştırılarak bakteriler modifiye agar üzerine çizgi ekim ile inoküle edilmiştir. Whatman filtre kağıdı no.1 üzerine %2' lik sodyum karbonat ve %0.5' lik pikrik asit çözeltisi emdirilerek petrinin üzerine yerleştirilmiştir. Petrilerin parafilm ile kapatılarak 28 ± 2 °C'de 4 günlük inkübasyondan sonra turuncu ve kırmızı aralıklarında renk oluşumu hidrosiyonik asit oluşumunu göstermiştir (Ahmad ve ark. 2008).

2.2.4. Siderofor Üretim Testi

Bakteriyel izolatların siderofor üretimlerinin tespiti için modifiye Chrome azurol S agar ortamı kullanılmıştır (Milagres ve ark. 1999). 60.5 mg CAS (chrome azurol S) 50 ml dionize distile su eklenmiş ve 10 ml demir (III) solüsyonu ile (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCL) karıştırılmıştır. 40 ml su ile çözündürülen 72.9 mg Hexadecyltrimethylammonium bisulfate (HDTMA) ile yavaşça karıştırılıp

koyu mavi sıvı 121 °C’ de 15 dakika otoklava koyulmuştur. Aynı anda 750 ml su, 15 g agar, 30.24 g PIPES ve %50’ lik NaOH solüsyonu eklenmesi ile pH seviyesi 6.8’ e getirilmiştir. Otoklavlanan iki farklı örnek sabunlaşmanın önüne geçilerek steril cam bir kaba alınmıştır. Hazırlanan solüsyon daha önceden 10 cm’ lik petrilere dökülen gelişecek bakteriler için uygun olan ortamların eklenmesi ve petri kabının yarısının kesilerek, hazırlanan chrome azurol blue agar diğer yarım kısma dökülmüştür (15 ml). Petri kabının diğer kısmını oluşturan genel bakteri besiyeri olan nütrient agar olarak seçilmiştir. Örneklerin petriye ekiminden sonra 28±2 °C’de 10-15 günlük inkübasyon sonrasında sarı, turuncu, mor, magenta renge dönüşüm pozitif sonuç olduğunu göstermiştir.

Diğer bir metodda ise, yukarıda hazırlanan içeriğinin tek başına kullanılması ile deneyler tekrarlanmıştır (Schwyn ve Neilands 1987). 28±2 °C’de 10-15 günlük inkübasyon sonrasında sarı, turuncu, mor, magenta renge dönüşüm pozitif sonuç olduğunu göstermiştir.

2.2.5. Fosfat Çözünürlüğü Testi

NBRIP besiyeri üzerine ekilen izolatların ve kontrol olarak kullanılan *E. coli* (Çizelge 2.11.) 28±2 °C’ de 3 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak ise hiçbir bakteri ekilmeyen bir petri kullanılmıştır (Nautiyal ve ark. 2000). Fosfat çözebilen bakterilerin etrafında şeffaf zonların oluşması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

2.2.6. İndol asetik asit (IAA) Üretim Testi

King’ s B broth ortamında 28±2 °C’ de 15 gün geliştirilen izolatlara 3000 rpm’ de 30 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatanttan 1 ml alınarak 1 damla ortofosforik asit ve 2 ml Salkowski reagent eklenerek karıştırılmıştır. Pembe renk oluşumu indol asetik asit üretiminin pozitif olduğunu göstermiştir (Ahmad ve ark. 2005).

2.2.7. Amonyak (NH₃) Üretim Testi

Bakteriyel izolatlar amonyak üretimi için peptonlu su içerisinde test edileceklerdir. Taze üretilmiş bakteri kültürleri 10 ml peptonlu su içerisine inokule edildikten sonra 48-72 saat boyunca 28±2 °C’de inkübasyona bırakılacaktır. Nessler’s reagenti (0.5 ml) her bir tüpe eklendikten sonra oluşan sarı renk amonyak üretimin pozitif olduğunu göstermektedir (Cappuccino ve Sherman 1992).

2.2.8. Bakteriyal İdentifikasyon

2.2.8.1. Yağ Asidi Metil Esterleri Analizi (FAME)

Bakteri izolatlarının yağ asidi analizleri, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Sasser 1990). Triptik Soy Agar (TSA) besiyerinde çizgi ekim yapılarak 28±2 °C geliştirilen 24-48 saatlik taze kültürlerden steril öze yardımıyla 40-50 mg bakteri örneği toplanmış ve steril tüplere aktarılmıştır. Hücrelerin parçalanması aşaması olan saponifikasyon basamağında önce içerisinde kültür bulunan her tüpe 1 ml Reagent 1 (metanolik baz) eklenmiştir. Daha sonra tüpler 95-100 °C’ ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler soğuk su içerisinde hızlıca soğutulmuşlardır. Tüpler tekrar aynı sıcaklıktaki su banyosunda 25 dakika bekletilmiştir. İşlem sonrası örneklerin bulunduğu deney tüpleri tekrar soğutulmuştur. Metilleştirme basamağında, her bir tüpe Reagent 2 (metilleştirme reagenti) eklenmiş ve tüpler 80 °C’ ye ayarlı su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler hızlıca soğutulmuşlardır. Saflaştırma/ ekstraksiyon basamağında soğutulan tüplere 1.25 ml Reagent 3 (ekstraksiyon çözücüsü) eklenmiş ve tüpler rotatorda 10 dakika boyunca ters-düz edilmişlerdir. İşlem sonunda tüpün alt kısmında sulu faz Pasteur pipeti ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son basamak olan bazik yıkama işleminde ise her bir tüpe 3 ml Reagent 4 eklenerek 5 dakika boyunca rotatorda ters-düz edilmiştir. Ters- düz işleminden sonra tüplerde meydana gelen organik fazın (en üstte meydana gelen kısım) 2/ 3’ ü Pasteur pipeti ile alınarak steril viallere aktarılmıştır. Hazırlanan örnekler Yağ Asidi Analiz Sistemi’ ne (Agilent, 6890N)

verilmiş ve elde edilen pikler Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIDI) tarafından analiz edilmiştir.

2.2.8.2. API 20E (Gram Negatif Bakteri) Analizi

Deney tasarımı üretici firmanın (Biomérieux) belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Gram negatif oldukları belirlenen ve 28 ± 2 °C’ de geliştirilen mikroorganizmalardan (18-24 saat üreme sonrasında) bir koloni alınarak süspansiyon meydana aktarılmıştır ve Pasteur pipetleri ile belirtilen miktarlarda test kuyucuklarına (hava kabarcığı oluşumundan kaçınılarak) aktarım gerçekleştirilmiştir. Test kuyucuklarından CIT, VP ve GEL testlerinin tüp ve küpülü bakteriyel süspansiyon ile doldurulmuştur. Diğer testlerin ise sadece tüp kısımları (küpleri dolmayacak şekilde) doldurulmuştur. ADH, LDC, ODC H₂S ve URE testlerinde mineral yağ ile küpüller doldurularak anaerobik ortam oluşturulmuştur ve 28 ± 2 °C’ de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında strip okunması için gerekli olan testler (TDA, VP ve IND) ve oksidaz testi yapılmış ve firmanın önerdiği şekilde okumalar gerçekleştirilmiştir (test küpülü Şekil 3.9’ da gösterilmiştir).

2.2.9. Toprak Analizleri

2.2.9.1. Toprak Örneklerinin Toplanması

Toprak örnekleri yüzeyden 0-30 cm ve 30-60 cm derinliklerinden zeytin bahçelerini temsil edecek şekilde meyve döneminde 15.10.2011 tarihinde bir defada alınmış ve laboratuvara getirilerek analize hazırlanmıştır (Jackson 1958).

2.2.9.2. Toprak Örneklerinin Analize Hazırlanması

Zeytin ağacının kök bölgesine yakın bölgeden toplanan toprak örneklerinden mikroorganizma eldesi ve nem analizi için belirli bir toprak kütlesi ayrıldıktan sonra laboratuvarında hava kurusu haline getirildikten sonra havanda dövülerek 2 mm' lik ve 0.5 mm' lik elekten geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir.

2.2.9.3. Toprak Reaksiyonu (pH)

1:2.5 oranında toprak: su (10 g:25 ml) karışımı çalkalama makinesinde 5 dakika çalkalandıktan sonra cam elektrotlu pH- metre ile ölçülmüştür (Jackson 1958).

2.2.9.4. Toprağın Fiziksel Analizi

Hidrometrik yöntemin uygulandığı toprak taneciklerinin büyüklüklerine göre kum, silt ve kil olarak toprak içerisindeki yüzde içerikleri (toprak tekstürü) Bouyoucos Hidrometre yöntemi ile ölçülmüştür (Bouyoucos 1951). Bu yöntemde taneciklerin süspansiyonda çökme hızından büyüklükleri hesaplanmaktadır. Toprakların tekstürüne göre; Soil Survey Staff' daki (1951) tekstür üçgeni esas alınarak tekstür sınıfları belirlenmiştir.

2.2.9.5. Toprağın Kireç İçeriği

Toprakta bulunan kalsiyum karbonat' ın (CaCO_3) seyreltik hidroklorik asit (HCl) ile tepkimesi sonucu açığa çıkan karbondioksit miktarının kapalı bir sistemde (Scheibler kalsimetresi) standart sıcaklık ve basınç altındaki karbondioksit gazı hacminden volümetrik yöntem ile hesaplanarak ölçülmüştür (Çağlar 1958).

2.2.9.6. Toprağın Toplam Azot Miktarının Tayini

Toprak örneklerindeki toplam azot (N) miktarı, standart Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde yaş yakma ile organik azot (NH₄)₂SO₄ (Amonyum sülfat)' a çevrilerek amonyum, borik asit içerisinde damıtılmış ve daha sonra damıtılan örnek sülfürik asit (H₂SO₄) ile titre edilmiştir. Nötralizasyon için sarf edilen sülfürik asit miktarından toplam azot hesaplanmıştır (Bremner, 1965).

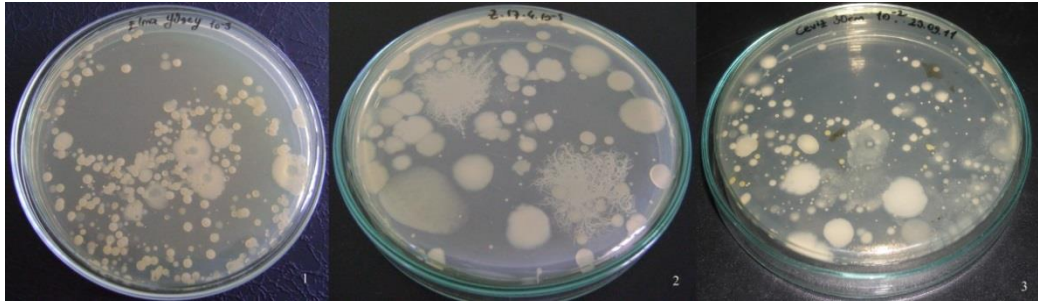
2.2.9.7. Toprak Neminin Hesaplanması

Penetrometre ölçümü sırasında topraktaki nem miktarının tespit edilmesi amacıyla, 0-30 cm ve 30- 60 cm aralığındaki topraktan örnekleme yapılmış ve bu örneklerin ıslak ağırlıkları (W) saptandıktan sonra, kurutma fırında 105 °C' de minimum 24 saat kurutulmuş ve kuru ağırlığı (W_k) saptanmıştır. Daha sonra elde edilen bu değerler kullanılarak toprağın nem oranı (N_y) yüzde olarak hesaplanmıştır (Phillips ve Phillips 1984).

3. BULGULAR

3.1. Topraklardan Bakteri İzolasyonu ve Saklanması

Balıkesir ili sınırları içinde bulunan 8 farklı lokaliteden toplamda 30 farklı toprak örneği alınmıştır (Çizelge 2.10.). Bakteri izolasyonu sonrasında inkübe edilen plaklardan yapılan sayımlar Çizelge 3.1.' de gösterilmiştir. Buna göre toplam canlı bakteri sayısı $1.7 \cdot 10^4$ ile $9.5 \cdot 10^6$ arasında değişiklik göstermektedir. Bakteri sayımlarının ve izolasyonlarının yapıldığı petrilerden birkaçı şekil 3.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 1 numaralı petri Elma ağacı yüzey toprağı örneğine (10^{-3} dilüsyon), 2 numaralı petri zeytin 4 ağacı 17 cm derinliğindeki toprak örneğine (10^{-3} dilüsyon) ve 3 numaralı petri ise ceviz ağacının 30 cm derinliğindeki toprak örneğine (10^{-2} dilüsyon) aittir.

Çizelge 3.1. Toprak örneklerindeki toplam canlı bakteri sayıları.

Toprak örneği	Bakteri sayısı (kob/ ml)
1. Zeytin yüzey	$6.9 \cdot 10^6$
1. Zeytin 10cm	$6.5 \cdot 10^5$
1. Zeytin 30 cm	$5.2 \cdot 10^5$
1. Zeytin 50 cm	$1.3 \cdot 10^5$
2. Zeytin yüzey	$1 \cdot 10^6$
2. Zeytin 12 cm	$1.7 \cdot 10^6$
2. Zeytin 30 cm	$3.5 \cdot 10^5$
2. Zeytin 56 cm	$4.4 \cdot 10^5$
3. Zeytin yüzey	$2.7 \cdot 10^7$
3. Zeytin 10 cm	$4.5 \cdot 10^6$
3. Zeytin 30 cm	$3 \cdot 10^6$
3. Zeytin 55 cm	$8 \cdot 10^6$
4. Zeytin yüzey	$9.5 \cdot 10^6$
4. Zeytin 17 cm	$2.7 \cdot 10^6$
4. Zeytin 30 cm	$1.1 \cdot 10^6$

Çizelge 3.1. (Devam) Toprak örneklerindeki toplam canlı bakteri sayıları.

4. Zeytin 52 cm	1.08*10 ⁶
5. Zeytin yüzey	8.8*10 ⁵
5. Zeytin 15 cm	7.4*10 ⁵
5. Zeytin 30 cm	2.6*10 ⁵
5. Zeytin 52 cm	1.7*10 ⁴
1. Elma yüzey	6.31*10 ⁶
1. Elma 20 cm	4*10 ⁵
1. Elma 30 cm	3,1*10 ⁵
1. Elma 50 cm	2,8*10 ⁵
1. Ceviz yüzey	2.29*10 ⁵
1. Ceviz 30 cm	5.06*10 ⁴
1. Ceviz 60 cm	4*10 ⁵
Zeytin fidan	7.8*10 ⁶
Elma fidan	1.24*10 ⁶
Ceviz fidan	1*10 ⁶

Tek koloni halinde saflaştırılan 264 bakteriyel (Çizelge 3.2.) izolat bitki büyümesini teşvik eden özellikleri bakımından tarama çalışmalarında kullanılmak üzere saf kültür halinde -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Saf olarak elde edilen bakteri izolatları

Örnek numarası	İzolat numarası	Örnek numarası	İzolat numarası	Örnek numarası	İzolat numarası
1. E&C	C.Y.1.1	3. Zeytin 1	Z.10.1.3	19. Zeytin 3	Z.30.3.10
2. E&C	C.Y.1.9	4. Zeytin 1	Z.10.1.4	20. Zeytin 3	Z.30.3.4
3. E&C	C.30.1.11	5. Zeytin 1	Z.10.1.5	21. Zeytin 3	Z.30.3.7
4. E&C	C.30.1.9	6. Zeytin 1	Z.10.1.6	22. Zeytin 3	Z.30.3.6
5. E&C	C.30.1.12	7. Zeytin 1	Z.10.1.7	23. Zeytin 3	Z.Y.3.2
6. E&C	C.30.1.10	8. Zeytin 1	Z.10.1.8	24. Zeytin 3	Z.Y.3.1
7. E&C	C.30.1.8	9. Zeytin 1	Z.10.1.10	25. Zeytin 3	Z.Y.3.5
8. E&C	C.Y.1.1	10. Zeytin 1	Z.10.1.12	26. Zeytin 3	Z.Y.3.6
9. E&C	C.Y.1.13	11. Zeytin 1	Z.Y.1.1	27. Zeytin 3	Z.10.3.5
10. E&C	C.Y.1.3	12. Zeytin 1	Z.Y.1.2	28. Zeytin 3	Z.10.3.6
11. E&C	C.Y.1.7	13. Zeytin 1	Z.Y.1.3	29. Zeytin 3	Z.55.3.8
12. E&C	E.Y.1.4	14. Zeytin 1	Z.Y.1.4	30. Zeytin 3	Z.55.3.7
13. E&C	E.Y.1.5	15. Zeytin 1	Z.Y.1.7	31. Zeytin 3	Z.Y.3.9
14. E&C	E.Y.1.16	16. Zeytin 1	Z.Y.1.8	32. Zeytin 3	Z.Y.3.7
15. E&C	C.60.1.6	17. Zeytin 1	Z.Y.1.10	33. Zeytin 3	Z.10.3.10
16. E&C	C.60.1.2	18. Zeytin 1	Z.Y.1.11	34. Zeytin 3	Z.10.3.9.1
17. E&C	E.Y.1.1	19. Zeytin 1	Z.Y.1.12	35. Zeytin 3	Z.10.3.1
18. E&C	E.Y.1.13	20. Zeytin 1	Z.Y.1.13	1. Zeytin 4	Z.52.5.8

Çizelge 3.2. (Devam) Saf olarak elde edilen bakteri izolatları

19. E&C	C.60.1.13	21. Zeytin 1	Z.Y.1.14	2. Zeytin 4	Z.52.5.5
20. E&C	E.Y.1.7.1	22. Zeytin 1	Z.Y.1.15	3. Zeytin 4	Z.30.5.1
21. E&C	C.60.1.8	23. Zeytin 1	Z.Y.1.16	4. Zeytin 4	Z.30.5.3
22. E&C	C.60.1.5	24. Zeytin 1	Z.50.1.8	5. Zeytin 4	Z.52.5.6
23. E&C	C.60.1.14	25. Zeytin 1	Z.50.1.7	6. Zeytin 4	Z.52.5.1
24. E&C	C.60.1.12	26. Zeytin 1	Z.50.1.6	7. Zeytin 4	Z.52.5.2
25. E&C	E.20.1.7.1	27. Zeytin 1	Z.50.1.3	8. Zeytin 4	Z.Y.4.8
26. E&C	E.20.1.5.1	28. Zeytin 1	Z.50.1.2	9. Zeytin 4	Z.Y.4.6
27. E&C	E.20.1.1	29. Zeytin 1	Z.50.1.1	10. Zeytin 4	Z.17.4.3
28. E&C	E.20.1.7	30. Zeytin 1	Z.30.1.11	11. Zeytin 4	Z.17.4.4
29. E&C	E.20.1.5	31. Zeytin 1	Z.30.1.10	12. Zeytin 4	Z.17.4.2
30. E&C	E.20.1.4	32. Zeytin 1	Z.30.1.9	13. Zeytin 4	Z.17.4.7
31. E&C	E.20.1.9	33. Zeytin 1	Z.30.1.8	14. Zeytin 4	Z.17.4.8
32. E&C	E.20.1.2	34. Zeytin 1	Z.30.1.7	15. Zeytin 4	Z.17.4.6
33. E&C	E.20.1.10	35. Zeytin 1	Z.30.1.6	16. Zeytin 4	Z.30.4.1
34. E&C	E.20.1.2.1	36. Zeytin 1	Z.30.1.5	17. Zeytin 4	Z.30.4.8
35. E&C	E.20.1.6	37. Zeytin 1	Z.30.1.1	18. Zeytin 4	Z.30.4.2
36. E&C	E.50.1.3	38. Zeytin 1	Z.30.1.2	19. Zeytin 4	Z.55.4.5
37. E&C	E.50.1.5	39. Zeytin 1	Z.30.1.3	20. Zeytin 4	Z.55.4.8
38. E&C	E.50.1.4	40. Zeytin 1	Z.30.1.4	21. Zeytin 4	Z.17.4.5
39. E&C	E.50.1.7	1. Zeytin 2	Z.Y.2.7	22. Zeytin 4	Z.17.4.1
40. E&C	E.50.1.9	2. Zeytin 2	Z.Y.2.6	23. Zeytin 4	Z.Y.4.5
41. E&C	E.50.1.11	3. Zeytin 2	Z.Y.2.2	24. Zeytin 4	Z.Y.4.2
42. E&C	E.50.1.1	4. Zeytin 2	Z.Y.2.1	25. Zeytin 4	Z.Y.4.3
43. E&C	E.50.1.2	5. Zeytin 2	Z.12.2.3	26. Zeytin 4	Z.Y.4.4
44. E&C	E.20.1.3	6. Zeytin 2	Z.12.2.1	27. Zeytin 4	Z.Y.4.9
45. E&C	E.20.1.8	7. Zeytin 2	Z.12.2.8	28. Zeytin 4	Z.Y.4.10
46. E&C	E.20.1.10	8. Zeytin 2	Z.30.2.9	29. Zeytin 4	Z.Y.4.7
47. E&C	E.30.1.14	9. Zeytin 2	Z.30.2.5	30. Zeytin 4	Z.30.4.5
48. E&C	E.20.1.6	10. Zeytin 2	Z.30.2.4	31. Zeytin 4	Z.30.4.6
49. E&C	E.20.1.11	11. Zeytin 2	Z.56.2.11	32. Zeytin 4	Z.30.4.7
50. E&C	E.20.1.4	12. Zeytin 2	Z.56.2.9	33. Zeytin 4	Z.30.4.4
1. Fidan	Z.F.1	13. Zeytin 2	Z.56.2.7	34. Zeytin 4	Z.30.4.3
2. Fidan	Z.F.2	14. Zeytin 2	Z.56.2.1	35. Zeytin 4	Z.20.1.8
3. Fidan	Z.F.3	15. Zeytin 2	Z.56.2.8	1. Zeytin 5	E.20.1.8
4. Fidan	Z.F.4	16. Zeytin 2	Z.56.2.3	2. Zeytin 5	E.20.1.12
5. Fidan	Z.F.5	17. Zeytin 2	Z.56.2.5	3. Zeytin 5	E.50.1.1
6. Fidan	Z.F.6	18. Zeytin 2	Z.56.2.12	4. Zeytin 5	Z.Y.5.1
7. Fidan	Z.F.7	19. Zeytin 2	Z.56.2.6	5. Zeytin 5	Z.Y.5.5
8. Fidan	Z.F.8	20. Zeytin 2	Z.30.2.3	6. Zeytin 5	Z.Y.5.6
9. Fidan	Z.F.9	21. Zeytin 2	Z.Y.2.3	7. Zeytin 5	Z.Y.5.7
10. Fidan	Z.F.10	22. Zeytin 2	Z.12.2.10	8. Zeytin 5	Z.Y.5.9
11. Fidan	Z.F.11	23. Zeytin 2	Z.12.2.2	9. Zeytin 5	Z.Y.5.8
12. Fidan	Z.F.12	24. Zeytin 2	Z.12.2.4	10. Zeytin 5	Z.Y.5.12
13. Fidan	Z.F.13	25. Zeytin 2	Z.12.2.5	11. Zeytin 5	Z.Y.5.2
14. Fidan	C.F.1	26. Zeytin 2	Z.12.2.9	12. Zeytin 5	Z.Y.5.10

Çizelge 3.2. (Devam) Saf olarak elde edilen bakteri izolatları

15. Fidan	C.F.2	27. Zeytin 2	Z.12.2.7	13. Zeytin 5	Z.Y.5.11
16. Fidan	C.F.3	28. Zeytin 2	Z.30.2.7	14. Zeytin 5	Z.Y.5.3
17. Fidan	C.F.4	29. Zeytin 2	Z.Y.2.5	15. Zeytin 5	Z.Y.5.4
18. Fidan	C.F.5	30. Zeytin 2	Z.55.4.8	16. Zeytin 5	Z.52.5.7
19. Fidan	C.F.7	31. Zeytin 2	Z.55.4.5	17. Zeytin 5	Z.15.5.3
20. Fidan	C.F.8	32. Zeytin 2	Z.30.4.5	18. Zeytin 5	Z.15.5.2
21. Fidan	C.F.10	33. Zeytin 2	Z.56.2.4	19. Zeytin 5	Z.15.5.4
22. Fidan	C.F.11	1. Zeytin 3	Z.Y.3.4	20. Zeytin 5	Z.15.5.6
23. Fidan	E.F.1	2. Zeytin 3	Z.Y.3.3	21. Zeytin 5	Z.15.5.8
24. Fidan	E.F.2	3. Zeytin 3	Z.Y.3.8	22. Zeytin 5	Z.15.5.5
25. Fidan	E.F.3	4. Zeytin 3	Z.10.3.7	23. Zeytin 5	Z.15.5.9
26. Fidan	E.F.4	5. Zeytin 3	Z.10.3.4	24. Zeytin 5	Z.15.5.1
27. Fidan	E.F.5	6. Zeytin 3	Z.10.3.3	25. Zeytin 5	Z.52.5.3
28. Fidan	E.F.6	7. Zeytin 3	Z.30.3.2	26. Zeytin 5	Z.30.5.12
29. Fidan	E.F.7	8. Zeytin 3	Z.30.3.3	27. Zeytin 5	Z.30.5.8
30. Fidan	E.F.8	9. Zeytin 3	Z.30.3.1	28. Zeytin 5	Z.30.5.7
31. Fidan	E.F.9	10. Zeytin 3	Z.30.3.8	29. Zeytin 5	Z.30.5.5
32. Fidan	E.F.10	11. Zeytin 3	Z.55.3.6	30. Zeytin 5	Z.30.5.9
33. Fidan	E.F.11	12. Zeytin 3	Z.55.3.5	31. Zeytin 5	Z.30.5.10
34. Fidan	E.F.12	13. Zeytin 3	Z.55.3.4	32. Zeytin 5	Z.30.5.11
35. Fidan	E.F.13	14. Zeytin 3	Z.55.3.3	33. Zeytin 5	Z.30.5.6
36. Fidan	C.F.6	15. Zeytin 3	Z.55.3.2	34. Zeytin 5	Z.52.5.9
37. Fidan	C.F.9	16. Zeytin 3	Z.Y.4.1	35. Zeytin 5	E.20.1.13
1. Zeytin 1	Z.10.1.1	17. Zeytin 3	Z.55.4.7		
2. Zeytin 1	Z.10.1.2	18. Zeytin 3	Z.10.3.2		

3.2. Antagonistik Aktivite Testlerinin sonuçları

3.2.1. Antibakteriyel Aktivite Test Sonuçları

Deney kapsamında kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.11.' de gösterilmiştir. Toprakten izole edilen bakterilerin nutrient broth ortamında 2 gün 28 ± 2 °C' de üretilmesinin ardından 100 µl patojen mikroorganizmalar yayılmış ve çukur çapı 8 mm olan kuyucuklara sahip olan King's B agar besiyerine izole edilen mikroorganizmalardan 100 µl örnek koyularak 2 gün inkübasyon sonrasında oluşan inhibisyon zon sonuçları mm cinsinden kaydedilmiştir. Antibakteriyel etkiye sahip bakterilerin yüklendiği çukurlar etrafında şeffaf inhibisyon oluşumları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.). Sonuçlar Çizelge 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8. ve 3.9.' da gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 1 numaralı petride Z.30.4.1 numaralı izolatın *Pseudomonas pv. glycine* üzerine etkisi, 2 numaralı petride E.F.9 ve E.F.11 numaralı izolatların *Pseudomonas pv. phaseolicola* NCPP B52 üzerine etkisi ve 3 numaralı petride ise Z.10.1.8 numaralı izolatın *Pseudomonas syringae* üzerindeki etkisi görülmektedir.

Ceviz ve elma topraklarının yüzey ve rizosfer bölgelerinden izole edilen bakteriler ile gerçekleştirilen antibakteriyel etki test sonuçlarında 13 izolatın bakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. 6 bakteriyel izolat *Pseudomonas pv. tomato*, 9 izolat *Pseudomonas tobacco*, 6 izolat *X. campestris pv. campestris*, 5 izolat *X. campestris pv. vesicatoria*, 7 izolat *Pseudomonas syringae* üzerinde, 5 izolat *Pseudomonas pv. phaseolicola* ve 5 izolat da *Pseudomonas gingeri* üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermiştir. En fazla etki *Pseudomonas gingeri* patojen bakterisine karşı E.20.1.1. ve E.20.1.10 numaralı izolatlar tarafından 22 mm olarak gözlenmiştir. E.50.1.3 kodlu izolatın 6 patojene karşı etki göstermesine rağmen etkinlik seviyeleri 20 mm’ den fazla değildir. FAME analizi sonrası antibakteriyel etkiye sahip bu bakteriler *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* ve *Micrococcus luteus* olarak belirlemiş ve antibakteriyel aktivite sonrası meydana getirdikleri zonlar mm cinsinden Çizelge 3.3.’ de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Ceviz ve elma topraklarının yüzey ve rizosfer bölgelerindeki izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları. *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
C.30.1.10		11								
C.Y.1.3									10	
E.20.1.5.1				15						
E.20.1.1			15		12	14		18	22	
E.20.1.2			13	13		12		15		
E.20.1.10			15		11				22	
E.50.1.3		11	14		11	13	11	13		
E.50.1.11		16	15			16		12		
E.50.1.1	12		16			15		14		11
E.20.1.3				13		13			13	
E.30.1.14		15	12	15		15				
E.20.1.6		20	15	15	15				16	
E.20.1.4		11	15	11	14					

Fidan rizosferlerindeki 13 izolatın antimikrobiyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 2 izolatın *Pseudomonas fluorescens*, 8 izolatın *Pseudomonas* pv. *tomato*, 5 izolatın *Pseudomonas tobacco*, 6 izolatın *X. campestris* pv. *campestris*, 7 izolatın *X. campestris* pv. *vesicatoria*, 8 izolatın *Pseudomonas syringae*, 2 izolatın *Pseudomonas* pv. *glycine*, 10 izolatın *Pseudomonas* pv. *phaseolicola*, 5 izolatın *Pseudomonas gingeri*, 4 izolatın *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* üzerinde antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Fidan topraklarından izole edilen bakterilerin antibakteriyel aktivite test sonuçlarına göre Z.F.3, Z.F.9, E.F.6 ve E.F.9 izolatların neredeyse tüm patojen bakterilere etkin oldukları gözlenmekle birlikte en fazla antibakteriyel etki zeytin rizosferinden izole edilen Z.F.9 numaralı izolat olup *X. campestris* pv. *campestris* patojenine karşı 40 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bütün patojen bakterilere karşı antibakteriyel etki gösteren izolat ise E.F.9 numaralı izolattır. Antibakteriyel etkiye sahip bu bakteriler FAME analizi sonrasında *Pseudomonas putida*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Ewingella americana* ve *Paenibacillus macerans*

olarak tanımlanmış ve antibakteriyel etkileri inhibisyon zon çapı olarak mm cinsinden Çizelge 3.4.' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. Fidan rizosferinden elde edilen izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.F.3		20			25	16		14		14
Z.F.8				24				15		
Z.F.9		18	14	40	16	14		17	22	27
C.F.1		17	13			17		11		
C.F.7	10	19								
C.F.10		22		20					15	
C.F.11					16	20	19	12		
E.F.1		18			14			12		
E.F.5			18		18			12	24	
E.F.6		21	19	30	16	15		18		24
E.F.9	13	18	14	31	19	20	20	18	30	15
E.F.11						25		13		
E.F.13				16		20			20	

Zeytin 1 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan 25 izolatın antibakteriyel bitki patojenleri karşı etki göstermiştir. 1 izolatın *Pseudomonas fluorescens*, 7 izolatın *Pseudomonas* pv. *tomato*, 6 izolatın *Pseudomonas tobacco*, 11 izolat *X. campestris* pv. *campestris*, 11 izolat *X. campestris* pv. *vesicatoria*, 9 izolatın *Pseudomonas syringae*, 10 izolatın *Pseudomonas* pv. *glycine*, 2 izolatın *Pseudomonas* pv. *phaseolicola*, 12 izolatın *Pseudomonas gingeri*, 5 izolatın da *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği kaydedilmiştir. Z.30.1.8 *Pseudomonas gingeri* üzerinde 26 mm' lik inhibisyon zonu ve Z.10.1.8/1.6, *X. campestris* pv. *vesicatoria* üzerinde 26 mm' lik inhibisyon zonu ile antibakteriyel aktivite göstermişlerdir (Çizelge 3.5.). Zeytin 1 toprağından izole edilen ve antibakteriyel etki test yapılan izolatlar FAME analizi

ile *Bacillus cereus*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus atrophaeus* olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Zeytin 1 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.10.1.1					14					
Z.10.1.2				13						
Z.10.1.3									17	13
Z.10.1.6		15	16	20	20	12	19		17	
Z.10.1.7				13						
Z.10.1.8/1.6		18	17	15	26	12	20		16	
Z.Y.1.1							24			
Z.Y.1.4					18					
Z.Y.1.7										17
Z.Y.1.8				12			13			
Z.Y.1.10				22						15
Z.Y.1.11		18				13				
Z.Y.1.12			17		15	15	17		15	
Z.Y.1.15									20	17
Z.50.1.3				16	13	13	12			
Z.50.1.2		18							12	
Z.50.1.1		19	18		20	18	20		20	
Z.30.1.10	11				12				12	19
Z.30.1.9				18	12	12	15		14	
Z.30.1.8		20	17	14	16	20	22	13	22	
Z.30.1.7		15	17		18	18	20	16	20	
Z.30.1.1				12						
Z.30.1.2									20	
Z.30.1.4				20						

Zeytin 2 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatlar ile gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite testi sonuçlarına göre en yüksek antimikrobiyal etkiyi Z.Y.2.1 izolatı *Pseudomonas gingeri* üzerinde 30 mm' lik inhibisyon zonu ile göstermiştir. *Pseudomonas gingeri* ve *X. campestris* pv. *campestris* üzerinde 2 bakteri izolatı da 20 mm üzerinde inhibisyon zonu

oluşturmuştur. Bir diğer etkinlik gösteren izolat ise *Paenibacillus macerans* olarak edilen Z.30.2.9 numaralı izolatı olup *Pseudomonas tobacco*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas gingeri* ve *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* üzerinde antibakteriyal etki göstermiştir. Antibakteriyal aktivite test sonuçları Çizelge 3.6.’ da mm cinsinden gösterilmektedir.

Çizelge 3.6. Zeytin 2 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları. *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.Y.2.1	9		15	22	22		10	10	30	12
Z.30.2.9			14	22					25	13

Zeytin 3 toprağı izolatları ile gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite testleri ile 4 izolat inhibisyon zonu oluşturmuştur. *X. campestris* pv. *campestris* 1 izolat tarafından, *X. campestris* pv. *campestris* 4 izolat tarafından, *Pseudomonas syringae* 1 izolat tarafından ve *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* ise 1 izolat tarafından inhibe edilmişlerdir. En fazla etki Z.10.3.7 ve Z.55.3.4 izolatları tarafından *X. campestris* pv. *campestris* üzerinde 20 mm inhibisyon zonu ile belirlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* pv. *tomato*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* ve *Pseudomonas* pv. *glycine* bitki patojenlerine karşı test edilen hiçbir izolat etki oluşturmamıştır. Antibakteriyal aktivite test sonuçları Çizelge 3.7.’ de mm cinsinden gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Zeytin 3 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.Y.3.8				15				11	14	
Z.10.3.7			11	20				12		12
Z.55.3.4				20		10				
Z.Y.3.1				10						

Zeytin 4 toprağı izolatları ile gerçekleştirilen antibakteriyel etki testi sonrası 10 izolat antibakteriyel etki göstermiş (Çizelge 3.8.) ve Z.Y.4.8 kodlu izolatın 8 patojen üzerinde, Z.55.5.8 ile Z.30.4.1 kodlu izolatların 7 patojen bakteri üzerinde inhibisyon etkileri gözlenmiştir. Z.55.5.8 numaralı izolat *Pseudomonas* pv. *tomato* üzerinde 26 mm' lik, Z.Y.4.8 *X. campestris* pv. *campestris* üzerinde 22 mm'lik, Z.30.4.1 *Pseudomonas* pv. *glycine* üzerinde 25 mm' lik ve *Pseudomonas gingeri* üzerinde ise 24 mm' lik inhibisyon zonu meydana getirmiştir. *Pseudomonas fluorescens* 2 izolat, *Pseudomonas* pv. *tomato* 7 izolat tarafından, *Pseudomonas tobacco* 7 izolat, *X. campestris* pv. *campestris* 5 izolat, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 3 izolat, *Pseudomonas syringae* 8 izolat, *Pseudomonas* pv. *glycine* 7 izolat, *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* 4 izolat, *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* 5 izolat tarafından inhibe edilmiştir. Antibakteriyel üretim yapabilen izolatların FAME analizi sonrasında; *Pseudomonas agarici*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia gladioli*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* ve *Paenibacillus pabuli* olarak tanımlanmıştır. Çizelge 3.8.' de izolatların antibakteriyel etkinliği mm cinsinden belirtilmiştir.

Çizelge 3.8. Zeytin 4 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8-P	33-P	75-3	1-P	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.52.5.8	10	23	15			12	11		11	10
Z.52.5.5		16	12			12	11		10	9
Z.30.5.1		16				14	11	10	10	11
Z.52.5.6						11	11			
Z.52.5.1	10	14	15			10	10	10	14	10
Z.Y.4.8		18	17	22	15	18	20	17	18	
Z.30.4.1		18	20	14	15	20	25		24	
Z.30.4.8			13	12					15	
Z.30.4.2		14	14	14	15	14		13		10
Z.Y.4.10				14						

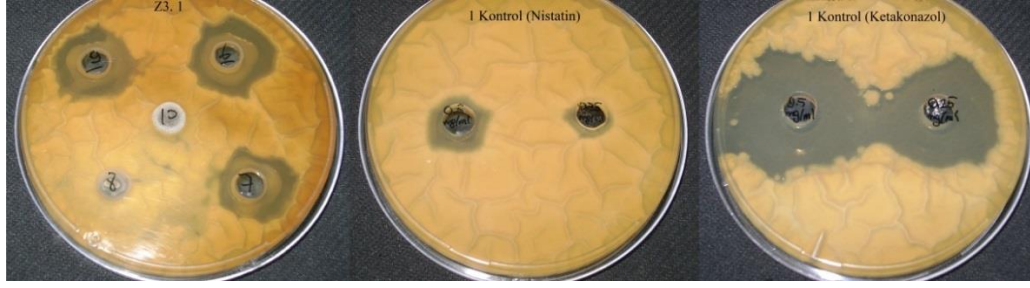
Zeytin 5 toprağından elde edilen bakteriyel izolatlar ile gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite test sonuçları sonrasında etkinlik gösteren toplam 10 bakteri belirlenmiştir (Çizelge 3.9.). 1 izolat 6 patojene karşı, 2 izolat 4 patojene karşı etkinlik göstermektedir. 20 mm üzerinde etki görülen tek izolat Z.52.5.9 olup 26 mm' lik inhibisyon zonu ile *Pseudomonas gingeri* üzerinde etkindir. 2 izolat (Z.Y.5.9 ve Z.30.5.10) *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* dışındaki patojenlere karşı antibakteriyel etki göstermiştir ve FAME analizi sonucunda Z.Y.5.9 izolatı *Bacillus subtilis* ve Z.30.5.10 izolatı da *Paenibacillus larvae pulvifaciens* olarak tanımlanmışlardır. Bu bakteriler dışında diğer izolat *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.9. Zeytin ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden saflaştırılan izolatların antimikrobiyel aktivite test sonuçları *Pseudomonas fluorescens* (B-130), *Pseudomonas* pv. *tomato* (32-P), *Pseudomonas tobacco* (8-P), *X. campestris* pv. *campestris* (33-P), *X. campestris* pv. *vesicatoria* NRLL B-1459 (75-3), *Pseudomonas syringae* (1-P), *Pseudomonas* pv. *glycine* (PG1-T), *Pseudomonas* pv. *phaseolicola* NCPP B52 (N52), *Pseudomonas gingeri* (3146), *Pseudomonas gladioli* pv. *agricola* (RR3-1).

Patojen Bakteri	B- 130	32-P	8	33-P	75-3	1	PG1 T	N52	3146	RR3 1
Z.Y.5.1									9	
Z.Y.5.9		15	18	18	17	17	18	15	20	
Z.Y.5.11					10	10	12			
Z.15.5.4					13			13	15	10
Z.15.5.6								14		
Z.52.5.3				17						
Z.30.5.7		12				17	11	15		
Z.30.5.5							9			
Z.30.5.10		12	16	18	15	19	19	18	18	
Z.52.5.9				11	13	20	13	16	23	

3.2.2. Antifungal Aktivite Test Sonuçları

PDA besiyeri üzerine ekilerek spor oluşturmaları için 5-7 gün 28 ± 2 °C’ de inkübe edilen fungusların spor sayımları Mahmood ve ark. (1999) gibi gerçekleştirilmiş ve fungus sporlarının bulunduğu petri yüzeyine 8 mm çaplı çukurlar açılarak nütrient brothda üretilen saf kültürlerden 200 µl ekim yapılmış ve 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Nütrient broth negatif kontrol nistatin ve ketakonazol antifungalleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çukurlar etrafında şeffaf inhibisyon zonu oluşumları pozitif olarak değerlendirilmiş ve bakteri izolatı antifungal etkiye sahip olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. Z.30.3.1, Z.10.3.3, Z.30.3.2 izolatları ve kontrol grubu olarak seçilen antifungal ajanların *A. parasiticus* NRRL 2999 üzerindeki etkileri.

Elma ve ceviz topraklarından toplanan izolatlardan sadece elma ağacından izole edilen bakterilerde antifungal etkiye sahip üyelere rastlanılmıştır. E.20.1.9 numaralı ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan bakteri *A. fumigatus*, *G. graminis*, *A. niger* ve *P. notatum* patojen fungus üzerinde kontrol gruplarından daha fazla etkinliğe sahip olarak kaydedilmiştir. E.20.1.9 numaralı ve *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan bakteriyel izolat *A. niger* ve *P. notatum* patojen fungus üyelerine karşı kontrol gruplarının üzerinde etki göstermiştir. E.20.1.9 numaralı ve *Bacillus megaterium* olarak tanımlanan bakteriyel izolat *G. graminis* ve *A. niger* küfü üzerinde nistatin ile aynı göstermektedir. *P. notatum* fungus üzerinde ise daha fazla etkinlik göstermiştir. E.50.1.3 numaralı ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan bakteriyel izolat *G. graminis*, *F. moniliforme*, *A. niger* ve *P. notatum* fungus üyeleri üzerinde kontrol grubundan daha fazla etkinlik göstermiştir. E.50.1.11 numaralı ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan örnek *F. moniliforme* ve *P. notatum* küfleri üzerinde kontrol grupları kadar ve *G. graminis* patojen küfü üzerinde ise kontrol grubundan daha fazla etkinlik göstermiştir. E.20.1.3 numaralı ve *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan izolat *G. graminis* ve *F. moniliforme* numaralı funguslardan daha fazla etkinlik göstermişken *A. fumigatus*, *A. niger* ve *P. notatum* patojen küfleri üzerinde kontrol grupları kadar etkinlik göstermiştir. E.20.1.8 numaralı ve *Arthrobacter globiformis* olarak tanımlanan bakteriyel izolat *F. moniliforme* ve *A. niger* küfüne kontrol grubundan karşı daha fazla etkinlik göstermiş, *G. graminis* ve *P. notatum* küfü ile de aynı etkiyi göstermiştir. E.20.1.11. numaralı ve *Staphylococcus kloosi* olarak tanımlanan bakteriyel izolat ise *G. graminis*, *A. niger*

ve *P. notatum* küfleri üzerinde kontrol grupları kadar etkinlik göstermiştir. Çizelge 3.10. ve Çizelge 3.17.’ de antifungal etki sonuçları mm cinsinden belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. Elma ve ceviz ağaçlarının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
E.20.1.1					12	14
E.20.1.9		30	33		22	56
E.20.1.2					20	18
E.20.1.10			17	12	20	40
E.20.1.2.1						16
E.50.1.3			30	32	28	40
E.50.1.11			30	16		28
E.20.1.3		15	20	20	18	26
E.20.1.8			17	20	25	30
E.30.1.14			11			16
E.20.1.11			15		16	25

Fidan rizosferindeki 12 izolat antifungal etki göstermiştir. *A. parasiticus* patojen küfü 5 izolat, *A. fumigatus* patojen küfü 5 izolat, *G. graminis* 9 izolat, *F. moniliforme* 7 izolat, *A. niger* 7 izolat ve *P. notatum* patojen küfünün büyümesi 10 izolat tarafından inhibe edilmiştir. Fidan rizosferinden elde edilen bakteriler ile gerçekleştirilen antifungal etki testleri sonrasında Z.F.1, C.F.11 (*Bacillus subtilis*) ve E.F.4 (*Bacillus subtilis*) tüm patojen fungus üyeleri üzerinde etki göstermekle birlikte E.F.4 numaralı izolat tüm küfler üzerinde kontrol gruplarından fazla etkinlik göstermiştir. Diğer etkinlik gösteren bakteri türleri arasında FAME analizi sonrasında belirlenen izolatlardan *Bacillus atrophaeus*, *Pseudomonas agarici*, *Paenibacillus macerans* ve *Bacillus subtilis* türleri ile karşılaşılmıştır. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.11. ve 3.17.’ de mm cinsinden gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Fidan rizosferinden elde edilen bakterilerin antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
Z.F.1	12	15	15	12	15	25
Z.F.8						15
C.F.1			12	16	18	22
C.F.5				14		
C.F.7		12	22			20
C.F.11	12	12	38	36	24	40
E.F.1			12			
E.F.4	32	20	26	50	25	40
E.F.5		11	12	14	14	20
E.F.6	14					
E.F.11	14		30	24	25	38
E.F.13			12		15	20

Zeytin 1 ağacından elde edilen bakteriler ile gerçekleştirilen antifungal aktivite test sonuçlarında 13 izolat etkin olarak kaydedilmiştir. *A. parasiticus* hiçbir izolat ile inhibe edilmemiştir. *A. fumigatus* 1 izolat, *G. graminis* 5 izolat, *F. moniliforme* 5 izolat, *A. niger* 7 izolat ve *P. notatum* patojen küfünün tüm izolatlar tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir. En fazla etkinliğe sahip olan Z.Y.1.12 (*Paenibacillus alvei*) ve Z.50.1.1. (*Bacillus coagulans*) numaralı izolatlar *G. graminis*, *F. moniliforme* ve *A. niger* patojen küflerine karşı kontrol grupları ile aynı etkiyi gösterirken *P. notatum* üyeleri üzerinde kontrol gruplarından daha fazla etkinlik göstermiştir. Bu izolatlar haricinde fungal etkinliğe sahip olan ve identifikasyonu tamamlanmış bakteriler; *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus atrophaeus* ve *Bacillus cereus* türleridir. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.12. ve 3.17.' de mm cinsinden gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. Zeytin 1 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807).

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
Z.10.1.6		20	22	16	20	20
Z.10.1.7						16
Z.10.1.8				14	11	20
Z.Y.1.2			20		20	18
Z.Y.1.3						30
Z.Y.1.7						20
Z.Y.1.8						22
Z.Y.1.12			20	15	16	40
Z.50.1.1			16	20	20	50
Z.30.1.9						20
Z.30.1.8/1.7					20	30
Z.30.1.7			18	14	20	30
Z.30.1.6						18

Zeytin 2 ağacından elde edilen 5 bakteriyel izolatta antifungal aktivite gözlenmiştir. *A. parasiticus* ve *F. moniliforme* hiçbir izolat tarafından inhibe edilmemiştir. *A. fumigatus* 1 izolat, *G. graminis* 3 izolat, *A. niger* 2 izolat ve *P. notatum* 5 izolat tarafından inhibe edilmiştir. En fazla inhibisyon 30 mm zon çapı ile *G. graminis* ve *P. notatum* küflerine karşı kayıt edilmiştir. Z.30.2.9 numaralı izolatın *G. graminis* fungus üyesi üzerinde kontrol grubundan daha etkin olduğu gözlenmiştir. FAME analizi ile 3 izolat; *Paenibacillus larvae pulvifaciens*, *Paenibacillus macerans* ve *Pseudomonas huttiensis* olarak tanımlanmıştır. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.13. ve 3.17.' de mm cinsinden gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Zeytin 2 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
Z.Y.2.1		10	10		13	22
Z.30.2.9			30		16	30
Z.56.2.3						20
Z.30.2.3			15			
Z.Y.2.5						16

Zeytin 3 ve 4 ağacından izole edilen ve antifungal etki testi uygulanan 13 bakteriyel izolatta antifungal etkinlik belirlenmiştir. *A. parasiticus* 5 izolat, *A. fumigatus* 8 izolat, *G. graminis* 6 izolat, *F. moniliforme* 4 izolat, *A. niger* 6 izolat ve *P. notatum* 11 izolat tarafından inhibe edilmiştir. Z.10.3.3, Z.30.3.2, Z.30.3.1, Z.55.3.2 ve Z.Y.4.1 izolatları 5 patojen fungus üyesini inhibe etmiş ve antifungal etkiyi kontrol ajanlarından fazla ya da aynı seviyede göstermişler. Z.30.3.3 kodlu izolat 4 patojen fungusa karşı etki göstermiştir. En fazla antifungal inhibisyon zonu oluşturan izolat 50 mm inhibisyon çapı ile Z.30.3.1' dir. FAME analizi sonrası antifungal etkiye sahip bakteri grupları; *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Serratia fonticola* ve *Chryseobacterium balustinum* olarak tanımlanmıştır. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.14. ve 3.17.'de mm cinsinden gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. Zeytin 3 ve 4 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
Z.Y.3.3		10				20
Z.Y.3.4						20
Z.Y.3.8		15				14
Z.10.3.4		12				
Z.10.3.3	25	24	30		30	44
Z.30.3.2	20	20	24		40	40
Z.30.3.3			20	30	30	36

Çizelge 3.14. (Devam) Zeytin 3 ve 4 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Z.30.3.1	24	24	30		30	50
Z.55.3.5						20
Z.55.3.3					26	
Z.55.3.2	22	20	24	13		38
Z.Y.4.1		25	25	32	34	28
Z.55.4.7						20

Zeytin 4 ve 5 ağacından elde edilen ve antifungal aktiviteye sahip 10 izolat bulunmaktadır. *A. parasiticus* 6 izolat, *A. fumigatus* 7 izolat, *G. graminis* 3 izolat, *F. moniliforme* 6 izolat, *A. niger* 6 izolat ve *P. notatum* 8 izolat tarafından inhibe edilmiştir. Z.17.4.7 izolatı 50 mm' lik inhibisyon zonu ile *F. moniliforme* üzerinde yüksek antifungal etkiyi göstermiştir. Z.52.5.8, Z.30.5.3, Z.52.5.2, Z.17.4.8, Z.55.4.5 ve Z.17.4.5 numaralı izolatlar da etki ettikleri patojen funguslar üzerinde antifungal etkiyi kontrol grupları kadar ya da daha fazla olacak şekilde göstermişlerdir. En fazla etkiyi Z.52.5.8 numaralı izolat olan ve FAME analizi sonrasında *Pseudomonas agarici* olarak tanımlanan bakteri gerçekleştirmiş, tüm patojen funguslara *F. moniliforme* hariç kontrol gruplarından fazla etkiyi göstermiştir. FAME analizi sonrası antifungal etkiye sahip izolatlar; *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus maquariensis*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* olarak kaydedilmiştir. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.15. ve 3.17.'de mm cinsinden gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Zeytin 4 ve 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus	1	2	3	4	5	6
Bakteri						
Z.52.5.8	20	25	28	15	30	40
Z.30.5.1						12
Z.30.5.3		18	20	30	30	30
Z.52.5.2	26	26			20	22

Çizelge 3.15. (Devam) Zeytin 4 ve 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Z.17.4.7		20	20	50	30	40
Z.30.4.8	23	35		25	20	25
Z.55.4.5	20	28			22	30
Z.55.4.8				11		
Z.17.4.5	25	30		25		28
Z.30.4.7	10					

Zeytin 5 ağacından izole edilen 7 izolat antifungal ektivite göstermiştir. *A. fumigatus* 1 izolat, *G. graminis* 2 izolat, *F. moniliforme* bütün izolatlar, *A. niger* 2 izolat, *P. notatum* 3 izolat tarafından inhibe edilmiştir. En fazla antifungal etki 30 mm' lik inhibisyon zonu ile *F. moniliforme* üzerinde Z.30.5.11 kodlu izolat tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı izolat 5 farklı patojen küf üzerinde de antifungal etki göstermiştir. Bununla beraber sadece *Paenibacillus larvae pulvifaciens* olarak tanımlanan Z.30.5.11 numaralı bakteride kontrol grupları kadar yada daha fazla etkinlik göstermiştir. *A. parasiticus* patojen küfüne hiç bir bakteriyel izolat etki göstermemiştir. Antifungal etki sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 3.16. ve 3.17.' de mm cinsinden belirtilmiştir.

Çizelge 3.16. Zeytin 5 ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatların antifungal etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

Fungus Bakteri	1	2	3	4	5	6
Z.Y.5.1				12		14
Z.Y.5.9			20	18	18	18
Z.Y.5.11				18		
Z.15.5.4				20		
Z.15.5.9				15		
Z.30.5.5				10		
Z.30.5.11		16	23	30	15	26

Antifungal etkiyi daha iyi anlaşılabilir duruma getirmek adına test edilen Nistatin ve Ketakonazol antifungalların değişik konstransyonları ile gerçekleştirilen test sonuçlarına göre *A. parasiticus* küfüne karşı ketakonazole daha etkin, *A. fumigatus* küfüne nistatin daha etkin, *G. graminis* küfüne ketakonazol daha etkin, *F. moniliforme* küfünü nistatin inhie edebilirken, ketakonazol etkin değildir, *A. niger* küfüne nistatin daha etkin ve *P. notatum* küfüne karşı da nistatin etkin olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar mm cinsinden Çizelge 3.17’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. Antifungal ajanların bitki patojeni küflere karşı etkileri (1- *A. parasiticus* NRRL 2999, 2- *A. fumigatus* NRRL 163, 3- *G. graminis*, 4- *F. moniliforme* NRRL 1866, 5- *A. niger* NRRL 321, 6- *P. notatum* NRRL 807)

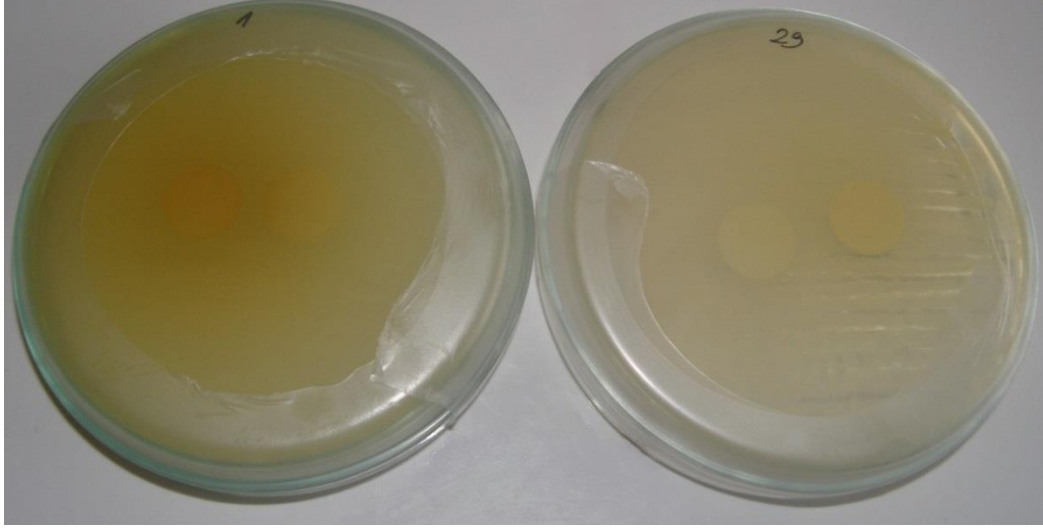
Fungus	1	2	3	4	5	6
Kontrol						
Nistatin 0.5 mg/ml	17	17	17	18	20	30
Nistatin 0.25 mg/ml	10	10	10	12	14	20
Ketoconazole 0.5 mg/ ml	40	14	30	-	17	20
Ketoconazole 0.25 mg/ ml	32	9	24	-	15	14

3.3. Bitki gelişimini teşvik eden bakterileri belirleme testleri

3.3.1. Hidrosiyonik asit testi (H.A.T)

Bitki topraklarından elde edilen bakteri izolatları modifiye nütrient agar üzerine ekilerek meydana gelen turuncu-kırmızı aralığındaki renkler pozitif olarak nitelendirilmiştir (Şekil 3.4.). Test edilen tüm bakteri izolatlarının hidrosiyonik asit üretim profilleri Ek 1.’ de belirtilmiştir. Buna göre test edilen 264 bakteri izolatından 94 adedi pozitif olarak kaydedilmiştir. Hidrosiyonik asit pozitif örnekler; 2 izolat ceviz ağacından izole edilen bakteride, 12 izolat elma ağacından izole edilen bakteride, 8 izolat ceviz fidan rizosferinden, 3 izolat elma fidan

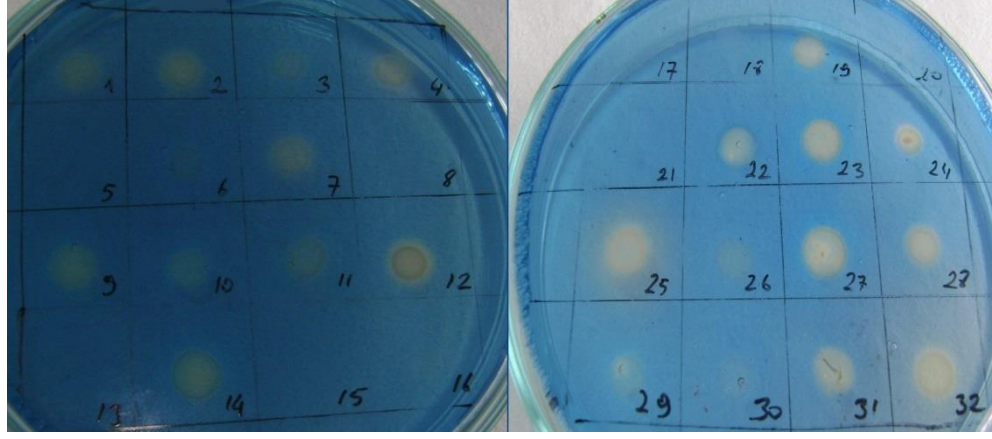
rizosferinden, 3 izolat zeytin fidan rizosferinden, 13 izolat zeytin 1 ağacından, 6 adedi zeytin 2 ağacından, 19 izolat zeytin 3 ağacından, 12 izolat zeytin 4 ağacından, 16 adedi zeytin 5 ağacında tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Hidrosiyonik aktivite pozitif izolat Z.10.1.1. (soldaki petri) ve negatif izolat Z.50.1.1. (sağdaki petri).

3.3.2. Siderofor Üretim Testi (S.Ü.T)

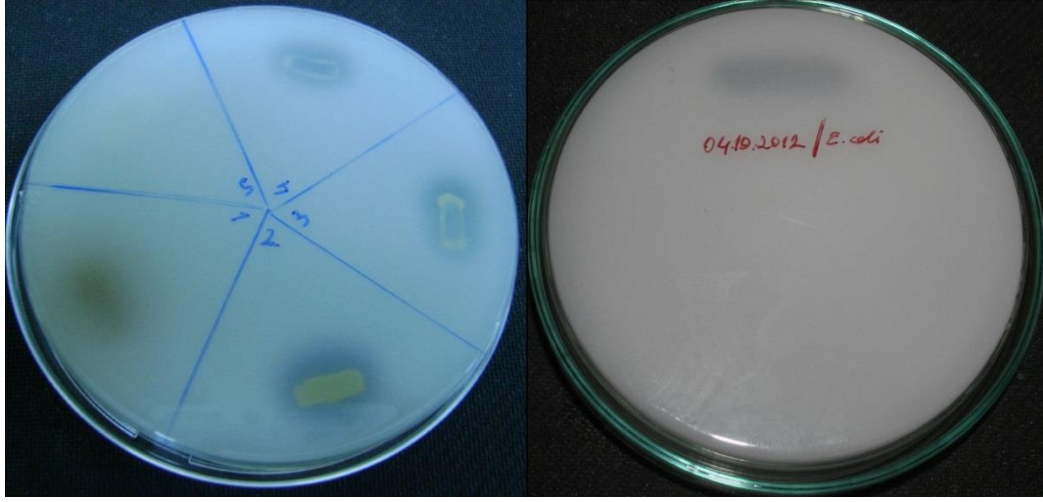
Bitki yüzey ve rizosfer bölgelerinden izole edilen ve 2 gün boyunca 28°C’ de sıvı besiyerinde üretilen bakteriler CAS agar üzerine 10 µl inoküle edilerek 2-3 gün inkübe edilen bakterilerde meydana gelen sarı, turuncu ve kırmızı halkasal oluşumlar pozitif nitelendirilmiştir. Ek 1.’ de pozitif sonuç alınan bakterilerin listesi verilmiştir. 264 bakteriyel izolat ile gerçekleştirilen deney sonrasında 77 izolatın siderofor üretimi yapabildiği belirlenmiştir. Siderofor üretimi gerçekleştirebilen; 2 izolat ceviz ağacında, 4 izolat elma ağacında, 9 izolat zeytin fidan rizosferinde, 4 izolat ceviz fidan rizosferinde, 11 izolat elma fidan rizosferinde, 11 izolat zeytin 1 ağacında, 8 izolat zeytin 2 ağacında, 13 izolat zeytin 3 ağacında, 7 izolat zeytin 4 ağacında ve 8 izolat zeytin 5 ağacında pozitif izolat belirlenmiştir. Şekil 3.5.’ te pozitif sonuç alınan bakterilerden birkaçı gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Siderofor üretimi testi sonuçları meydana gelen turuncu halkasal oluşumlar pozitif sonuçları göstermektedir.

3.3.3. Fosfat Çözünübilirliği Testi (F.Ç.T)

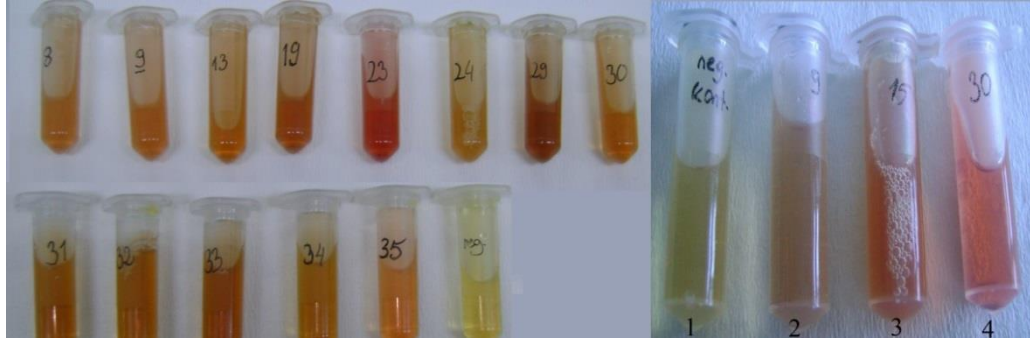
Bitki topraklarından izole edilen bakterilerin 3 gün boyunca 28°C’ de üretilmesinin ardından saf olan kolonilerden öze dolusu alınan örnekler NBRIP besiyerine ekilmişler ve meydana gelen şeffaf zonlar ile bu bakterilerin fosfat çözebilme yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6.). Fosfat çözebilen izolatların; 6’ sı zeytin 5 ağacından, 6’ sı zeytin 4 ağacından, 9’ u zeytin 3 ağacından, 7’ si zeytin 1 ağacından, 2’si elma fidan rizosferinden, 6’ sı zeytin fidan rizosferinden, 6’ sı elma ağacından izole edilen bakterilerde gözlenmiştir. Ceviz fidan ve ceviz ağacından izole edilen bakterilerin hiçbirinde fosfat çözünübilirliği gözlenmemiştir. Sonuçlar Ek 1.’ de belirtilmiştir.



Şekil 3.6. Sağdaki petride fosfat çözdüğü bilinen *E. coli* ATCC 25922’ de görülen etki sonucuna bağlı olarak soldaki petride fosfat çözebilen bakterilerin 2, 3 ve 4 numaralı örnekler olduğu gösterilmiştir.

3.3.4. İndol asetik asit testi (İ.A.A.T)

28±2 °C’ de 15 gün boyunca inkübe edilen izolatların santrifüj işleminden sonra ortofosforik asit ve Salkowski reagentine maruz bırakılmasından sonra oluşan kahverengi ve pembe renk değişimi pozitif olarak kaydedilmiştir. Test edilen 264 izolattan 98 tanesinde indol asetik asit üretimi gözlenmiştir (Şekil 3.7.). Zeytin 5 ağacı toprağından 14 izolat, zeytin 4 ağacı toprağından 9 izolat, zeytin 3 ağacı toprağından 13 izolat, zeytin 2 a ağacı toprağından 11 izolat, zeytin 1 ağacı toprağından 19 izolat, ceviz fidan rizosferinden 3 izolat, elma fidan rizosferinden 5 izolat, zeytin fidan rizosferinden 8 izolat, ceviz ağacından 2 izolat ve elma ağacından 14 izolat indol asetik asit üretebilme yeteneğinde bakteri tespit edilmiştir. Sonuçlar Ek 1.’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Soldaki şekil zeytin 3 ağacından kaydedilen pozitif ve negatif örnekleri göstermektedir.

Sağdaki şekilde ise 1 numaralı ependorf bakteriyel bir gelişme olmayan ve sadece kimyasalları içeren tüptür. 2, 3 ve 4 numaralı ependorflar ise pozitif olarak nitelendirilen renkleri temsil etmektedir.

3.3.5. Amonyak üretim testi

Pepton water besiyerinde 28 ± 2 °C’de 48 saatlik inkübasyonu ile kültüre edilen izolatların üzerlerine Nessler’ s reagenti sonrasında meydana gelen sarı-turuncu renk pozitif olarak kaydedilmiştir. 258 izolat amonyak üretimi pozitif olarak kaydedilmiştir. Çizelge 3.18.’ de amonyak üretimi negatif bakteriler gösterilmiştir. Şekil 3.8.’ de ise pozitif ve negatif örnekler gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. Amonyak üretimi negatif olan bakteri üyeleri

İzole edilen Bakteri	Amonyak üretimi	İzole edilen Bakteri	Amonyak üretimi
Z.30.5.8	Negatif	Z.55.4.5	Negatif
Z.Y.5.12	Negatif	Z.30.4.5	Negatif
Z.30.3.6	Negatif	Z.F.12	Negatif



Şekil 3.8. 22 numaralı deney tüpü Z.30.5.8 numaralı izolat olup ortadaki deney tüpü (bakteri içermemekle beraber Nessler' s reagenti uygulanmıştır) ile aynı renge sahiptir. 12 numaralı deney tüpünde ise pozitif olarak adlandırılan üyelerin oluşturduğu renk gösterilmiştir.

3.4. Bakteriyel İdentifikasyon

3.4.1. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

Bitki gelişimini teşvik eden özelliklerden H.A.T, S.ÜT, İ.A.A.T, F.Ç.T ve A.Ü.T sonuçlarına göre, bunlardan 3 veya üzeri analizde pozitif etki gösteren bakterilerin yağ asidi metil esterlerin analizine hazırlanan yağ asidi ekstraları, 'Yağ Asidi Analiz Sistemi' nde (Agilent, 6890N) TSBA50 yazılımı ile tanımlanmıştır (Sasser 1990).

Ceviz ağacının yüzey ve rizosferinden elde edilen izolatlardan sadece bir tür PGPB özelliği gösterdiğinden FAME işlemi gerçekleştirilmiştir ve sonuç *Bacillus cereus* olarak cihazda okunmuştur. Elma ağacının yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatlar ile yapılan analizlerde ise 4 izolat *Bacillus subtilis*, 4 izolat *Bacillus megaterium*, 2 izolat *Bacillus cereus*, 1 izolat *B. sphaericus*, 1 izolat *B. atrophaeus*, 1 izolat *Chryseobacterium*, 2 izolat *Arthrobacter*, 1 izolat *Staphylacoccus* ve 1 izolat *Micrococcus* grubu belirlenmiştir.

Çizelge 3.19. Elma ve Ceviz yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
C.30.1.12	0.633	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A
E.50.1.1	0.616	<i>Micrococcus luteus</i> GC subgroup D
E.50.1.3	0.631	<i>Bacillus subtilis</i>
E.50.1.11	0.369	<i>Bacillus subtilis</i>
E.30.1.14	0.377	<i>Bacillus atrophaeus</i>
E.20.1.1	0.735	<i>Bacillus subtilis</i>
E.20.1.2	0.631	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B
E.20.1.2	0.548	<i>Arthrobacter viscosus</i>
E.20.1.3	0.834	<i>Bacillus subtilis</i>
E.20.1.4	0.621	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
E.20.1.5.1	0.757	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B
E.20.1.7	0.806	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (<i>Flavobacterium</i>)
E.20.1.9	0.869	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
E.20.1.10	0.727	<i>Arthrobacter globiformis</i> GC subgroup A (some 48h)
E.20.1.11	0.705	<i>Staphylococcus kloosii</i>
E.Y.1.1	0.700	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A
E.Y.1.5	0.633	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgroup E

Fidanların rizosferinden elde edilen izolatların profilleri Çizelge 3.20.' de gösterilmiş olup ceviz fidan rizosferinden izole edilen PGPB özellikleri gösteren 5 adedi de *Bacillus* grubundadır. Elma fidan rizosferinden izole edilen PGPB üyeleri; 5 izolat *Bacillus*, 1 izolat *Paenibacillus*, 1 izolat *Pseudomonas*, 1 izolat *Ewingella* ve 1 izolat *Pantoea* grubuna dahil oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 3.20. Fidanların rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
C.F.1	0.712	<i>Bacillus atrophaeus</i>
C.F.3	0.923	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
C.F.6	0.520	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
C.F.7	0.753	<i>Bacillus atrophaeus</i>
C.F.11	0.815	<i>Bacillus subtilis</i>
E.F.1	0.597	<i>Pseudomonas agarici</i>
E.F.4	0.691	<i>Bacillus subtilis</i>
E.F.5	0.103	<i>Bacillus atrophaeus</i>
E.F.6	0.090	<i>Ewingella americana</i>
E.F.9	0.060	<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup C (<i>Enterobacter</i>)

Çizelge 3.20. (Devam) Fidanların rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

E.F.10	0.447	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgroup B (<i>Bacillus cereus</i> group)
E.F.11	0.556	<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>)
E.F.12	0.869	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
E.F.13	0.684	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.F.2	0.794	<i>Flavimonas oryzihabitans</i> (<i>Pseudomonas</i> VE2)
Z.F.3	0.541	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A
Z.F.4	0.499	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
Z.F.6	0.602	<i>Chryseobacterium balustinum</i> (<i>Flavobacterium</i>)
Z.F.7	0.407	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgroup B (<i>Bacillus cereus</i> group)
Z.F.9	0.110	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A
Z.F.10	0.789	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)

Zeytin 1 ağacı yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen ve PGPB özellikleri olduğu belirlenen izolatların FAME sonuçlarında (Çizelge 3.21.) 14 izolat *Bacillus*, 5 izolat *Paenibacillus*, 2 izolat *Pseudomonas*, 1 izolat *Sphingobacterium* ve 1 izolat *Arthrobacter* grubuna bağlı mikroorganizma bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.21. Zeytin 1 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
Z.50.1.1	0.329	<i>Bacillus coagulans</i>
Z.50.1.8	0.450	<i>Bacillus mycoides</i> GC subgroup B (<i>Bacillus cereus</i> group)
Z.30.1.2	0.586	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.30.1.6	0.679	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.30.1.7	0.546	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Z.30.1.8	0.482	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Z.30.1.9	0.671	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Z.30.1.10	0.832	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>fraxinus</i>
Z.10.1.3	0.634	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.10.1.5	0.674	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.10.1.6	0.450	<i>Paenibacillus alvei</i> GC subgroup A (<i>Bacillus</i>)
Z.10.1.1	0.602	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.10.1.8	0.437	<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>)
Z.10.1.10	0.633	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.Y.1.2	0.733	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.Y.1.3	0.674	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> GC subgroup A (<i>Flavobacterium</i>)

Çizelge 3.21. (Devam) Zeytin 1 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

Z.Y.1.4	0.681	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.Y.1.8	0.349	<i>Arthrobacter globiformis</i> GC subgroup A (some 48h)
Z.Y.1.10	0.886	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype B
Z.Y.1.12	0.535	<i>Paenibacillus alvei</i> GC subgroup A (<i>Bacillus</i>)
Z.Y.1.14	0.571	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.Y.1.16	0.569	<i>Paenibacillus macquariensis</i>

Zeytin 2 ağacı yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen ve PGPB özellikleri olduğu belirlenen izolatların FAME sonuçlarında; 2 izolat *Bacillus*, 2 izolat *Paenibacillus*, 2 izolat *Pseudomonas*, 1 izolat *Stenotrophomonas*, 1 izolat *Pantoea* grubu belirlenmiş ve Çizelge 3.22.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.22. Zeytin 2 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
Z.56.2.1	0.891	<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup A (<i>Entb. agglom.</i> , <i>Er. herbic.</i>)
Z.56.2.9	0.722	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.30.2.9	0.643	<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>)
Z.12.2.2	0.484	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>)
Z.12.2.3	0.609	<i>Pseudomonas savastanoi fraxinus</i>
Z.12.2.8	0.634	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.Y.2.1	0.553	<i>Paenibacillus larvae pulvifaciens</i> (48h, <i>Bacillus</i>)
Z.Y.2.5	0.461	<i>Pseudomonas huttiensis</i>

Zeytin 3 ağacı yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen ve PGPB özellikleri olduğu belirlenen izolatların FAME analizi sonrasında; 6 izolat *Bacillus*, 5 izolat *Pseudomonas*, 2 izolat *Micrococcus*, 1 izolat *Arthrobacter*, 1 izolat *Stenotrophomonas* ve 1 izolat *Serratia* grubu belirlenmiş ve Çizelge 3.23' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Zeytin 3 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
Z.55.3.2	0.891	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Z.55.3.7	0.578	<i>Kocuria rosea (Micrococcus)</i>
Z.55.3.8	0.867	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype B
Z.30.3.1	0.818	<i>Serratia fonticola</i>
Z.30.3.2	0.711	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.30.3.3	0.507	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype G/taetrolens
Z.30.3.4	0.747	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.30.3.10	0.966	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype B
Z.10.3.1	0.918	<i>Micrococcus luteus</i> GC subgroup C
Z.10.3.3	0.689	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.10.3.6	0.694	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.10.3.9.1	0.460	<i>Stenotrophomonas maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)</i>
Z.10.3.10	0.466	<i>Arthrobacter oxydans</i>
Z.Y.3.1	0.748	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
Z.Y.3.2	0.497	<i>Pseudomonas putida</i> biotype B
Z.Y.3.8	0.507	<i>Bacillus atrophaeus</i>

Zeytin 4 ağacı yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen ve PGPB özellikleri olduğu belirlenen izolatların FAME analizi sonrasında; 7 izolat *Bacillus*, 2 izolat *Paenibacillus*, 1 izolat *Brevibacillus* ve 1 izolat *Chryseobacterium* grubu belirlenmiş ve Çizelge 3.24.' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.24. Zeytin 4 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
Z.Y.4.1	0.817	<i>Chryseobacterium balustinum</i> (<i>Flavobacterium</i>)
Z.Y.4.8	0.338	<i>Bacillus coagulans</i>
Z.17.4.7	0.713	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.17.4.6	0.692	<i>Brevibacillus choshinensis</i>
Z.30.4.1	0.605	<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>)
Z.30.4.8	0.621	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.30.4.2	0.362	<i>Paenibacillus pabuli</i> (<i>Bacillus</i>)
Z.55.4.5	0.757	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.17.4.5	0.459	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Z.Y.4.2	0.640	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.Y.4.5	0.690	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B

Zeytin 5 ağacı yüzey ve rizosfer bölgelerinden elde edilen ve PGPB özellikleri olduğu belirlenen izolatların FAME analizi sonrasında; 13 izolat *Bacillus*, 3 izolat *Paenibacillus*, 2 izolat *Pseudomonas*, 1 izolat *Brevibacillus*, 1 izolat *Arthrobacter* ve 1 izolat *Burkholderia* grubu bakteri tanımlanmış ve Çizelge 3.25.' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Zeytin 5 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

İzolat numarası	Benzerlik indeksi	Tanımlanan tür
Z.2.5.1	0.617	<i>Burkholderia gladioli</i> GC subgroup B (<i>Pseudomonas gladioli</i>)
Z.52.5.2	0.677	<i>Paenibacillus macquariensis</i>
Z.52.5.3	0.510	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.52.5.5	0.652	<i>Bacillus coagulans</i>
Z.52.5.8	0.815	<i>Pseudomonas agarici</i>
Z.52.5.9	0.771	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.30.5.1	0.576	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.30.5.3	0.714	<i>Bacillus coagulans</i>

Çizelge 3.25. (Devam) Zeytin 5 ağacı yüzey ve rizosferinden elde edilen ve FAME işlemine tabi tutulan izolatlar.

Z.30.5.7	0.870	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.30.5.9	0.658	<i>Arthrobacter viscosus</i>
Z.30.5.10	0.310	<i>Paenibacillus larvae pulvifaciens</i> (48h, <i>Bacillus</i>)
Z.30.5.11	0.677	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.30.5.12	0.593	<i>Brevibacillus choshinensis</i>
Z.15.5.4	0.095	<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgroup D
Z.15.5.5	0.699	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B
Z.15.5.8	0.681	<i>Paenibacillus macquariensis</i>
Z.Y.5.1	0.743	<i>Bacillus thuringiensis kurstakii</i>
Z.Y.5.3	0.455	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A
Z.Y.5.7	0.862	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype C/P. <i>mandelii</i>
Z.Y.5.9	0.390	<i>Bacillus subtilis</i>
Z.Y.5.10	0.706	<i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B

3.4.2. API 20E ile Gram Negatif Bakteri İdentifikasyonu

API 20E sistemi ile identifiye edilmeye çalışılan 31 gram negatif izolatın hiçbirini için üretici firmanın verdiği tanımlama tablosunda karşılık bulunamamıştır. Buna karşın pozitif kontrol olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922 ile olumlu sonuç alınmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. *E. coli* ATCC 25922 bakterisinin API 20E profili.

3.5. Toprak Analizi Sonuçları

3.5.1. Toprak reaksiyonu (pH)

Jackson (1958) yöntemine göre yapılan deney sonuçlarına göre 30 cm' lik toprak pH' sı nötr iken, 55cm'lik toprak zayıf asit özelliği göstermektedir. Sonuçlar Çizelge 3.26.' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.26. Toprak reaksiyonu sonuçları.

Toprak Derinliği	Toprak pH	Toprak Durumu
30 cm	6.73	Nötr
55 cm	6.47	Zayıf asit

3.5.2. Toprağın Fiziksel Analizi Sonuçları

Bouyoucos (1951) yöntemi ile belirlenen toprak özellikleri kumlu killi balçık olarak kaydedilmiş, sonuçlar Çizelge 3.27.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.27. Toprağın fiziksel analizi sonuçları.

Toprak derinliği	Toprak bünyesi
30 cm	Kumlu killi balçık
55 cm	Kumlu killi balçık

3.5.3. Toprak Kireç Analizi

Çağlar (1958)' ın belirttiği şekilde gerçekleştirilen kireç analizi sonuçları çok kireçli olarak belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 3.28.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.28. Toprak kireç analizi sonuçları.

Toprak derinliği	CaCO ₃ miktarı (%)	Kireç seviyesi
30 cm	39	Çok kireçli
55 cm	49.64	Çok kireçli

3.5.4. Toprağın Toplam Azot Miktarı Tayini

Bremmer (1996) yöntemine gerçekleştirilen deney sonrasında elde edilen sonuçlara göre 30 cm' lik bölgedeki azot miktarı % 0.1336 iken 55 cm' lik bölgede 0.0992 olarak kaydedilmiştir, sonuçlar Çizelge 3.29.' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.29. Toprağın toplam azot miktarı tayini sonuçları

Toprak derinliği	Azot miktarı (%)
30 cm	0.1336
55 cm	0.0992

3.5.5. Toprak Nem Tayini

Phillips ve Phillips (1984) yöntemine göre gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre 30 cm'lik toprak bölgesinde % 6.9 iken, 55 cm' lik toprak bölgesinde % 6.75 olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.30.' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.30. Toprak nem sonuçları

Toprak derinliği	Toprak nemi (%)
30 cm	6.90
55cm	6.75

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünya üzerinde tarımsal amaçlı yetiştirilen bitki çeşitlerinde gübre ve antagonistik özelliği olan kimyasallar yoğun şekilde uygulanması ve bu yöntemler dışında çare bulunmadığı durumlarda ise dünyadaki nüfus artışına cevap verebilmek adına transgenik bitkilerin oluşturulmaya çalışıldığı günümüzde yukarıda bahsedilen işlemler yapılmadan, besin maddelerinin orijinal hallerinde kalması ve yüksek miktarlarda üretimi için organik olarak üretilen tarımsal ürünler büyük önem arz etmektedir.

Topraktaki bakteriyel komünite analizi için dilüsyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Rizosfer toprağından örnek alımında dikkat edilecek konu bitkinin kök bölgesine yakın yerden örneklerin toplanmasıdır. Genel bakteri üretim besiyerlerinden nutrient agar (NA) ve plate count agar (PCA) kullanılarak genel koloni sayımı işlemleri ve saf koloniler elde edilebilir (Wu ve ark. 2006). Yaptığımız çalışmada da mikroorganizma sayımları için orijinal toprak örneği 100, 1000 ya da 10000 kat seyreltilerek mikroorganizma sayımı ve saf koloni eldesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonrası 1 g topraktan elde edilen bakteri sayısı incelenen örneklere göre $1.7 \cdot 10^4$ ile $9.5 \cdot 10^6$ arasında değişiklik göstermiş olup daha önce yapılan çalışmalar (Benizri ve ark. 2001; Walker ve ark. 2006) ile benzerlik göstermektedir.

Toprakta bulunan canlı bakteri sayısının yüzeyden başlayarak giderek azaldığı gösterilmiştir. Satın alınan zeytin fidan rizosferinden yapılan bakteri sayımlarının $7.8 \cdot 10^6$ kob/ml olduğu, buna karşın doğadaki zeytin rizosferlerinde ise bakteri sayısının $8.8 \cdot 10^5$ ve $6.5 \cdot 10^6$ kob/ ml arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Elma fidan rizosferinde $1.24 \cdot 10^6$ kob/ ml olarak belirlenen toplam sayılabilir bakteri sayısı elma ağaç rizosferinden $4.5 \cdot 10^5$ kob/ ml olarak kaydedilmiştir. Ceviz fidan rizosferinden yapılan bakteri sayımında $1 \cdot 10^6$ kob/ ml olarak hesaplanan sayı, ceviz ağacında $5.06 \cdot 10^4$ kob/ ml olarak kaydedilmiştir. Buna göre zeytin ve elma ağaç rizosferleri ve fidanlarından toplanan rizosfer örneklerinden yapılan toplam bakteri sayımında bir farklılık göze çarpmazken ceviz fidan ve ağacında elde edilen bakteri sayısı arasında farklılık göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmada en az bakteri içeren toprak ceviz fidan ve

ağacında belirlenmiştir. Ceviz ağacının mikroorganizma komuniteleri üzerinde alleopatik etkisi önceden beri bilinmekte olup ((Fernández-Agulló ve ark. 2013; Inbaraj ve Chignell 2004) bu çalışmada da bunu destekleyen bulgular saptanmıştır.

Somers ve ark. (2004) PGPR üyelerini aktivitelerine bağlı olarak; (i) biyogübre olarak kullanılanlar (bitkinin besin maddelerini alma hızını arttıranlar), (ii) bitki hormonu düzenleyicileri (genellikle bitki hormonu üretimi ile bitki büyümesinin gelişimi), (iii) rizosfer düzenleyiciler (organik kirlilik etmenlerinin azaltılması), ve (iv) biyopestisidler (antifungal metabolitler ve antibiyotiklerin üretimi ile hastalıkların kontrol edilmesi) olarak gruplandırmıştır. Bu gruplandırma sistemine göre topraktan izole edilen bakterileri PGPB olarak nitelendirmek için fosfat çözünebilirliği (biyogübre), indol asetik asit üretimi (bitki hormonu düzenleyicileri), amonyak üretimi (rizosfer düzenleyici), antibakteriyal etki, antifungal etki, hidrosiyamik asit ve siderofor (biyopestisid), testleri uygulanmıştır.

Bitki büyümesini teşvik edici özelliklerden olan antagonistik aktivite testlerinde, antibakteriyal etkiye sahip 78 izolattan çalışılan bitki patojenlerine karşı 2 izolatin 31-40 mm çapında, 17 izolatin 21-30 mm çapında, 73 izolatin ise 9-20 mm' lik çapında ihhibisyon zonları oluşturduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etkiye sahip ajan üzerinde test gerçekleştirilmediği için 21 mm üzerinde etkiye sahip 19 izolat üzerinde kontrol deneyleri gerçekleştirilebilir. Bununla beraber yapılan deney kapsamında çukur çapının 8 mm olduğu göz önünde bulundurulursa önemli 19 izolatin önemli derecede antibakteriyal aktivite sergiledikleri ortadadır. *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas gladioli* patojen bakterilere karşı etkileri çok düşük seviyelerde kalmakla birlikte test edilen diğer bitki patojenleri için kullanılabilirler. FAME sonuçlarına göre antibakteriyal etkinlik gösteren PGPB üyeleri genellikle *Bacillus* ve *Paenibacillus* gruplarıdır. Bununla beraber 21-30 mm ve 21-40 mm' lik zon oluşturan bakteriyel isolatların ilerleyen çalışmalarda antibakteriyal ajan olarak kullanılabilir oldukları gözlenmiştir.

Çalışmada izole edilen antifungal etkiye sahip 74 bakteri izolatından 1 tanesi 51- 60 mm, 4 tanesi 41- 50 mm, 11 tanesi 31- 40 mm, 35 tanesi 21- 30 mm ve 68 tanesi 9- 20 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Antifungal etki gösteren bakterilerin FAME identifikasyonu sonrasında *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Ewingella*, *Serratia* ve *Chryseobacterium* olarak tanımlanmıştır. Antifungal özellik gösteren bakterilerin büyük çoğunluğu *Penicillium notatum* küfü üzerinde kontrol grubunda kullanılan antifungal ajan kadar ve üzerinde etkinlik göstermiştir. *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus fumigatus* küfleri üzerinde antifungal etki gözlenmemiş veya kontrol ajanları kadar etkili oldukları gözlenmiştir. Bu çalışmada 51 bakteriyel izolatın test edilen fungusların çoğuna karşı 20 mm ve üzerinde inhibisyon zon çapına sahip olduğu göz önünde bulundurulduğunda ‘antifungal ajan’ olarak kullanılma potansiyeline sahip oldukları açıktır.

94 bakteri izolatının antifungal özellikteki düşük moleküler metabolit olan hidrosiyonik asit, 77 bakteri izolatının da yine antifungal ajanlardan siderofor ürettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar yukarıda bahsedilen antifungal aktivite çalışmasını destekler niteliktedir. Siderofor ve hidrosiyonik asit üreten bakteriler FAME analizi ile *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, *Ewingella*, *Acinetobacter* ve *Stenotrophomonas* olarak tanımlanmıştır. Bununla beraber FAME analizi ile identifiye edilen bakteriler arasındaki benzerlikler göz önüne alındığında *Bacillus* ve *Paenibacillus* üyelerine diğer gruplardan daha fazla rastlanılmıştır. Ahmad ve ark. (2008), Dijksterhuis ve ark. (1999) da *Bacillus* ve *Paenibacillus* türlerinin toprak rizosferinden sıklıkla izole edildiğini kaydetmişlerdir.

Rizosfer ve yüzey topraklarından izole edilen bakterilerin hidrosiyonik asit üretme yeteneğine sahip olanlarda % 35.84 ve siderofor üretme yeteneğine sahip olanların % 29.05 olmasına rağmen antifungal etkiye sahip mikroorganizmaların oranının % 27.92’ de kalmasının nedenlerinden biri antifungal etki için sadece bu mekanizmaların olmadığı bir diğeri ise izole edilen mikroorganizmaların diğer antimikrobiyal yolları kullanmalarından kaynaklanabilmesidir. O’sullivan ve O’Gara (1992) ve Nagraj Kumar ve ark. (2004) da çalışmalarında *Bacillus* ve

Paenibacillus üyelerinin bitki rizosferinde sıklıkla rastlandığını kaydetmişlerdir. Üzerinde çalışılan patojen fungus grupları haricinde etkinin olup olmadığı ek deneyler yapılarak belirlenebilir.

Antibakteriyal ve antifungal özelliklerin her ikisini birden gösteren 34 izolatın, bakteri grupları dağılımında genel olarak *Bacillus* ve *Paenibacillus* karşımıza çıkmaktadır ve her iki özelliğe sahip olan bu grupların antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilmeye müsait olduklarını göstermektedir. Sessitch ve ark. (2004) ve Stohl ve ark. (1999) tarafından yapılmış çalışmalarda antifungal etkiye sahip mikroorganizmalardan *Bacillus* ve *Paenibacillus* üyelerinin toprak rizosferinde sıklıkla karşılaşılabileceğini kaydetmişlerdir.

15 bakteriyel izolat hidrosiyonik asit üretme yeteneğinin yanında antifungal etkiye de sahiptir. 14 izolat ise siderofor üretiminin yanında antifungal etkiye sahiptir. 2 bakteriyel izolatın antibakteriyal ve antifungal etki, hidrosiyonik asit ve siderofor üretebilme yetenekleri pozitif olarak belirlenmiştir. Elde edilen izolatlarından antifungal etki göstermesinin yanında hidrosiyonik asit üretimi ve siderofor üretimi beraber görüldüğü bakteriyel izolatlar antifungal ajan olarak adlandırabilmesi adına önem arz etmekle birlikte bu grupların hepsini içeren bakteriyel izolatların antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilir olduklarına işaret etmektedir.

Antifungal ve antibakteriyal aktiviteye sahip yüzey toprağı ve bitki rizosfer bölgelerinden elde edilen izolatlar çoğunlukla rizosfer veya toprak altı bölgelerden izole edilmişlerdir. Antimikrobiyal etkiye sahip izolat türleri *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Pseudomonas* üyeleri olarak belirlenmiştir. Bitki yüzey topraklarında bulunan PGPB üyelerinin dışında bitki rizosferinde dağılım gösteren PGPB üyeleri sıklıkla çalışılmıştır. Compant ve ark. (2010), Bais ve ark. (2006) ve (Compant ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilen çalışmalar da bitki rizosferinden elde edilen PGPB üyelerinin özellikleri üzerinedir. Dolayısıyla bu çalışma ile bitki yüzey toprağında bulunan patojen mikroorganizmaların da önüne geçilebilecek mikroorganizma tayeinlerinin gerçekleştirebilmesi yönünden önem arz etmektedir.

Amonyak üretimi saptanan bakteri izolatları Ahmad ve ark. (2008) tarafından daha önce yapılmış çalışmada PGPB üyeleri ile çalıştıkları bakterilerin tümünde amonyak üretiminin pozitif olduğunu kaydetmişlerdir. Test edilen 264 bakteri izolatından sadece 6 tanesinde üretim gerçekleşmemiş olup % 97.73 oranındaki bakterinin NH_3 molekülünü ürettiğini göstermektedir. Üretim sonrası üretilen NH_3 molekülünün azot döngüsüne katılması ile bitkinin makro besinlerinden azot alma seviyesini arttırmakta oldukları öngörülmektedir.

98 bakterinin bitki hormonlarından indol asetik asit testi üretebildiği belirlenmiştir. Triptofan bağımlı yollarla 2- 3 gün içerisinde sonuç alınabilen deney düzenekleri mevcut iken triptofan varlığı olmadan 10-15 gün içerisinde de sonuç alınabilmektedir ve tezde yapılan çalışma kapsamında bu teknik denenmiştir ve sonuçlar kaydedilmiştir. Bitki hormonlarından indol asetik asitin bitki kökünün ilk gelişim evrelerinde etkin oldukları ve toprağa bağlanmalarını sağlayarak besin ve su maddelerini arttırdıkları daha önce yapılmış çalışmalar ile belirlendiğinden, bu etkiye sahip olan izolatlar ile ilerleyen çalışmalarda etkileri kontrollü şartlar altında denenebilir.

Fosfat çözebilme özelliği gözlenen 48 izolat içerisinde baskın olarak gözlenen gruplar *Bacillus* ve *Pseudomonas* tır. Ahmad ve ark. (2008), Tallapragada ve Seshachala (2012) ve Rodríguez ve Fraga (1999) yaptığı çalışmalar da aynı bakteri gruplarının toprak rizosferinden bu test uygulaması sonrasında karşılaşılan mikroorganizmalar olarak kaydetmişlerdir. Elde edilen izolatları ile ilerleyen çalışmalarda etkileri kontrollü şartlar altında denenebilir.

3. Zeytin ağacından izole edilen ve FAME işlemine % olarak en fazla PGP özelliğini (H.A.T, S.ÜT, İ.A.A.T, F.Ç.T ve A.Ü.T) göstermesinden dolayı toprak analizi işlemi 3. Zeytin ağacının 30 ve 55 cm' lik derinlikten alınan topraklar üzerinde gerçekleştirilmiştir. 3. Zeytin ağacının toprağı ile gerçekleştirilen çalışmalar sonunda; % 0.1164 oranında azot içeren, % 6.825 toprak nemine sahip zayıf asit ve nötr özellikleri gösteren, kireçli kumlu killi balçık olarak kaydedilmiştir.

API 20E identifikasyon test kiti genellikle klinik ortamlardan elde edilen kompleks besin isteği içermeyen gram negatif basil şekilli bakterilerin biyokimyasal yollar ile identifiye edilebilmesine dayalı bir yöntemdir (Anonim 2013b). *Pseudomonas* üyeleri identifikasyonunda da kullanılmak istenilen bu yöntem ile çalışmada elde edilen PGP özelliği gösteren gram negatif oldukları belirlenen bakteriler üzerinde yapılan denemelerde sonuç alınamaması, klinik örneklerin bu veri tabanında öncelikli olarak çalışılmasından kaynaklı olabileceği düşünölmektedir.

Sonuç ve Öneriler:

Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin karakterizasyonunun yapılmaya çalışıldığı bu çalışmada sonuç olarak;

1. Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin rizosfer bölgesi haricindeki bölgelerden biri olan bitki yüzeyinden de PGPB özelliği olan bakteriler elde edilebilmektedir.

2. Ceviz ağacından elde edilen bakteriyel popülasyon ile ceviz fidan rizosferinden elde edilen popülasyonun farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

3. 1 elma ağacı, 1 ceviz ağacı, 5 zeytin ağacı, 1 ceviz fidanı, 1 elma fidanı ve 1 zeytin fidanının farklı bölgelerinden yapılan izolasyonlar sonucunda toplam 264 bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin 94 tanesinde hidrosiyonik asit üretimi, 258 tanesinde amonyak üretimi, 42 tanesinde fosfat çözebilme yeteneği, 77 tanesinde siderofor üretme yeteneği, 98 tanesinde indol asetik asit üretebilme yeteneği, 76 tanesinde antibakteriyal etki ve 74 tanesinde antifungal etki pozitif olarak belirlenmiştir. 34 bakteriyel izolatın hem antifungal hem de antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir. 2 bakteriyel izolatın antibakteriyal ve antifungal etki, hidrosiyonik asit ve siderofor üretebilme yetenekleri pozitif olarak belirlenmiştir.

4. S.Ü.T, İ.A.A.T, A.Ü.T, H.A.T, F.Ç.T ve antagonistik test uygulamaları sonucunda 3 veya daha fazla etkinlik gösteren 118 bakteri FAME analizi ile tanımlanmış ve *Bacillus* cinsi bakterilerin dominant olduğu gözlenmiştir.

5. FAME analizi sonrası belirlenen PGPB üyeleri; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* kurst, *Paenibacillus macquariensis*, *Paenibacillus pabuli*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus larvae pulvifaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas savastoni* fraxi, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter viscosus*, *Serratia fonticola*, *Chryseobacterium balustinum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Micrococcus luteus*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Staphylococcus kloosii*, *Flavimonas orzyihabitans*, *Acinetobacter haemolyticus*,

Rhizobium radiobacter, *Ewingella americana*, *Brevibacillus choshinensis*, *Burkholderia gladioli* *Kocuria rosea* olarak tanımlanmıştır.

6. Bu çalışma sonunda bitki büyümesini teşvik edici özelliklerden S.Ü.T, İ.A.A.T, A.Ü.T, H.A.T ve F.Ç.T özelliklerinden 4 veya 5 tanesinin pozitif olarak gözlendiği ve testlerin sonucunda daha etkin olan 9 bakteriyel izolat belirlenmiştir. Bu yerel izolatlar ülkemiz topraklarından verimi arttırmak için PGPB olarak kullanılma potansiyeline sahip olup, gelecek çalışmalarda çeşitli bitkilerle saksı ve tarla denemeleri gerçekleştirilmelidir.

7. Bu çalışmada belirlenen PGPB bakteri izolatları, günümüz popüler “organik tarım” uygulamalarına dahil edilerek verim artışında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2005). Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk J Biol*, 29, 29–34.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173–81.
- Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S., and Kato, H. (1997). Biocontrol of bacteria wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonads. In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria- Present Status and Future Prospects*, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds), pp. 120-123, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Andrews, J. H. and Harris, R. F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38, 145–180.
- Anonim, (2013a) Peak Chemicals Industries Limited. <http://www.indiamart.com/peak-chemicals-industries/liquid-bio-fertilizers.html>
- Anonim, (2013b).bioMérieux Clinical Diagnostics. http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRDanddoc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_11andpubparams.sform=4andlang=en
- Antoun, H. and Prévost, D. (2005) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (ed. Z.A. Siddiqui), Springer, The Netherlands. pp. 1-39.

- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. and Lalande, R. (1998) Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204, 57-67.
- Atkinson, T. G., Neal, J. L., and Larson, R. I. (1975) Genetic control of the rhizosphere microflora of wheat. In *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens* (Bruehl, G.W., ed.), St. Paul, MN: American Phytopathological Society, pp.116–122.
- Baconguis, R., Peñalba, L., and Paunlagui, M. (2012). Mapping the Innovation System of Biofertilizers: Constraints and Prospects to Enhance Diffusion. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12(9), 1185–1195.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual review of plant biology*, 57, 233–266.
- Bahl, N. and Jauhri, S. (1986). Spent compost as a carrier for bacterial inoculant production. In *Proceedings of the International symposium on scientific and technological aspects of cultivating edible fungi*. pp. 63-68, The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Bangera, M. G. and Thomashow, L. S. (1999) Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology* 181, 3155–3163.
- Barriuso, J., Pereyra, M.T., Lucas García, J. A., Megías, M., Gutiérrez Mañero, F.J. and Ramos, B. (2005) Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microbial Ecology*, 50 (1), 82-89.

- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 (4), 729–770.
- Bashan, Y., and Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8/9), 1225–1228.
- Bashan, Y. (1986a). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.
- Bashan, Y. (1986b). Migration of the Rhizosphere Bacteria A4ospirillum brasilense Towards Wheat Roots in the Soil Pseudomonas fluorescens. *Journal of General Microbiology* 132:3407-3414.
- Bashan, Y. (1991). Air-borne transmission of the rhizosphere bacterium Azospirillum. *Microb. Ecol.* 22: 257-269.
- Bashan, Y., and De-Bashan, L. E. (2005). Plant Growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment* vol. 1, pp. 103–115.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Faupel A, Ulrich A, Hallmann J (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51:215–229
- Benizri, E., Baudoin, E., and Guckert, a. (2001). Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 11(5), 557–574.
- Bloemberg, G. V, and Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4), 343–50.

- Bottini, R., Cassán, F., and Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497–503.
- Bottner, P., Pansu, M. and Sallih, Z. (1999) Modelling the effect of active roots on soil organic matter turnover. *Plant and Soil*, 216, 15-25.
- Bouyoucos, G.D. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of the soil. *Agronomy Journal*, (9); 434-438.
- Bremner, J.M.; 1965. Total nitrogen. In. C. A. Black et al. (ed.) Methods of soil analysis. Part2. Agronomy 9: 1149-1178. Am. Soc. ofAgron., Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Buchenauer, H. (1998). Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105 (4), 329-348.
- Burr, T. J., Schroth, M. N., and Suslow, T. (1978). Increased Potato Yields by Treatment of Seedpieces with Specific Strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68, 1377–1383.
- Buysens, S., Poppe, J., Hofte, M., (1994). Role of siderophores in plant growth simulation and antagonism by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, in: Ryder, M.H., Stephens, P.M, Bowen, D.G. (Eds.), Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Commonwealth Science and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia, pp. 139–141.
- Buysens, S., Heungens, K., and Poppe, J. (1996). Involvement of Pyochelin and Pyoverdine in Suppression of Pythium-Induced Damping-Off of Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and environmental microbiology*, 62(3), 865–871.

- Çağlar, K.Ö. (1958). Toprak Bilgisi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. Yayın No:10, s. 286.
- Campbell, R. and Greaves, M. P. (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In *The Rhizosphere* (Lynch, J. M., ed.), Chichester: Wiley and Son, pp.11–34.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N., (1992) *Microbiology : A laboratory manual*. The Benjamin/Comings Publishing Company, Inc., California.
- Chanway, C.P., Shishido, M., Nairn, J., Jungwirth, S., Markham, J., Xiao, G., Holl, F.B. (2000). Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology Management* 133, 81-88
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist* 157, 503–523.
- Chao, W.L. and Alexander, M. (1984). Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 94-97.
- Compant, S., Clément, C., and Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Ait Barka, E. (2005a). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959.
- Compant S, Reiter B, Sessitch A, Nowak J, Clément C and Ait Barka E (2005b) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting

- bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71: 1685–1693.
- Compant S, Nowak J, Clément C and Ait Barka E (2007) Polyphenolic compound accumulation as a response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to colonization by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Macromolecules from Grape and Vine* (Jeandet P, Conreux A and Clément C, eds), pp. 89–93. Lavoisier, Paris, France.
- Conn, K.L., Nowak, J., Lazarovitz, G. (1997). A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potato and plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 801-808.
- Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., and Kim, D.-S. (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92, 4197–4201.
- Daayf, F., Schmitt, A. and Bélanger, R.R. (1995). The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *Plant Dis.* 79: 577-580.
- de Souza, J. T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi- Pearson, V., and Raaijmakers, J. M. (2003a) Effect of 2,4-diacetyl phloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93, 966–975.
- de Souza, J. T., Weller, D. M., and Raaijmakers J.M. (2003b) Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology* 93, 54–63.
- Dijksterhuis, J., Sanders, M., Gorris, L. G., and Smid, E. J. (1999). Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Journal of applied microbiology*, 86(1), 13–21.

- Dommergues, Y.R. (1978). The plant–microorganism system. In: Dommergues, Y.R., Krupa, S.V. (Eds.), *Interactions between Nonpathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 1–37.
- Dommergues, Y.R., Diem, H.G. and Divies, C. (1979). Polyacrylamide entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 779-981.
- Fages, J. (1990). An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:473-478.
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., ve Pereira, J. a. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42, 126–132.
- Franklin, R. B., and Mills, A. L. (2003). Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS microbiology ecology*, 44(3), 335–46.
- Fray, R.G. (2002) Altering Plant–Microbe Interaction Through Artificially Manipulating Bacterial Quorum Sensing. *Annals of Botany*, 89, 245-253.
- Fukaki, H., and Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant molecular biology*, 69(4), 437–49.
- Galippe, V. (1887). La Droiterie et la Gaucherie, sont-elles fonctions de l'éducation ou de l'hérédité *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*. Paris
- Gamalero, E., Lingua, G., Giusy Caprì, F., Fusconi, A., Berta, G., ve Lemanceau, P. (2004). Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 79–87.

- Garbeva, P., van Veen, J.A. and van Elsas, J.D. (2003) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Microbial Ecology*, 45, 302-316.
- Giller, K. E., Beare, M. H., Izac, A. N., and Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6, 3–16.
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., and Penrose, D. M. (1999). Auxin Production. In: *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, pp. 86–133. Imperial College Press, London.
- Glick, B. R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41,109–117.
- Glick B, Patten C, Holguin G, Penrose D (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial Col, London 267 p.
- Grundmann, L. G., Gourbie, F., and Bernard, Â. C. (1999). A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Applied Soil Ecology*, 13, 123–126.
- Gutie, F. J., and Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.*, 111, 206–211.
- Hamdan, H., Weller, D. M., and Thomashow, L. S. (1991). Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and environmental microbiology*, 57(11), 3270–7.
- Haas, D. and Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3, 307–319.

- Haas, D. and Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 41, 117–153.
- Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2, 1221-1230.
- Hallmann J (2001) Plant interactions with endophytic bacteria. Biotic Interactions in Plant–Pathogen Associations (Jeger MJ and Spence NJ, eds), pp 87–119. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hallmann, J., Berg, B. (2007). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (Eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 15-31
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D. (2008). Properties of bacterial endo- phytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16, 463-471
- Hiltner L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98: 59-78.
- Hoberg, E., Marschner, P., and Lieberei, R. (2005). Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. *Microbiological research*, 160(2), 177–87.
- Humphris, S.N., Bengough, A.G., Griffiths, B.S., Kilham, K., Rodger, S., Stubbs, V., Valentine, T.A., Young, I.M. (2005). Root cap influences root colonization by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on maize. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 123-130.

- Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, 106, 169-178.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Métraux, J. P. (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 16, 851–858.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., Borriss, R., and Genómica, C. De. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619–626.
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Sessitsch, A. (2004). Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2667-2677
- Illmer, P., Barbato, A., and Schinner, F. (1995). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 265–270.
- Inbaraj, J. J., & Chignell, C. F. (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical research in toxicology*, 17(1), 55–62.
- Isnansetyo, A., Cui, L., Hiramatsu, K., and Kamei, Y. (2003) Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 545–547.
- Iswaran, V., Sen, A. and Apte, R. (1972). Plant compost as a substitute for peat for legume inoculants. *Curr. Sci.* 41: 299.

- Jackson, M.; 1958. Soil chemical analysis, p. 1-498. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Jackson, A. M., Whipps, J. M. and Lynch, J. M. (1991). Production, delivery systems, and survival in soil of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme Microbiol. Technol.* 13: 636-642.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Manthan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Ianetta, P.P.M., Olivares, F.L., Ladha, J.K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. 15, 894-906.
- Jensen, H. H., and Pedersen, M. B. (2006). Morphological Plasticity by Crop Plants and Their Potassium Use Efficiency, (April 2013), 37–41.
- Jha, A., Sharma, D., and Saxena, J. (2012). Effect of single and dual phosphate-solubilizing bacterial strain inoculations on overall growth of mung bean plants. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58(9), 967–981.
- Jung, G., Mugnier, J., Diem, H.G. and Dommergues, Y.R. (1982). Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Plant Soil* 65: 219-231.
- Kamei, Y. and Isnansetyo, A. (2003) Lysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21, 71–74.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Burger, D., Haas, D., and Défago, G. (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 4–13.
- Kempf, H. J., Scheffer, R.J. and Ligon, J. (1997). Examples of Novartis research activities regarding the use of bacteria in disease control. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects, A. Ogoshi, K.

- Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds.), pp. 124-125, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Kenney, D. S. (1997). Commercialization of biological control products in the chemical pesticide world. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds.), pp. 12G-127, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M., (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7, 39–43.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze and M.N. Schorth, (1980a). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885–886.
- Kloepper, J.W., Schorth, M.N. and Miller, T.D. (1980b) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70, 1078-1082.
- Kloepper, J. W., Ryu, C., and Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp.. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266.
- Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Roskopf, E.N. and Shelby, R.A. (2002) Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil*, 238, 257-266.
- Kotb, S.I. and Angle, J.S. (1986). Survival of blue-green algae in various carrier media. *Trop. Agric. (Trinidad)* 63: 113-116
- Krafczyk, I., Trolldenier, G., Beringer, H. (1984). Soluble exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology Biochemistry*. 16, 315-322.

- Krechel, A., Ditz, M., Ulrich, A., Faupel, A., Hallmann, J., Berg, G. (2004). Bacterial life inside and outside potato roots and leaves. *Bulletin OILB/SROP* 27, 157-163
- Kremer, R.J. and Peterson, H.L. (1982a). Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seed. *Soil Sci.* 134: 117-125.
- Kremer, R.J. and Peterson, H.L. (1982b). Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1790-1794.
- Kumar, A., Prakash, A., and Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp. 37–60).
- Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 678(May), 671–678.
- Laheurte, F. and J. Berthelin (1988). "Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant and soil* 105(1): 11-17.
- Lethbridge, G. (1989). An industrial view of microbial inoculants for crop plants. In *Microbial inoculation of crop plants*, R. Campbell and R.M. Macdonald (eds.), pp. 11-28, Special publication of the society of general microbiology, vol. 25, IRL Press, Oxford, New York.
- Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiol.* 1, 142 -146.
- Lucas García, J., Probanza, A., Ramos, B. and Gutiérrez Mañero, F.J. (2001) Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs §. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164, 1-7.

- Lucas García, J.A., Domenech, J., Santamaría, C., Camacho, M., Daza, A. and Gutiérrez Mañero, F.J. (2004) Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany*, 52 (3), 239-251.
- Lugtenberg, B. J. J., and Dekkers, L. C. (1999). Minireview What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1(1), 9–13.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63(c), 541–56.
- Lupwayi, N.Z., Clayton, G.W., Hanson, K.G., Rice, W.A. and Biederbeck, V.O. (2004) Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. *Canadian Journal of Plant Science*, 84, 37-45.
- Mandimba, G., Heulin, T., Bally, R., Guckert, A., Balandreau, J., (1986). Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant and Soil* 90, 129-139.
- Marschner, P., Crowley, D., and Yang, C. H. (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261,199–208.
- Mason, M. G., Mathews, D. E., Argyros, D. A., Maxwell, B. B., Kieber, J. J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., et al. (2005). Multiple Type-B Response Regulators Mediate Cytokinin Signal Transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(November), 3007–3018.
- McLoughlin, T. J., Quinn, J. P., Bettermann, a, and Bookland, R. (1992). *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Applied and environmental microbiology*, 58(5), 1760–3.

- Mehmood, Z., Ahmad, I., Mohammad, F., and Ahmad, S. (1999). Indian medicinal plants: A potential source for anticandidal drugs. *Pharmaceutical Biology*, 37(3), 237–242.
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., and Napoleao, D. (1999). Methods Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37, 1–6.
- Miller, H. J., Henken, G., and van Veen, J. A. (1989) Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology* 35, 656–660.
- Mohammadi, O. (1994). Commercial development of Mycostop biofungicide. In Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen (eds.), pp. 282-284, Division of Soils CSIRO, Adalaide, Australia.
- Morgan, J. A. W. and Whipps, J. M. (2001) Methodological approaches to the study of rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. In The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface (Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P., eds.), New York: Marcel Dekker, pp.373–409.
- Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., and Verma, D. (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS microbiology letters*, 182(2), 291–6.
- Nagrajkumar, M., Bhaaskaran, R., Velazhahan, R. (2004). Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 159, 73–81.

- O'Sullivan, D.J., O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in the suppression of plant roots pathogens. *Microbiol. Rev.* 56, 662–676.
- Paau, A.S., Graham, L.L. and Bennett, M. (1991). Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects, C. Keel, B. Koller, and G. Défago (eds.), pp. 399-403, IOBC/WPRS Bulletin, Zurich, Switzerland.
- Packowski, M.E. and Berryhill, D.L. (1979). Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal based inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 612-615.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795–3801.
- Peterson, R.L. and Guinel, F.C. (2000) Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function (eds Y. Kapulnik and D.D. Douds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, TheNetherlands, pp. 147–171
- Philip, K. and Jauhri, K. S. (1984). Pressmud: a potential carrier for *Rhizobium* and *Azotobacter* I. Comparative analytical studies of various carrier materials. *Z. Mikrobiol.* 139: 5-41.
- Phillips, R. E. and Phillips, S. H. 1984. No-Tillage Agriculture Principles and Practices. Copyright by Van Nostarand Remhold Company Inc.Newyork.U.S.A.
- Probanza, A., Lucas García, J.A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B. and Gutiérrez Mañero, F.J. (2002) *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, 20, 75-84.
- Prosser, J.I. (2002) Molecular and functional diversity in soil micro-organisms *Plant and Soil*, 244, 9-17.

- Quiñones, B., Pujol, C.J. and Lindow, S.E. (2004) Regulation of AHL Production and Its Contribution to Epiphytic Fitness in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17 (5), 521-531.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., de Kock, M. J. D. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 699–710.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y., (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321, 341-361
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (2000) Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 50, 649-659.
- Richter, E., Ehwald, R. and Conitz, C. (1989). Immobilization of yeast cells in plant cell wall frameworks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 309-312.
- Rodríguez, H., and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319–39.
- Sadasivam, K.V., Tyagi, R.K. and Ramarethinam, S. (1986). Evaluation of some agricultural wastes as carriers for bacterial inoculants. *Agric. Wastes* 17: 301-306.

- Salisbury, F.B. (1994) The role of plant hormones, in *Plant–Environment Interactions* (ed. R.E. Wilkinson), Marcel Dekker, New York, USA, pp. 39–81.
- Sasser, M. (1990). Technical Note # 101 Bacterial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC-FAME). <http://youngin.com/application/AN-0702-0013EN.pdf>
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., et al. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N - acyl-L- homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, 29, 909–918.
- Schwyn B, Neilands J (1987) Universal assay for detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 160:47–56
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 39, 23-32
- Sessitsch, A., Reiter, B., and Berg, G. (2004). Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol*, 50, 239–249.
- Singh, A. and Sharma, P.B. (1973). Growth and survival of rhizobia in commercial bacterial inoculants. *J. Res. (Punjab)* 10: 95-98.
- Smalla, K., Sessitsch, A., Hartmann, A., 2006. The Rhizosphere: Soil compartment influenced by the root. *FEMS Microbiology Ecology*. 56, pp. 165
- Smith, R.S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492.

- Smith, R.S. (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. In Nitrogen fixation: fundamentals and applications, I. A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton (eds), pp. 653-657, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Soil Survey Staff 1951. Soil Survey Manual. United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 18., Washington D.C., USA.
- Somers, E., Vanderleyden, J., and Srinivasan, M., 2004, Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet, *Crit. Rev. Microbiol.* 30:205-240.
- Sparrow, S.D. and Ham, G.E. (1983a). Nodulation, N₂ fixation, and seed yield of navy beans as influenced by inoculant rate and inoculant carrier. *Agron. J.* 75: 20-24.
- Sparrow, S.D. and Ham, G.E. (1983b). Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. *Agron. J.* 75: 181-184.
- Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 487–506.
- Stohl, E. A., Milner, J. L., and Handelsman, J. (1999). Zwittermicin A biosynthetic cluster. *Gene*, 237, 403–411.
- Sturz, A. V and Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15, 183–190.
- Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G. T. S., Sandberg, G., Bhalerao, R., et al. (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant cell*, 19(7), 2186–96.

- Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P. and Stewart, G.S. (1996) Quorum sensing: A population-density component in the determination of bacterial phenotype *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 214-219.
- Tallapragada, P., and Seshachala, U. (2012). Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of Piper betel in Karnataka , India. *Turk J Biol*, 36, 25–35.
- Tang, W.H. (1994). Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen (eds.), pp. 267-273, Division of Soils CSIRO, Adalaide, Australia.
- Tang, W.H. and Yang, H. (1997). Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds.), pp. 4-9, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Theodoou, M. E., and Plaxton, W. C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, 101(2), 339–344.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. and Tillberg, E. (1999) Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1847-1852.
- Trevors, JT, Elsas JD van, Lee H, Overveek LS van (1992). "Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil." *Microb Releases* 1: 61-69.
- Trevors, JT (1998). Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 101, 45–67.

- Toledo G, Bashan Y, Soeldner A (1995) In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black man- grove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Can J Microbiol* 41: 1012–1020.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. a, and Ovreås, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of biotechnology*, 64(1), 53–62.
- van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Rev Phytopathol* 36: 453–483
- van Loon LC, Bakker, PAHM (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui, Z. A., ed.), Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp.39–66.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., and Vivanco, J. M. (2003). Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology 1. *Plant Physiology*, 132(May), 44–51.
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., and Nowak, J. (2004). Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2), 175–193.
- Weller, D. M., van Pelt, J. A., Mavrodi, D. V., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M., and van Loon, L. C. (2004) Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluo- rescens*. *Phytopathology* 94, S108.
- Wieland, G., Neumann, R., and Backhaus, H. (2001) Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species,

- soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5849–5854.
- Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52, 487–511.
- Woodward, A. W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707–35.
- Wu, S. C., Cheung, K. C., Luo, Y. M., and Wong, M. H. (2006). Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 140(1), 124–35.
- Xiao, R., Kisaalita, W. S., and Kisaalita, W. S. (1998). Fluorescent Pseudomonad Pyoverdines Bind and Oxidize Ferrous Ion Fluorescent Pseudomonad Pyoverdines Bind and Oxidize Ferrous Ion, *Applied and environmental microbiology* 64(4), 4–9.
- Yang, C., Menge, J. A., and Cooksey, D. A. (1994). Mutations Affecting Hyphal Colonization and Pyoverdine Production in Pseudomonads Antagonistic toward *Phytophthora parasitica* Mutations Affecting Hyphal Colonization and Pyoverdine Production in Pseudomonads Antagonistic toward *Phytophthora parasitica*. *Applied and environmental microbiology*, 60(2), 473–481.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., PhilipHollingworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stolfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K. and Dazzo, F.B. (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 194, 99–114.

Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.D.L. and Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (9), 1101-1108.

Ek: Deney Sonuçları

Ek 1. İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünübililiği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Test Bakteri	H.A.T	F.Ç.T	S.Ü.T	İ.A.A.T
C.30.1.10	1		1	
C.30.1.8	1			
C.Y.1.1				1
C.60.1.2			1	
E.Y.1.1	1		1	
C.60.1.14	1			1
E.20.1.7.1				1
E.20.1.5.1	1			1
E.20.1.1		1		1
E.20.1.7	1		1	1
E.20.1.5			1	1
E.20.1.4	1			1
E.20.1.2	1			1
E.20.1.10		1		1
E.20.1.2.1	1			1
E.20.1.6				1
E.50.1.3		1		
E.50.1.4	1			
E.50.1.11	1			
E.50.1.1				1
E.50.1.2				1
E.20.1.3		1		1
E.20.1.8		1		
E.20.1.10	1			1
E.30.1.14		1		
E.20.1.6	1			
E.20.1.11			1	
E.20.1.4	1			
Z.F.1			1	1
Z.F.2		1	1	1
Z.F.3	1	1	1	1
Z.F.4		1	1	1
Z.F.5				
Z.F.6			1	1
Z.F.7	1		1	1

Ek 1. (Devam) İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünabilirliği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Z.F.8	1			
Z.F.9		1	1	1
Z.F.10		1	1	1
Z.F.11		1		
Z.F.12			1	
C.F.1			1	
C.F.2	1			
C.F.3	1			1
C.F.4	1			
C.F.5	1			
C.F.7	1		1	
C.F.8				1
C.F.10	1			1
C.F.11			1	
E.F.1			1	
E.F.2			1	
E.F.3		1	1	1
E.F.5			1	
E.F.6	1	1	1	1
E.F.7			1	
E.F.9			1	1
E.F.10	1		1	1
E.F.11			1	
E.F.12	1		1	1
E.F.13			1	
C.F.6	1		1	
C.F.9	1			
Z.10.1.1	1			1
Z.10.1.2				1
Z.10.1.3	1			
Z.10.1.4	1			1
Z.10.1.5	1		1	
Z.10.1.6				1
Z.10.1.10	1			1
Z.Y.1.1			1	
Z.Y.1.4	1		1	
Z.Y.1.7		1	1	1
Z.Y.1.8		1	1	

Ek 1. (Devam) İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünübililiği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Z.Y.1.10		1	1	1
Z.Y.1.11				1
Z.Y.1.12			1	1
Z.Y.1.13		1		
Z.Y.1.14	1		1	
Z.Y.1.16	1			1
Z.50.1.8	1			1
Z.50.1.7				1
Z.50.1.6				1
Z.50.1.2	1			
Z.50.1.1		1		
Z.30.1.11		1	1	1
Z.30.1.10		1	1	1
Z.30.1.7				1
Z.30.1.6	1			1
Z.30.1.1				1
Z.30.1.2	1		1	
Z.30.1.3	1			1
Z.Y.2.7				1
Z.Y.2.6	1			
Z.Y.2.2				1
Z.Y.2.1		1		
Z.12.2.3		1		1
Z.12.2.1	1			
Z.12.2.8	1	1		1
Z.30.2.9			1	
Z.30.2.4	1			
Z.56.2.9				1
Z.56.2.7	1		1	
Z.56.2.1		1		1
Z.56.2.8		1		1
Z.Y.2.3		1		
Z.12.2.10			1	
Z.12.2.2	1		1	
Z.12.2.4				1
Z.12.2.5				1
Z.12.2.9			1	
Z.30.2.7			1	

Ek 1. (Devam) İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünabilirliği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Z.Y.2.5			1	1
Z.55.4.8			1	
Z.55.4.5				1
Z.Y.3.4	1			
Z.Y.3.3		1		
Z.Y.3.8	1	1		
Z.10.3.7		1		
Z.10.3.4	1			
Z.10.3.3	1			
Z.30.3.2	1			
Z.30.3.3	1	1		1
Z.30.3.1		1		1
Z.30.3.8	1			
Z.55.3.6	1			
Z.55.3.5	1			
Z.55.3.4				1
Z.55.3.3	1			
Z.55.3.2	1			
Z.Y.4.1	1		1	
Z.10.3.2			1	
Z.30.3.10	1	1	1	1
Z.30.3.4	1		1	
Z.30.3.7	1			
Z.Y.3.2		1		1
Z.Y.3.1	1	1	1	1
Z.Y.3.5				
Z.Y.3.6			1	
Z.10.3.5			1	
Z.10.3.6	1	1		
Z.55.3.8	1		1	1
Z.55.3.7			1	1
Z.Y.3.9				1
Z.Y.3.7			1	1
Z.10.3.10			1	1
Z.10.3.9.1	1		1	1
Z.10.3.1			1	1
Z.52.5.8		1		1
Z.52.5.5		1		1
Z.30.5.1	1			

Ek 1. (Devam) İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünübililiği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Z.52.5.6				1
Z.52.5.1	1			
Z.52.5.2	1			
Z.Y.4.6	1			
Z.17.4.3	1			
Z.17.4.2	1			
Z.17.4.7	1			
Z.17.4.8				
Z.17.4.6	1		1	
Z.30.4.1		1		
Z.30.4.8	1		1	
Z.30.4.2	1			
Z.55.4.5			1	
Z.17.4.5				1
Z.17.4.1		1		
Z.Y.4.5	1		1	1
Z.Y.4.2		1		1
Z.Y.4.3		1		
Z.Y.4.4				1
Z.Y.4.9				1
Z.Y.4.10			1	
Z.Y.4.7			1	
Z.30.4.5	1			
Z.30.4.7			1	
Z.30.4.4				1
E.20.1.12				1
Z.Y.5.1	1		1	
Z.Y.5.7		1		1
Z.Y.5.9				1
Z.Y.5.12				1
Z.Y.5.2				1
Z.Y.5.10	1	1	1	
Z.Y.5.11				1
Z.Y.5.3	1			1
Z.Y.5.4	1	1	1	1
Z.52.5.7	1			
Z.15.5.3	1			
Z.15.5.2				1
Z.15.5.4	1			1

Ek 1. (Devam) İzole edilen bakterilerin Hidrosiyonik asit, fosfat çözünebilirliği, siderofor üretimi ve indol asetik asit üretim test sonuçları (1 rakamı pozitif sonuç göstermektedir).

Z.15.5.6			1	
Z.15.5.8	1			1
Z.15.5.5	1		1	
Z.15.5.9				1
Z.15.5.1		1		
Z.52.5.3	1		1	
Z.30.5.12	1			1
Z.30.5.8		1		
Z.30.5.7	1	1	1	
Z.30.5.5	1			
Z.305.9	1			1
Z.30.5.11	1			
Z.30.5.6	1			
E.20.1.13			1	