

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

**ÇAYIR-MERA VEJETASYONLARINDAN *AZOTOBACTER* İZOLATLARININ
ELDE EDİLMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ebru ÇELEN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2009

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

**ÇAYIR-MERA VEJETASYONLARINDAN *AZOTOBACTER* İZOLATLARININ
ELDE EDİLMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ebru ÇELEN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 2005.03.0121.011 no'lu proje ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAYIR-MERA VEJETASYONLARINDAN *AZOTOBACTER* İZOLATLARININ
ELDE EDİLMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ebru ÇELEN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 19.01.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Yard. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Doç. Dr. Refik UYANÖZ

ÖZET

ÇAYIR-MERA VEJETASYONLARINDAN *AZOTOBACTER* İZOLATLARININ ELDE EDİLMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ebru ÇELEN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Ocak 2009, 95 sayfa

Azot bağlayan mikroorganizmalar ekosistemlere atmosferik azot gazını (N_2) amonyağa (NH_3) dönüştürerek azot sağlamaktadırlar. *Azotobacter* azot bağlama özelliğinden dolayı ekosistemde ve aynı zamanda bitki büyümesini artıran hormon ve vitamin salgılamasından dolayı tarımsal üretimde önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada Antalya bölgesinde bulunan farklı çayır-mera vejetasyonlarından (Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif, Akseki-Çimi, Manavgat-Demirciler ve Merkez-Aşağıoba), tarlalardan (buğday, mısır, yulaf, kereviz ve patates) ve Bolu mısır tarlasından farklı *Azotobacter* izolasyon yöntemleri kullanılarak 45 *Azotobacter* spp. izole edilmiştir. *Azotobacter* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda, ARDRA (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi), 16S rRNA ve *nifH* geni dizi analizlerinden faydalanılmıştır. Bu izolatlardan beşinin *Azotobacter nigricans* subsp. *nigricans*, 19'unun *Azotobacter chroococcum*, 18'inin *Azotobacter salinestris* ve üçünün *Azotobacter vinelandii* olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmaya göre *A. salinestris* ve *A. chroococcum* olarak saptanan izolatların yaygın olduğu tespit edilirken, *A. vinelandii* ve *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak tanımlanan izolatların dağılımının sınırlı olduğu belirlenmiştir.

Örnek alınan bitki rizosferleri arasında yalnızca *Apium graveolens* (kereviz) rizosferinden, üç farklı *Azotobacter* türüne (*A. salinestris*, *A. chroococcum* ve *A. vinelandii*) ait izolatlar elde edilmesinden dolayı bu bitki rizosferinin *Azotobacter* spp. çeşitliliği bakımından zengin olduğu belirlenmiştir.

Azotobacter izole edilen toprakların kimyasal özelliklerine göre *Azotobacter* spp. dağılımında kalsiyum miktarının istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) olduğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: *Azotobacter*, toprak, ARDRA, 16S rRNA geni, *nifH* geni

JÜRİ: Yard. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Doç. Dr. Refik UYANÖZ

ABSTRACT

THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *AZOTOBACTER* ISOLATES FROM VEGETATIONS OF GRASSLAND AND MEADOW

Ebru ÇELEN

Ph.D. Thesis in Biology

Adviser: Assistant Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

January 2009, 95 Pages

Nitrogen fixing microorganisms provide nitrogen for the ecosystems to transform atmospheric nitrogen gas (N₂) into ammoniac. *Azotobacter* has an important place in ecosystem due to its nitrogen fixing ability and in agricultural production due to its hormone and vitamin releasing characteristic.

In this study, 45 *Azotobacter* spp. were isolated using a variety of isolation methods from various types of meadow-pasture vegetation (Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif, Akseki-Çimi, Manavgat-Demirciler and Centre-Aşağıoba) and fields (wheat, corn, oat, celery and potato) in the Antalya region and from a corn field in Bolu. In the molecular characterization of *Azotobacter* isolates, the ARDRA method, 16S rRNA and *nifH* gene sequences analysis were used. It became apparent that five of these isolates were *Azotobacter nigricans* subsp. *nigricans*, 19 of them were *Azotobacter chroococcum*, 18 of them were *Azotobacter salinestris* and three of them were *Azotobacter vinelandii*.

While the isolates identified as *A. salinestris* and *A. chroococcum* were found to be widespread, the isolates identified as *A. vinelandii* and *A. nigricans* subsp. *nigricans* were found to be limited.

Because the isolates determined as three different *Azotobacter* species (*A. salinestris*, *A. chroococcum* and *A. vinelandii*) were obtained from *Apium graveolens* and it was concluded that this plant rhizosphere is rich in diversity of *Azotobacter* spp.

According to the chemical characteristics of the areas in which *Azotobacter* was isolated, calcium content was found to be statistically significant ($P<0.05$) in distribution of *Azotobacter* spp.

KEY WORDS: *Azotobacter*, soil, ARDRA, 16S rRNA gene and *nifH* gene.

COMMITTEE:Asst. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Adviser)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Assoc. Prof. Dr. Refik UYANÖZ

ÖNSÖZ

Azot bağlayan bakteriler ekosistemler için azot kaynaklarıdır. Azot bağlayan bakterilerden *Azotobacter* bitki büyümesini zenginleştiren metabolitlere sahip olmasından dolayı tarımsal alanlar için önemli bir mikroorganizmadır. Bu nedenle tarımsal uygulamalarda biyolojik gübre olarak kullanımı yaygındır. Bu çalışmada, çayır-mera vejetasyonlarından ve tarlalardan farklı izolasyon yöntemleri kullanılarak *Azotobacter* izolatları elde edilmiştir. İzolatların ARDRA, 16S rRNA geni ve *nifH* gen dizi analizleri yapılarak moleküler olarak karakterizasyonu sağlanmıştır.

Doktora çalışmalarımın ilk aşamalarında doktora danışmanlığını üstlenmiş olan ve tez konusunun belirlenmesinde bana anlayış gösteren ve yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU'na, doktora çalışmalarımın üçüncü yılından sonra doktora tez danışmanım olan Sayın Yard. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ'a desteğinden ve her türlü yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Doktora tez çalışmalarımın ilk yılında izole etmiş olduğum izolatların moleküler çalışmalarını yapmak üzere beni laboratuvarına kabul eden ve destekleyen York Üniversitesi'nden Sayın Prof. Dr. J.W. Peter YOUNG'a, aynı bölümden Sayın Dr. Cyril BONTEMPS'e her türlü yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Doktora tezimin izleme komitesinde yer alan Sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN ve Sayın Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a doktora çalışmama göstermiş oldukları ilgiye teşekkür ederim. Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirmiş olduğum çalışmalarım sırasında bana kolaylık sağlayan tüm Biyoloji Bölümü Sayın Öğretim Üyelerine ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, aynı zamanda Akdeniz Üniversitesi Merkez Araştırma laboratuvarı yönetimine ve çalışanlarına teşekkür ederim. Antalya bölgesi çayır-meralarından örnekler almam için meralar konusunda beni bilgilendiren ve arazi çalışmalarına eşlik eden Antalya Tarım İl Müdürlüğü'nden Çayır-mera grubu personeline, örnek aldığım bitkilerin teşhisinde yardımcı olan Doktora öğrencisi İlker ÇİNBİLGEL'e, DNA dizi analizi çalışmalarım sırasında PAUP uygulamalarında yardımcı olan Yüksek Lisans öğrencisi Sarp KAYA'ya ve toprak özelliklerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan Doktora öğrencisi Pınar KAYA'ya teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaştığım Erdal ÖZLÜ'ye ve Tezin yazımında yardımcı olan Doktora öğrencisi Deniz ŞİRİN ve

Mehmet Sait TAYLAN’a da teşekkür ederim. Her türlü destekleriyle yanımda olan aileme şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını 2005.03.0121.011 no’lu proje ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi’ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Azot Döngüsü ve Azot Bağlanması	3
2.2. Çayır-Meralarda ve Tarımsal Alanlarda Azot Döngüsü	5
2.3. Biyolojik Azot Bağlanmasının Biyokimyası ve Genetiği	8
2.4. Azot Bağlayan Mikroorganizmalar ve <i>Azotobacter</i>	10
2.5. <i>Azotobacter</i> Dağılımı ve Ekolojisi	15
2.6. <i>Azotobacter</i> 'in Bitkiler Üzerine Etkisi, Tarımsal Uygulamaları ve Endüstriyel Kullanımları	16
2.7. Mikroorganizmaların Tanımlanmasında 16S rRNA Geninin Önemi	18
2.8. Bakterilerin Karakterizasyonunda ARDRA (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi)	19
2.9. <i>NifH</i> Geninin Filogenideki Önemi	20
2.10. <i>Azotobacter</i> Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar	21
3. MATERYAL ve METOT	23
3.1. Toprak Örneklerinin Alınması	23
3.2. Toprağın İzolasyon İçin Hazırlanması	24
3.3. Çalışmada Kullanılan Referans Bakteriler	24
3.4. <i>Azotobacter</i> İzolasyonu ve <i>Azotobacter</i> İzolatlarının Seçilmesi	24
3.4.1. KOH testi	25
3.5. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu	26
3.5.1. DNA izolasyonu	26
3.5.2. 16S rRNA geninin çoğaltılması	27

3.5.3. ARDRA.....	27
3.5.4. <i>NifH</i> genin PZR ile çoğaltılması	27
3.5.5. DNA için agoroz jelin hazırlanması.....	28
3.5.6. ARDRA sonuçlarının değerlendirilmesi	28
3.5.7. Dizi analizleri	29
3.6. Toprak Analizi.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. <i>Azotobacter</i> İzolasyonu	31
4.2. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu.....	34
4.2.1. ARDRA.....	34
4.2.2. 16S rRNA geni dizi analizi	45
4.2.3. <i>NifH</i> gen dizi analizi.....	53
4.3. <i>Azotobacter</i> İzolatları ve İzole Edildiği Habitatlar	58
4.4. Toprak Analizleri	59
5. TARTIŞMA.....	62
5.1. <i>Azotobacter</i> İzolatlarının Elde edilmesi ve Farklı İzolasyon Yaklaşımları.....	62
5.2. <i>Azotobacter</i> İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu	63
5.3. <i>Azotobacter</i> Dağılımı	71
6. SONUÇ	77
7. KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
mm	Milimetre
M	Molar
pH	Hidrojen potansiyeli
cm	Santimetre
Mt	Megaton
gr	Gram
dak	Dakika
sn	Saniye
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
bç	Baz çifti
dNTP	Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin nükleotit karışımı
KOH	Potasyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
K_2HPO_4	Dipotasyum hidrojen fosfat
FeSO_4	Demir sülfat
MgSO_4	Magnezyum sülfat
Na_2MoO_4	Disodyum molibdat
CaCl_2	Kalsiyum klorür
NO_3	Nitrat
NO_2	Nitrit
N	Azot

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
TSA	Triptik soy agar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	Tris-borik asit-EDTA
BAB	Biyolojik azot bağlanması
ARDRA	Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)
UPGMA	Grup ortalaması kümelemesi (Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average)
PHYLP	Filogenetik çıkarım paket programı (Phylogeny Inference Package)
PAUP	Parsimoni kullanarak filogenetik analiz (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)
NJ	Komşu Bağlama (Neighbour – joining)
ML	Maksimum olasılık (Maximum Likelihood)
AIC	Akaike Information Criterion
hLRT	Hierarchical Likelihood Test
DSMZ	Almanya kültür koleksiyonu (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karasal azot döngüsü ve biyolojik azot bağlanması.....	4
Şekil 2.2. Merada azotun kaynakları ve kaybolma yolları	5
Şekil 2.3. FeMo ve Fe nitrojenazlarının polipeptitleri.....	8
Şekil 2.4. Farklı ekosistemlerde biyolojik azot bağlayan mikroorganizmalar	11
Şekil 2.5. <i>Azotobacter</i> (Azt.), <i>Azomonas</i> (Azm.), <i>Azospirillum</i> (Azs.) ve <i>Pseudomonas</i> cinslerine ait türlerin 16S rRNA gen dizilerinin NJ algoritması kullanılarak karşılaştırmalı analizi	12
Şekil 2.6. <i>Azotobacter</i> (Azt.), <i>Azomonas</i> (Azm.) ve <i>Pseudomonas</i> cinslerine ait türlerin <i>atpD</i> , <i>carA</i> ve <i>recA</i> gen dizilerinin NJ algoritması kullanılarak karşılaştırmalı analizi	13
Şekil 4.1. <i>A. beijerinckii</i> DSM378 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü.....	32
Şekil 4.2. BZ1 izolatu hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü	32
Şekil 4.3. BOZ2 izolatının Burk azotsuz mannitollü katı besi ortamındaki görüntüsü	33
Şekil 4.4. BZ5 izolatının Burk azotsuz mannitollü katı besi ortamındaki görüntüsü	33
Şekil 4.5. AA11 izolatının TSA katı besi ortamındaki görüntüsü.....	33
Şekil 4.6. İzolatların 16S rRNA genlerinin 1500 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin Agoroz jel görüntüsü	34
Şekil 4.7. İzolatların 16S rRNA genlerinin 1500 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin Agoroz jel görüntüsü	35
Şekil 4.8. <i>Azotobacter</i> ve <i>Azomonas</i> referans suşlarının 16S rRNA genlerinin <i>RsaI</i> (soldaki) ve <i>HhaI</i> (sağdaki) enzimlerinin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü.	36
Şekil 4.9. <i>Azotobacter</i> ve <i>Azomonas</i> referans suşlarının 16S rRNA genlerinin <i>HpaII</i> (soldaki) ve <i>FnuDII</i> (sağdaki) enzimlerinin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü.	36
Şekil 4.10. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>RsaI</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü.	37
Şekil 4.11. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>RsaI</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	37

Şekil 4.12. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>FnuDII</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.13. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>FnuDII</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.14. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>HpaI</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	39
Şekil 4.15. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>HpaII</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	39
Şekil 4.16. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>HhaI</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü	40
Şekil 4.17. İzolatların 16S rRNA genlerinin <i>HhaI</i> enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü.	40
Şekil 4.18. ARDRA verilerinden elde edilen UPGMA dendrogramı	44
Şekil 4.19. 16 izolat ve <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> ve <i>Pseudomonas</i> cinslerine ait türlerin 16S rRNA geni filogenetik (seç bağla) ağacı	51
Şekil 4.20. 16 izolat ve <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> ve <i>Pseudomonas</i> cinslerine ait türlerin 16S rRNA geni filogenetik (uzaklık) ağacı	52
Şekil 4.21. <i>Azotobacter</i> izolatlarının <i>nifH</i> genlerinin yaklaşık 500 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü	54
Şekil 4.22. 22 izolat ve <i>Azotobacter</i> ve <i>Azomonas</i> cinsi türlerine ait <i>nifH</i> geni filogenetik (seç bağla) ağacı	55
Şekil 4.23. 22 izolat ve <i>Azotobacter</i> ve <i>Azomonas</i> cinsi türlerine ait <i>nifH</i> geni filogenetik (uzaklık) ağacı	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tarla bitkisi, mera ya da hayvan yemi baklagillerindeki <i>Rhizobium</i> , ya da baklagil olmayan bitkilerdeki endofitik ya da serbest yaşayan bakteriler tarafından tarımsal sistemlerde yıllık bağlanan azotun tahmini değerleri.....	6
Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin toplandığı alanlar, bitkiler ve tarihler.....	23
Çizelge 3.2. Bakteri hücresinden DNA izolasyonunda kullanılan PZR döngü programı	26
Çizelge 3.3. 16S rRNA genin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngü programı.....	27
Çizelge 3.4. <i>NifH</i> genin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngü programı.....	28
Çizelge 3.5. Toprak analizleri ve kullanılan metotlar.	30
Çizelge 4.1. İzolatlar ve referans bakterilere ait 16S rRNA genlerinin dört farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz jel üzerindeki bç uzunluğundaki bant büyüklükleri ve bu büyüklüklere karşılık gelen haplotipler.	42
Çizelge 4.2. İzolatların ve referans suşların restriksiyon enzimlerine karşılık gelen haplotipleri.....	43
Çizelge 4.3. BLAST analizi sonucu izolatlar karşılık gelen bakteriler ve benzerlik oranları.....	45
Çizelge 4.4. Referans bakterilerin ve izolatların 16S rRNA gen dizilerinin değişken bölgeleri.....	48
Çizelge 4.5. Referans bakterilerin ve izolatların <i>nifH</i> gen dizilerinin değişken bölgeleri.	54
Çizelge 4.6. <i>Azotobacter</i> izolatlarının moleküler analizlere göre yakın ilişkili olduğu <i>Azotobacter</i> türleri ve izolatların izole edildiği alan ve bitkiler.	57
Çizelge 4.7. İzolatların isimlendirilmesinde kullanılan izolatların izole edildikleri alanlar ve bölgeler	59
Çizelge 4.8. Analiz edilen toprakların örnek alınan alanlara göre bünye özellikleri	60
Çizelge 4.9. <i>Azotobacter</i> izole edilmiş ve edilmemiş toprak örneklerinin toprak özellikleri miktarlarının ortalamaları ve P değerleri	61

1. GİRİŞ

Biyolojik azot bağlanması yer küreye azot sağlayan önemli bir biyokimyasal olaydır. Azot bağlanması yalnızca prokaryot mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir (Young 1992) ve *Azotobacter*'de serbest yaşayan azot bağlayan mikroorganizmalardan biridir (Kennedy vd 2005). Aynı zamanda, *Azotobacter* bitki verimliliğini artıran etkilerinden dolayı tarımsal uygulamalarda biyolojik gübre olarak kullanılmaktadır (Mrkovacki ve Milic 2001, Cebel 2004).

Tarımsal uygulamalarda bitkisel üretimi artırmak için en yoğun olarak kullanılan, mineral azot içerikli gübrelerdir. Mineral azot gübrelerinden % 14, hayvan atıklarından % 23 olmak üzere amonyak kaybı yaşanmaktadır. Bununla birlikte global düzeyde azot gübrelerinden azot kaybı denitrifikasyon ve yıkanma gibi mekanizmalardan da kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda tarımsal faaliyetlerde uygulanan mineral azot gübrelerinin, yaklaşık % 50'si her yıl kaybolmaktadır. Çevre kirliliğine de neden olan bu uygulama, aynı zamanda 3 milyar dolar ekonomik kayıp olarak rapor edilmiştir (FAO 2001, Roy vd 2002). Bununla birlikte kullanılan gübrelerin canlı ve çevre üzerine de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, biyolojik azot bağlayan mikroorganizmaların tarımsal uygulamalarda kullanımı yaygınlaştığı görülmektedir.

İnsan popülasyonlarının yaşam alanlarının genişlemesi doğal alanlardaki azot bağlayan mikroorganizmaların yaşam alanlarını daraltmaktadır (Galloway vd 2004). Ekosistemlerdeki azot bağlayan mikroorganizmaların varlığının ve dağılımının tespit edilmesi biyolojik kaynakların değerlendirilmesini ve korunmasını sağlayabilir.

Dünyada mikroorganizmaların özellikle belirli bakterilerin (*Rhizobium* spp. ve *Pseudomonas* spp. gibi) moleküler karakterizasyon ve genetik çeşitlilik araştırmaları yaygın olarak çalışılmaktadır (Pinero vd 1988, De Bruijn 1992, Spiers vd 2000). Ancak *Azotobacter* türlerinin, moleküler karakterizasyon çalışmalarının son derece sınırlı kaldığı görülmektedir. Yirminci yüzyılın ilk ortalarına kadar *Azotobacter* ile ilgili çalışmaların morfolojik ya da biyokimyasal özellikler üzerine yoğunlaştığı

gözenmektedir (Lee ve Burris 1943, Alexander ve Wilson 1956, Dilworth ve Parker 1961, Socolofsky ve Wyss 1961, Layne ve Johnson 1964). Sonraki yıllarda *Azotobacter*'lerin azot bağlama ve bitki besleme özelliklerinin araştırıldığı görülmektedir (Jackson vd 1964, Mehrotra ve Lehari 1971, Cannon ve Postgate 1976, Kennedy ve Robson 1983, Bishop 1986, Yates vd 1997).

Çok sayıda ülkede yapılmış çok sayıda (Rusya, Kanada, Polonya ve Brezilya gibi) *Azotobacter* çalışmalarına rastlanmış olmasına karşın (Krasilnikov 1949, Kole vd 1988, Martyniuk ve Martyniuk 2003, Baldani ve Baldani 2005), Türkiye'de bu konudaki araştırmaların (Özkan 1986, Kargı ve Özmihci 2004, Kizilkaya 2008, Kizilkaya 2009) ve azot bağlayan mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonu ile ilgili çalışmaların (Sahin 2005) çok sınırlı olduğu görülmüştür. Türkiye'de araştırmacılar özellikle son yıllarda genel olarak azot bağlayan bakteriler arasında yer alan *Rhizobium*, *Azospirillum* ya da *Azotobacter* izolatlarının bitkilere aşılınması ve etkisi konusuna yoğunlaşmıştır (Kızıloğlu ve Bilen 2004, Salantur vd 2005, Ögüt vd 2005).

Bu çalışmanın birinci amacı farklı çayır-mera vejetasyonlarından ve tarlalardan *Azotobacter* izolatlarını elde etmek ve izolatların moleküler karakterizasyonunu yapmaktır. *Azotobacter* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda ARDRA (Amplified ribosomal restriction analysis), 16S rRNA geni ve *nifH* gen dizi analizlerinden faydalanılmıştır. Çalışmanın diğer amacı ise elde edilen *Azotobacter* izolatlarının, izole edildikleri bitki rizosferi ya da toprak özellikleri ile ilişkilendirmek ve *Azotobacter*'in dağılımını araştırmaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Azot Döngüsü ve Azot Bağlanması

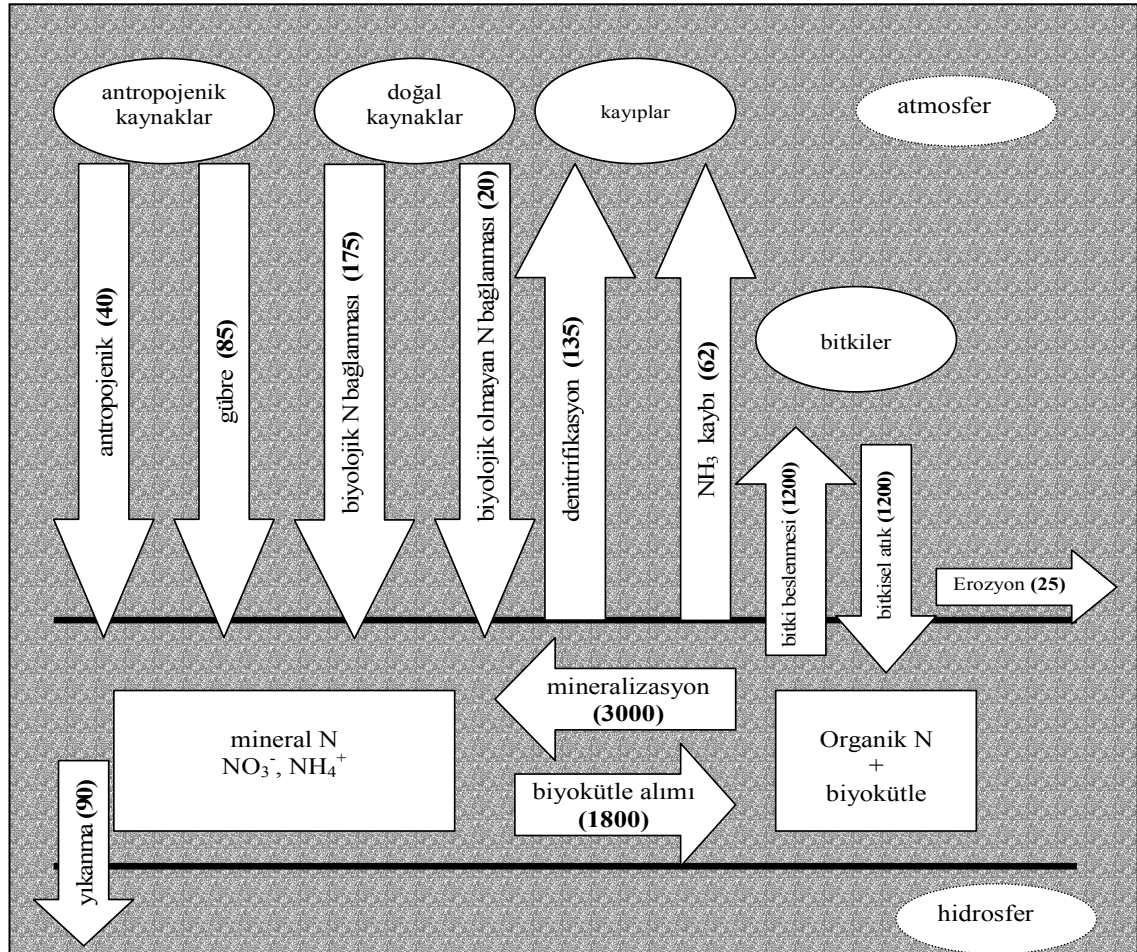
Azot canlıların yapısında bulunan temel elementlerden biridir. Azot yerkürede kimyasal ve biyolojik olaylarla farklı formlar (NH_3 , NO_3 , NO_2 , NO , N_2 gibi) alabilmektedir ve atmosfer ile yeryüzü arasında azot döngüsü olarak adlandırılan dönüşümü gerçekleştirmektedir. Bu döngü içerisinde yer alan biyolojik ve biyolojik olmayan azot bağlanması; atmosferik azotun (N_2), gaz olmayan azotlu bileşiklere (NH_4^+) dönüşümüdür. Biyolojik olmayan azot bağlanması (20 Mt N yıl) karasal yaşama biyolojik azot bağlanmasından (175 Mt N yıl) daha az katkı sağlar (Paul ve Clark 1996) ve biyolojik azot bağlanmasının % 60'ı toprak, % 40'ı okyanus kaynaklıdır (Madigan vd 2000).

Biyolojik azot bağlanması (BAB) N_2 'un enzimatik redüksiyon reaksiyonlarıyla amonyağa (NH_3) dönüşümüdür. İlk oluşan azotlu bileşik olan amonyak, aminoasit biyosentezinin başlangıç molekülüdür (Madigan vd 2000). Bu günkü bilgimize göre yalnızca prokaryotlar BAB yeteneğine sahiptir (Young 1992). İnsanlar tarafından besinlerle alınan azotun 23 milyon m^3 'lük hacminin yarısı bakteriler tarafından gerçekleştirilen biyolojik azot bağlanmasıdır (Halleib ve Ludden 2000).

Karasal yaşamda azot denitrifikasyon, erozyon ve yıkanma gibi olaylardan dolayı topraktan ya da biyosferden devamlı uzaklaşmaktadır. Bu nedenle BAB karasal yaşam için en önemli azot kaynağıdır (Paul ve Clark 1996). Ekosistemlerde bulunan azotun canlı için kullanılabilir olması azotun formuna bağlıdır. Azot organik bileşikler ya da biyokütle içinde buluna bileceğinden dolayı azotun kullanılması için mineralize edilmesi gerekmektedir. Genel olarak bitkiler NH_4^+ ya da NO_3^- şeklinde mineral azotu tercih etmektedir. Oksijensiz koşullarda NH_4^+ hareketsizdir ancak katyon olmasından dolayı negatif yüklü kil mineralleri tarafından adsorbe edilebilmektedir (Madigan vd 2000). Aerobik koşullarda NH_4^+ nitrifer mikroorganizmaları (amonyak okside edenler ve nitrit okside edenler) tarafından hızla nitrata (NO_3^-) çevrilmektedir. NO_3^- , suda NH_4^+ 'a kıyasla daha fazla hareketlidir ve toprakta bitkiler ve diğer canlılar tarafından

kullanılmadığında suyla uzaklaşa bilmekte (yıkama) ya da denitrifikasyon bakterileri tarafından azot gazına dönüştürülerek atmosfere geri verilmektedir (Madigan vd 2000) (Şekil 2.1).

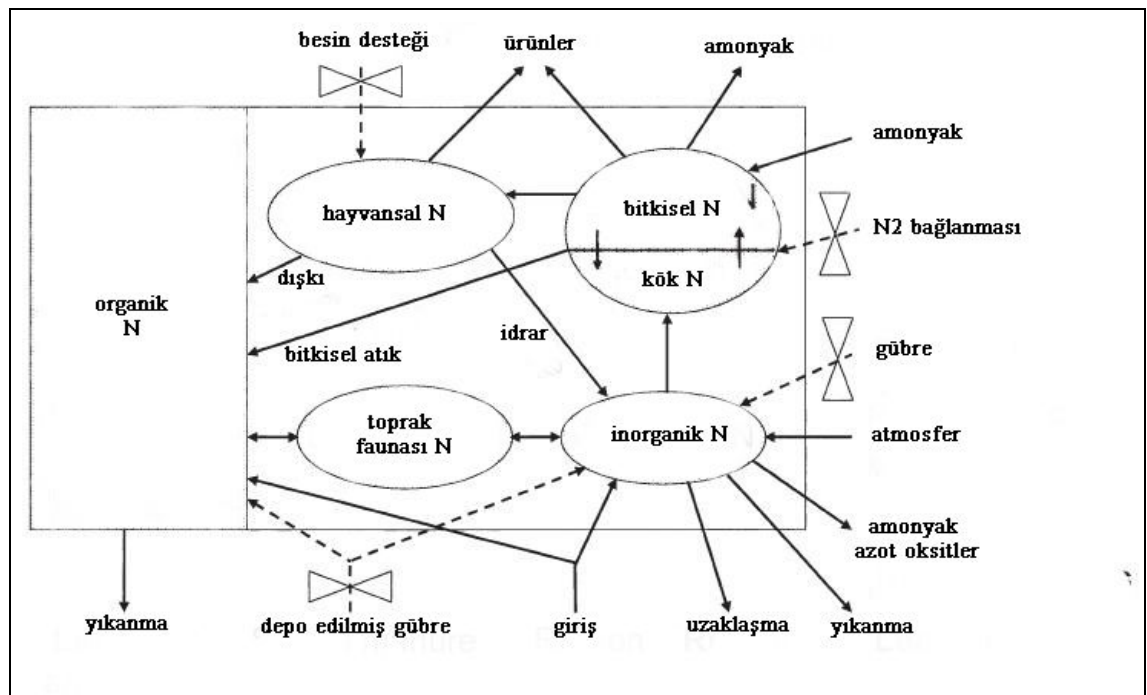
Doğal koşullar altında azot bağlanması sonucu azot girişinin ve sistemden çıkan azotun bir denge içinde olduğu varsayılır. Ancak modern tarım ve endüstriyel uygulamalardan dolayı sentetik azot gübresi gibi yeni azot girdileri eklenmiştir. Çok sayıdaki ekosistemde, artan azot düzeyleri gözlenmiştir ve bu azot doygunluğu ciddi ekolojik sorunlara neden olmakta ve aynı zamanda canlı sağlığını tehdit etmektedir (Barabasz vd 2002, Sulak ve Aydın 2005). Bu problemlerin başında yüzey sularında gelişen ötrofikasyon, sera gazlarının artması, içme sularına azotlu (nitrit, nitrat ya da nitrosamin) bileşiklerin bulaşması ve biyoçeşitliliğin azalması gelmektedir (Tokmak 1995, Socolow 1999, Barabasz vd 2002, Hopkins ve Holz 2006).



Şekil 2.1. Karasal azot döngüsü ve biyolojik azot bağlanması. Karasal sistem için tahmin edilmiş azot (N) Mt yıl⁻¹ değerleri (Paul ve Clark 1996)

2.2. Çayır-Meralarda ve Tarımsal Alanlarda Azot Döngüsü

Besin döngüsü belirli kaynaklar arasında bir elementin hareketidir ve mikro alanlarda ya da daha büyük alanlarda giriş ve kayıplar yaşanır. Meralara azot girişi simbiyotik ya da simbiyotik olmayan azot bağlanması, inorganik ya da organik gübre, hayvan ya da bitki atıkları gibi yollarla sağlanmaktadır (Şekil 2.2) (Rotz vd 2005).



Şekil 2.2. Merada azotun kaynakları ve kaybolma yolları (Rotz vd 2005)

Merada baklagiller tarafından bağlanan azotun 10-270 kg N ha⁻¹ arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Ledgard 2001). Farklı bir çalışmada, hayvanların yem bitkisi olarak kullandığı baklagil bitkileri için bu tahmin 100-200 kg N ha⁻¹ olarak rapor edilmiştir (West ve Mallorina 1996). Literatürdeki bu sayılar, genel olarak yazarların azot bağlanmasının ölçülmesindeki metodolojik ve hesaplama farklılığından dolayı değişebilmektedir. Tarımsal alanlarda farklı biyolojik sistemler tarafından bağlanan azotun tahmini değerleri çizelgede sunulmuştur (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Tarla bitkisi, mera ya da hayvan yemi baklagillerindeki *Rhizobium*, ya da baklagil olmayan bitkilerdeki endofitik ya da serbest yaşayan bakteriler tarafından tarımsal sistemlerde yıllık bağlanan azotun tahmini değerleri (Herridge vd 2008)

Ajan	Tarımsal sistem	Alan (Mha)	N bağlanma oranı (kg N/ha/yıl)	Üründeki bağlı azot (Mt/yıl)
Baklagil- <i>Rhizobium</i>	Tarla baklagil bitkileri	186	115	21
Baklagil- <i>Rhizobium</i>	Mera ve hayvan yemi baklagilleri	110	110-227	12-25
<i>Azolla</i> -siyanobakteri, siyanobakteri,	Pirinç	150	33	5
Endofitik,serbest yaşayanlar	Şeker pancarı	20	25	0.5
Endofitik,serbest yaşayan	Baklagil ve pirinç dışındaki tarla alanı	800	<5	<4
Endofitik,serbest yaşayan	Otlatma için kullanılan tropik savanlar	1.390	<10	<14

Azot birikim oranı ve zamanı bir çok faktöre (fosfor girdisi, diğer elementlerin girdisi, bitki vejetasyonu, meranın yönetimi gibi) bağlıdır (Rotz vd 2005) bundan dolayı azotun idaresi kırılgan bir dengeye sahiptir (Janzen vd 2003). Bu bağlamda tarımsal üretim sistemlerinde azotun giriş ve kaybolma yollarının bilinmesi ve azot bütçesinin belirlenmesi önemlidir. (Güleç ve Karaman 2004, Güleç ve Derici 2004). Meralarda sığır ya da koyun otlatması hayvansal atıklar aracılığı ile azot döngüsünü etkilemektedir (Clegg 2006). Hayvan dışkısı ve idrarının içerdiği azot formu ve oranları birbirinden farklıdır. Dışkıda % 20-25 suda çözünür amonyak (Kirchmann ve Witter 1992), hayvan idrarında ise % 50-80 üre bulunmaktadır (Hynes ve Williams 1993). Hidrolize olan üre nitrifikasyon ile uzaklaşmasına karşın yüksek pH'dan (üenin parçalanması sonucu) dolayı kısmen buharlaşabilmektedir. Otlatma yapılan meralarda hayvanların geride bıraktığı bitki atıklarında parçalanmakta ve azot, fosfor gibi besinlerin serbest kalmasını sağlamaktadır (Peyraud ve Delaby 2006). Azot hareketli bir element olmasından dolayı meralarda eksikliği görülebilmektedir. Genelde bu problem inorganik gübre kullanımı ile giderilmeye çalışılmaktadır. Ancak azotlu gübre kullanımı özellikle pH'ı düşürmesinden dolayı mikroorganizmaların miktarını olumsuz etkilemektedir (Barabasz vd 2002, Clegg 2006). Meralardan azot, genel olarak bitkiler tarafından alınma,

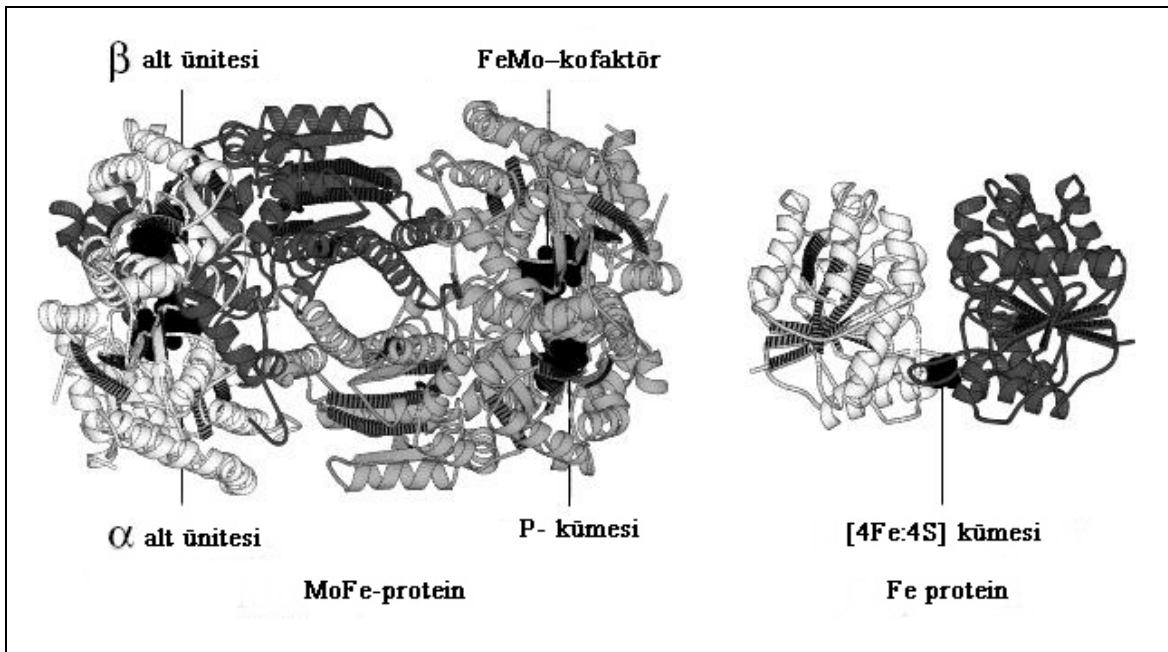
amonyak buharlaşması, suyla yıkanma, hayvansal ürünler (süt, tüy, et), erozyon gibi nedenlerle uzaklaşmaktadır (Rotz vd 2005).

Türkiye topraklarının % 73'ü, toprak, bitki ve hayvan verim kaybına, toprak besin maddelerinin azalmasına ve suların kirlenmesine neden olan erozyona maruz kalmaktadır (Balabanlı vd 2005). Erozyonun oluşması topografik ve jeolojik olarak bir çok nedene bağlıdır. Türkiye'de doğal çayır-mera alanları 21.7 milyon hektar alan kaplamaktadır ve bu alanların ekolojik koşullarından ve yanlış kullanımlarından dolayı verimleri çok düşük kalmıştır (Okuyucu ve Okuyucu 2006). Meraların bitki örtüsü bakımından zayıf olması erozyon olasılığını da artırmaktadır. Eğimli (% 16) ve millî tınlı bir arazide 18 cm kalınlığındaki bir toprağın yok olması için geçmesi gereken zaman nadas alanlarında 7 yıl, yalnız mısır ekilen alanlarda 11 yıl, mısır-arpa-yoncanın karışık ekildiği arazilerde 40 yıl ve sürekli çayır bitkilerinin bulunduğu alanlarda 33600 yıl olduğu tahmin edilmektedir. Toprak yüzeyinde çim örtüsünün olması ve geniş kök sistemleriyle büyük toprak kitlelerini muhafaza etmesi çayır ve mera bitkilerinin erozyonu önlemede (özellikle eğimli arazilerde) etkili olabileceğini işaret etmektedir (Balabanlı vd 2005).

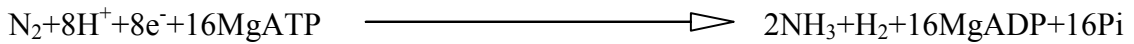
Türkiye'de toprakların önemli bir bölümü tortul ve metamorfik kayalardan oluşmuş olup, % 64'ünde organik madde oranı % 1'in altında, % 22'sinde % 1-2 arasında ve % 14'ünde % 2'nin üzerindedir, sonuç olarak bu toprakların organik madde yönünden oldukça fakir olduğu rapor edilmiştir (Karaşahin 1995). Çayır-mera bitkilerinin verimini artırmak için azot, fosfor ve potasyum gibi gübre kullanımlarının etkili olduğu gösterilmiştir (Elliott ve Abbott 2003, Gierus vd 2005, Albayrak vd 2008). Ancak, kimyasal tarımsal uygulamalar (kimyasal gübre gibi) ileriki dönemlerde çevresel problemler yaratmaktadır (Socolow 1999, Janzen vd 2003). Bu nedenlerle tarımsal alanların veriminin artırılması için mikroorganizmaların aktivitelerinden faydalanan alternatif yaklaşımlar (mikrobiyal gübre gibi) ileri sürülmektedir (Cebel 2004, Arcak ve Güder 2004).

2.3. Biyolojik Azot Bağlanması ve Genetiği

BAB'da görev alan nitrojenaz enzimi kompleksi biyokimyasal ve moleküler olarak en fazla çalışılmış proteinlerden biridir. Nitrojenaz protein kompleksi dinitrojenaz (MoFe proteini, *nifDK*) ve dinitrojenaz redüktaz (Fe proteini, *nifH*) olmak üzere iki ayrı metal proteinden oluşmaktadır. MoFe proteini $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer yapıda olup her bir dimer bir FeMo kofaktörü ve bir fosfat grubu içermektedir. Fe-proteini ise iki aynı alt üniteden oluşan bir dimerdir. MoFe proteini substratın (N_2) indirgenmesi için aktif alan içermektedir. Fe ve MoFe proteini arasında kalan P bölgesi (cluster), Fe proteininden gelen elektronları MoFe proteinine aktarmaktadır. Fe proteininde ise elektronların kaynağını oluşturan ATP hidrolizi gerçekleşmektedir (Eady 1996, Rees vd 2005, Dance 2007) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. FeMo ve Fe nitrojenazlarının polipeptitleri (Rees vd 2005)



N_2 üç bağlı bir molekül olmasından dolayı çok fazla stabildir ve aktivasyonu çok yüksek enerji gerektirmektedir. Azot gazını 2 molekül amonyaka dönüştürmek için 8 elektrona ihtiyaç duyulmaktadır. Azot bağlanması indirgenme reaksiyonlarından meydana geldiği için oksijen molekülüne karşı çok duyarlıdır. Bu nedenle hücreler

(özellikle zorunlu aerobik organizmalar) azotun bağlanması aşamalarını oksidasyondan korumak için hücre içi düzenlemeler geliştirmişlerdir. Siyanobakterilerde heterokist yapısı gözlenirken, *Azotobacter* hücrelerinde alginat kapsülleri görülmektedir. Leghemoglobin içeren *Rhizobium* gibi simbiyotik bakterilerde ise bitki köklerinde nodül oluşumu yaparak hücrelerini oksijen basıncından kısmen korumaktadırlar. Leghemoglobin oksijeni bağlayarak ortamdaki oksijen konsantrasyonunu kontrol etmektedir (Madigan vd 2000). *Azotobacter* gibi bakterilerin solunumu çok yüksektir bu şekilde oksijeni, hızlı solunum yoluyla uzaklaştırabilmektedirler (Kennedy vd 2005). Sonuç olarak her hücre azot bağlama reaksiyonlarını kendine özgü düzenleyici sistemleriyle kontrol etmektedir (Madigan vd 2000).

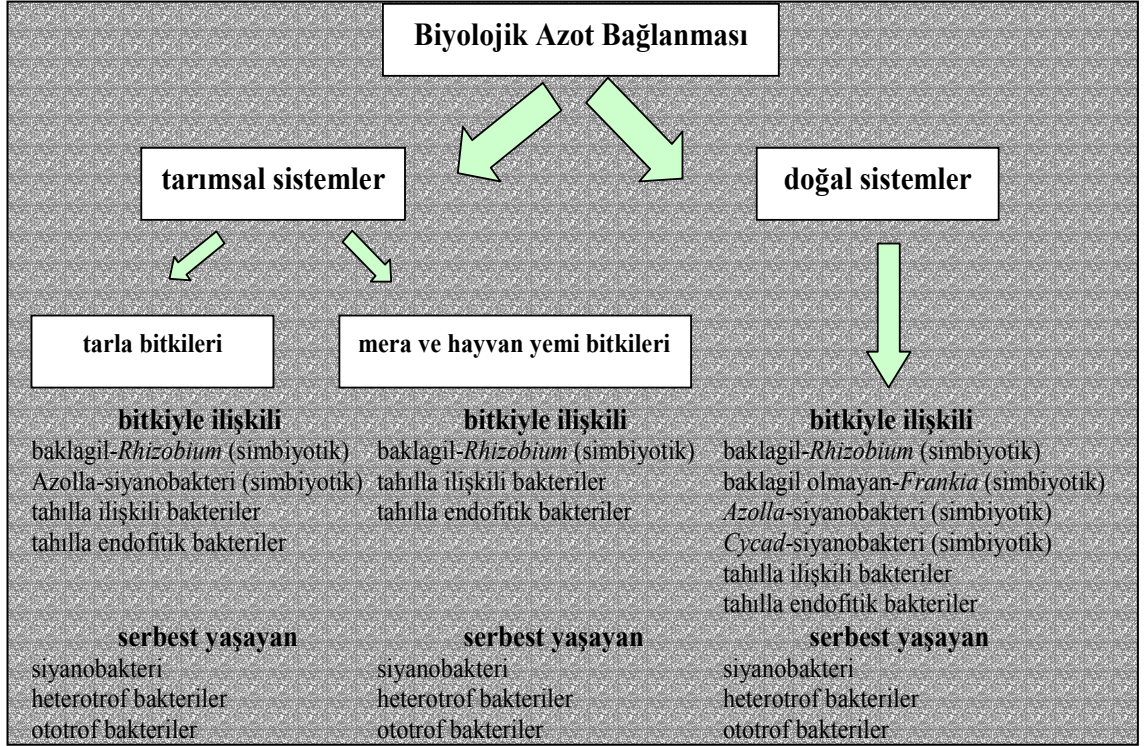
Biyolojik azot bağlanmasından sorumlu genler özellikle *Klebsiella pneumoniae* (Madigan vd 2000) ve *Azotobacter vinelandii* bakterilerinde moleküler olarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Kennedy vd 2005). Genel olarak BAB'dan sorumlu genler ve düzenlemeleri organizmalar arasında farklılık göstermektedir. Bu bölümde tezin konusu *Azotobacter* grubu olmasından dolayı özellikle bu organizmanın genleri göz önünde tutulmuştur.

NifHDK genleri nitrojenaz enziminin ana yapısal proteinlerini kodlamaktadır. *Nif* grubundaki diğer genlerinin (*nifV*, *nifEN*, *nifH*) ürünlerinin özgün fonksiyonları azot bağlanmasında ve redüksiyonunda enzim için gerekli bileşen olan Fe-Mo kofaktörünün sentezi için gereklidir. *NifU*, *nifS* enzimde kofaktöre elektron transferi ile ilgili Fe-S grubunun oluşumunda katkı sağlamaktadır. *NifM* ve *nifW* enzimin olgunlaşması ile ilgilidir (Kennedy vd 2005). Bunların dışında *A. vinelandii* de *nifA* ve *nifL* regülatör proteinlerini kodlayan bir operonda *nifA* ve *nifL* genlerini de bulundurmaktadır. *NifL*, *nif* genlerinin yüksek amonyum ve oksijen koşullarında enzimin ekspresyonunu engellemektedir. Flavin kofaktörü taşıyan NifL proteini, *nif* genlerinin ve operonlarının transkripsiyonel aktivatörü olan *nifA*'nın aktivitesini inhibe eder (Dixon 1998). Proteobakterideki diğer azot bağlayan mikroorganizmalardan farklı olarak *A. vinelandii* de amonyumla azot bağlanması inhibisyonu *nifL* tarafından *nifA*'nın inaktivasyonu ile oluşmaktadır (Kennedy vd 2005).

Test edilen tüm *Azotobacter* türlerinin Mo içermeyen bir ya da daha fazla alternatif nitrojenaz enzimi sentezleme potansiyelleri vardır. Biyokimyasal ve dizi analizleri verilerine göre, *A. vinelandii* farklı yapısal alt üniteli 3 farklı nitrojenaz enzimini kodlamaktadır. i) Mo nitrojenaz (nitrojenaz 1 *nifHDK* genleri tarafından kodlanmakta), ii) V içeren enzim (nitrojenaz 2 *vnfH*, *vnfDGK* genlerini ile kodlanmakta), iii) nitrojenaz 3 Fe içeren nitrojenaz (*anfHDGK* gen grubu tarafından kodlanan) (Bishop ve Joerger 1990, Rangaraj vd 2000). Benzer şekilde *A. chroococcum* MCDI'de de, Nif ve Vnf enzimleri tespit edilmiştir. *A. chroococcum* (MCDI, ATCC 480, ATCC9043), *A. beijerinckii* (ATCC 19360), *A. nigricans* (ATCC35009) ve *A. salinestris* (ATCC49674) yalnızca *nif* ve *vnf* genlerini içermektedir. *A. vinelandii* ve *A. paspali* (ATCC23367 ve ATCC23833) *nif*, *vnf* ve *anf* genlerini taşımaktadır. *Azomonas agilis* de bu üç gene sahiptir (Loveless ve Bishop 1999).

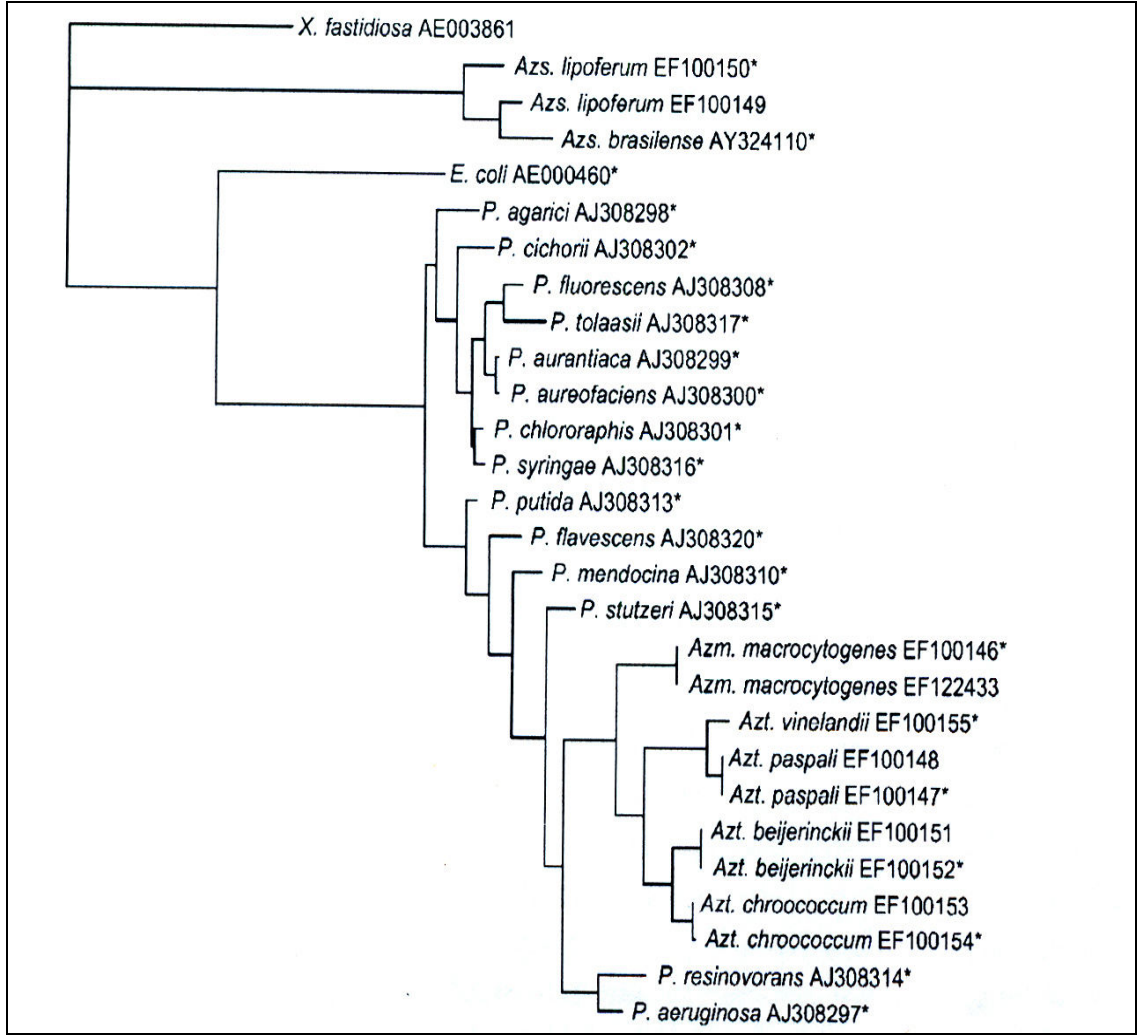
2.4. Azot Bağlayan Mikroorganizmalar ve *Azotobacter*

BAB yalnızca prokaryotik organizmalara ait bir özelliktir. Azot bağlanması bakterilerin filogenetik gruplarının çoğunda (siyanobakteriler, alfa, beta, gama proteobakteri, Firmicutes, Actinobacteria gibi) ve çok sayıda cinse dağılmış bir özelliktir (Young 1992). Farklı azot bağlayan organizmalar ve simbiyotik bitkiler, tarımsal ve doğal ekosistemlerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Herridge vd 2008).

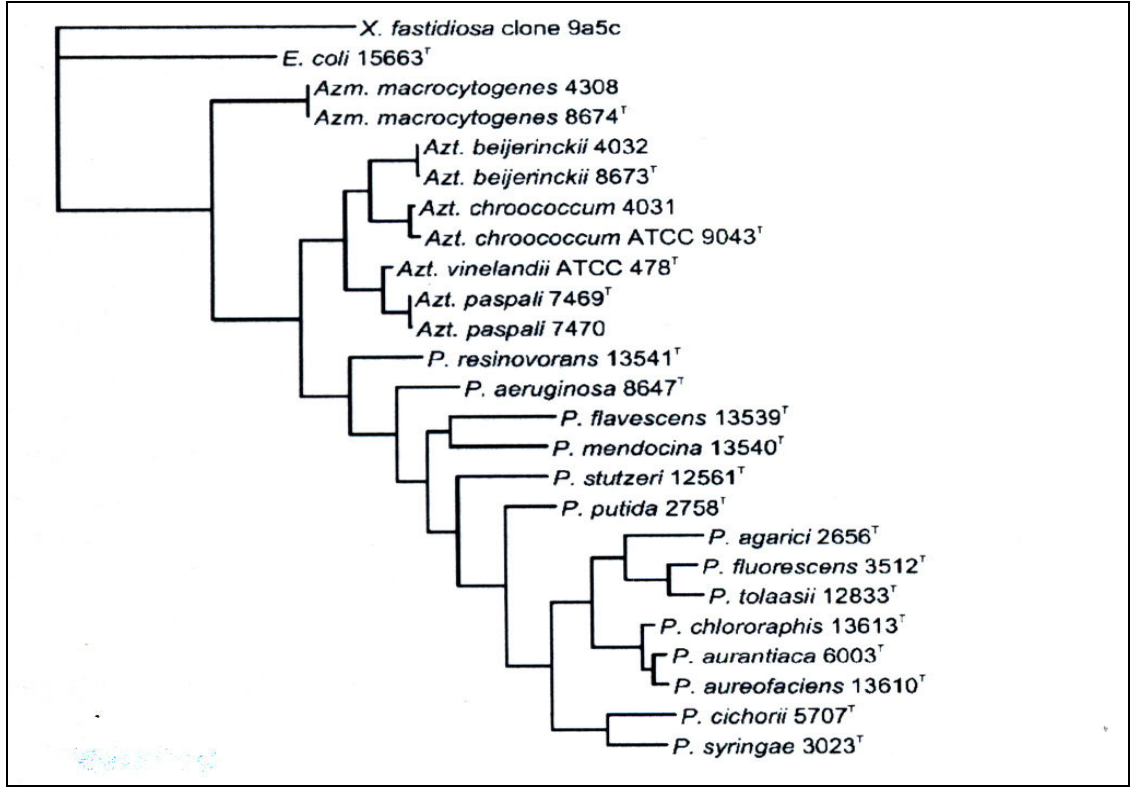


Şekil 2.4. Farklı ekosistemlerde biyolojik azot bağlayan mikroorganizmalar (Herridge vd 2008)

Azotobacter üyeleri, bakteri domaninde γ -proteobakteri grubunda yer alan *Azotobactereaceae* familyasında *Azotobacter* cinsine dahildir. *Azotobacter* üyeleri zorunlu aerobik solunum yapan, heterotrofik ve serbest yaşayan organizmalardır ve tanımlanmış 7 türü bulunmaktadır: *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter armeniacus*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *Azotobacter paspali*, *Azotobacter salinestris* ve *Azotobacter nigricans* (Kennedy vd 2005). *Azotobacter*'e en yakın akraba grup *Azomonas*'dır ve aynı familya içindedir. *Pseudomonas aeruginosa* gibi *Pseudomonas* cinsine ait bazı türler de *Azotobacter*'e yakın akraba olarak gözlenmektedir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Young ve Park 2007).



Şekil 2.5. *Azotobacter* (*Azt*), *Azomonas* (*Azm*), *Azospirillum* (*Azs*) ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin 16S rRNA gen dizilerinin NJ algoritması kullanılarak karşılaştırmalı analizi (Young ve Park 2007)



Şekil 2.6. *Azotobacter* (*Azt.*), *Azomonas* (*Azm.*) ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin *atpD*, *carA* ve *recA* gen dizilerinin NJ algoritması kullanılarak karşılaştırmalı analizi (Young ve Park 2007)

Azotobacter hücreleri kültürün yaşına ya da ortamına bağlı olarak düz çomak ya da daha çok elipsoid, kok şeklinde görülmektedir. Hücreler 2 µm çapa, 4 µm uzunluğa sahiptir. *Azotobacter paspali* hücrelerinin uzunluğu çoğunlukla 5-10 µm uzunluğundadır. Karbon kaynağı olarak glikoz bulunan azotsuz Winogradsky ortamında farklı *Azotobacter* türlerinin genç hücrelerinin görünüşleri oldukça benzer olup, uçları yuvarlak çomak şeklindedir. Bazı türlerin yaşlı kültürlerinde hücreler elipsoid yada kok şeklinde de olabilmektedir. Azot bağlama koşullarında hücreler amonyaklı ortama göre daha küçüktür. Hücreler genellikle tek ancak, çiftler halinde de bulunabilmektedir. Hücreler peritrikus kamçılarıyla hareketli ya da hareketsizdir. *A. beijerinckii* ve *A. nigricans* hareketsiz olan türlerdir. Hücre duvar içeriği ile ilgili olarak hücrelerin en dış yüzey bileşeni, protein içeren S tabakadır. Tabaka yapısal olarak *Pseudomonas* türlerine ve *Aeromonas salmonicida*'ninkine benzerlik göstermektedir. Azot bağlayan *Azotobacter* hücreleri çok karmaşık bir iç zar (membran) ağına sahiptir. Bu ağ, nitrojenaz sentezinin ve solunum derecesinin artmasına paralel olarak oluşmaktadır (Kennedy vd 2005).

Azotobacter çoğaltmak için Winogradsky, Brown, Burk'un azotsuz besi ortamları kullanılmaktadır (Kennedy vd 2005). *Azotobacter* şeker, alkol ve organik asitleri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler. *Azotobacter*'ler azotun yeterli olmadığı durumda atmosferik azotu bağlamaktadırlar. Azot bağlayan bakterilerin çoğalması için optimum pH 7,0-7,5'dir (Becking 1992, Kennedy vd 2005). *Azotobacter* azot kaynağı olarak nitrati da kullanabilmektedir. Nitrati özümleme şeklinde nitrit ve nitrat redüktazlar aracılığı ile NH_4^+ 'a dönüştürmektedir (Ramos vd 1993). Tüm *Azotobacter* türleri azot kaynağı olarak üreyi de kullanabilmektedir ve bu özellik *Azomonas* türlerinden *Azotobacter* türlerini ayırmaktadır (Thompson ve Skerman 1979). *Azotobacter* için NH_4^+ 'ın aksine, üre azot bağlanmasını engellememektedir.

Azotobacter'in besi ortamlarındaki kolonileri düz, parlak, opak, hafif konveks ve mukoid görünmekle beraber varyasyon gösterebilmektedir. *A. vinelandii* kolonileri hücre dışı polisakkarit üretimi az olmasından dolayı daha küçüktür. *Azotobacter armeniacus* şeffaf koloniler vermektedir. *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* ve *Azotobacter nigricans* sükroz ve rafinoz gibi şekerlerden difüze olabilen homopolisakkaritler üretmektedir (Thompson ve Skerman 1979, Kennedy vd 2005).

Bazı *Azotobacter* türleri demirin sınırlı olduğu koşullarda sarı-yeşil floresan peptit sidefor olan azobaktin üretmektedir. *A. vinelandii* floresans özelliği olmayan katekolat, azotokelin, protekelin ve aminokelin gibi sideforları üretmektedir. Sideforlar tarafından demir alımı enerjiye bağımlıdır. Sideforlar tarafından Fe^{+3} alımı metal tuzlarına karşı hassasiyet gösterir ve bu nedenle yüksek konsantrasyonda Na^+ , K^+ , Li^+ ya da Mg^{+2} demir alımını azaltır (Cornish ve Page 1998, Kennedy vd 2005).

A. vinelandii özellikle AvO (ATCC 12518) suşu genetik olarak en fazla çalışılmış ve DNA dizi analizi tamamlanmış olan suştur. Bu suş endojen plazmitlere sahip değildir. *A. paspali*'de de herhangi bir plazmit belirlenmemiş olmasına karşın *A. chroococcum* 8 strainin her birinde 2-6 arasında değişen plazmit içerdiği görülmüştür. Bu plazmitlerin büyüklükleri 10,5-300 kb arasında değişmektedir. *A. chroococcum* da genetik olarak çalışılmış türlerden biridir (Kennedy vd 2005). Bazı *Azotobacter*

türlerinin genom büyüklükleri pulse field jel elektroforez ile belirlenmiştir. *A. chroococcum* NCIB 9043 için 3.10 Mb, *A. chroococcum* M4 5,3 Mb ve *A. vinelandii* UW için 4,57 Mb'dir (Manna ve Das 1994, Kennedy vd 2005).

Test edilen *A. vinelandii* ve *A. chroococcum* türlerinde çoklu kromozomlar yaygındır. *A. vinelandii* de kromozom sayısı, değişken olmakla birlikte, durgun fazda hücre başına 80 kopyaya ulaşabilmektedir. Durgun fazın sonlarında DNA kopya sayısı azalmaktadır (Lakshmi vd 2002). *A. chroococcum* MCDI kültürlerinde hücreler 20-25 kopya genom içermektedir (Robson vd 1984). *Azotobacter* türlerinin, rRNA gen grupları altı, yedi yada sekiz kopyalı olabilmektedir (Macdonald ve Melton 1996, Kennedy vd 2005).

2.5. *Azotobacter* Dağılımı ve Ekolojisi

Azotobacter türleri genellikle toprakta bulunmaktadır (Becking 1992). Bakteri sayısı genellikle düşüktür (toprağın gr'ı başına $<10^4$). Dünyanın her yerinde görülmekle birlikte ancak kutuplarda nadiren bulunmaktadır. Fosfora olan bağımlılıklarından dolayı özellikle verimli topraklarda çok daha fazla yaygındır (Kennedy vd 2005). Bakteri sayısı rizosfer bölgelerinde toprağa kıyasla çok daha fazladır (Becking 1992). *A. chroococcum*'un çok sayıda izolatu akarsu, kanal ve su kaynaklarından da izole edilmiştir. *A. vinelandii* bu alanlarda daha az izole edilmiştir ancak bu tür tropik bölgelerde daha yaygındır. *A. beijerinckii* diğer *Azotobacter* türlerinden farklı olarak asidik topraklarda da bulunmaktadır ve bu bakterinin aside karşı daha toleranslı olduğu görülmektedir (Kennedy vd 2005). Sodyuma bağımlı *A. salinestris* yüksek tuzlu topraklardan (Kanada, Mısır Avusturalya) izole edilmiştir (Page ve Shivprasad 1991, Wang vd 1993). Diğer türler ise nadiren izole edilmiştir. *A. nigricans* ve *A. armeniacus* türlerinin dağılımı konusundaki bilgi sınırlıdır (Kennedy vd 2005). *A. paspali* yalnızca bir bitkinin (*Paspalum notatum* cv Batatais) kök sistemleriyle birlikte ortak yaşamaktadır. (Kennedy 2000, Kennedy vd 2005).

Bir çalışmada, Poznan botanik bahçesinin dört farklı habitatından 13 bitki türünün rizosferinde *Azotobacter* bolluğu değerlendirilmiştir (Golebiowska ve

Pedziwilk 1975). Belirli bitki habitatlarının *Azotobacter*'in bolluğunu etkilediği görülmüştür. Martyniuk ve Martuniuk (2003) 31 Polonya toprağı örneğinde *Azotobacter* oluşumunu incelemiş ve 1917-1918 yıllarında aynı bölgede yapılan bir çalışma ile *Azotobacter* bolluğunu karşılaştırmıştır. 2003 yılında örneklenen toprakların % 52'sinin *Azotobacter* ile kolonize olduğu ve 1917-1918 yılında yapılan önceki çalışmanın sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür. Sonuç olarak örnekleme alanında son yıllarda uygulanan yoğun tarımsal faaliyetlere karşın *Azotobacter* içeren toprak örneği sayısının artmadığı gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada, Mangrov ormanında 16 farklı bitki türünden izole edilen *Azotobacter* miktarı bitki türüne göre değişiklik göstermekte olup, toprak örneklerinden daha çok (10 kat) bitki köklerinde (rizosferde) yoğun oldukları belirlenmiştir. Farklı bitki türü topraklarının azot bağlama derecesinin de farklı olduğu ve bunun kök florasındaki farklı bakteri türlerinin birlikteliğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Ravikumar vd 2004).

Toprakta *Azotobacter* miktarı büyüme sezonu süresince bitki türlerine ve gübrelemeye bağlı olarak değişebilmektedir, örneğin buğday rizosferine pirinç bitkisi sapları ya da mineral gübre verilmesi *Azotobacter* gelişimini engellediği gözlenmiştir (Sariv vd 1983). *Azotobacter chroococcum* hücreleri pirinç bitki dokusunda tespit edilmiştir (Rai-eviv vd 1995). *Azotobacter*'in bitki dokusuna penetrasyonu *in vitro* da doku kültüründe incelendiğinde kallus hacmini artırdığı gözlenmiştir (Mezei vd 1997/1998).

2.6. *Azotobacter*'in Bitkiler Üzerine Etkisi, Tarımsal Uygulamaları ve Endüstriyel Kullanımları

Azotobacter grubu üyelerinin, bitkilerin büyümesini uyaran hormon (İndol-3-asetik asit (IAA), giberilin, oksin, sitokinin) ya da vitamin gibi bileşikler salgıladığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir (Gonzalez-Lopez vd 1986, Nieto ve Frankenberger 1989, Revillas vd 2000). Bu grubun üyelerinin fosfatın mineralizasyonunda da etkili olduğu ve fosfatın alımını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Ramos vd 1972, Narula vd 2000). *Azotobacter* bitki ve ekosistemlerdeki bu faydalı özelliklerinden dolayı toprağın

verimini artırmak, bitki gelişimini zenginleştirmek amacıyla tarımsal faaliyetlerde kullanılmaktadır (Cebel 2004).

Azotobacter türleri en başta *A. chroococcum* olmak üzere, Mısır ve Rusya da 1950-1970 yılları arasında çeşitli bitkilerin büyümesini artırmak için geniş ölçüde çalışılmıştır (Kennedy vd 2005). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar *Azotobacter* ile yapılan aşılamaaların bitki ve ürün gelişimini etkilediğini rapor etmektedir. *Azotobacter* aşılamaalarının, pamuk (Iruthayaraj 1981), buğday (Soliman vd 1995, Kumar ve Narula 1999, Narula vd 2007), Hindistan sakız ağacı (Ravikumar vd 2004), pirinç (Kanungo vd 1997, Yanni ve El-Fattah 1999, Piao vd 2005) gibi bitkilerin gelişiminde ve ürün eldesinde farklı oranlarda etkilediği belirtilmektedir. *Azotobacter* su sistemlerinde de azot bağlayabilmesinden dolayı, su kültürlerinde de kullanılabilir (Niewolak 1972, Tripathy ve Ayyappan 2005).

Polihidroksialkonatlar (PHA) karbon ve enerji depo moleküllerinin bir grubudur ve *Azotobacter* hücreleri tarafından üretilmektedir. Çok sayıda bakteri tarafından büyüme sırasında inklizyon cisimcikleri şeklinde hücre içinde biriktirilmektedir. PHA birikiminin hücrenin değişen çevre şartlarına uyum sağlamada, karbon ya da enerji moleküllerinin sınırlı olduğu koşullarda rekabetini artırmada, stres koşullarını tolere edebilmede katkı sağladığı belirtilmiştir (Kadouri vd 2005). PHA beta pozisyonunda farklı alkil grubu içeren homopolimer ya da kopolimerlerdir (Anderson ve Dawes 1990). Hücrelerde PHA molekülleri hücrenin kuru ağırlığının % 90'nını oluşturmaktadır. Bu moleküller polipropilen gibi plastiklere benzemesinden dolayı materyal özellikleri vardır ve bakterilerin endüstriyel kullanım alanlarını oluşturmaktadır (Byrom 1987). *Azotobacter vinelandii*'nin amonyaklı kültürlerindeki hücreleri büyük miktarda poly- β -hidroksibütirat (PHB) depoları bulundurmaktadır ve sitoplazmaları daha az yoğun görünmektedir. PHB depoları nitratla çoğalan ya da azot bağlayan hücrelerde görülmemektedir. *Azotobacter beijerinckii*'de, PHB sentezi kültür koşullarına ve ortama bağlı olarak değişmektedir (Bormann vd 1998).

Alginat, *A. vinelandii* tarafından üretilen en önemli polisakkaritlerden biridir (Gorin ve Spencer 1966). Alginat biyosentezi *A. vinelandii*'de kist oluşumu için

gereklidir çünkü mutant hücrelerde kist oluşumu gözlenmemektedir (Moreno vd 1998). Alginat üretimi *Pseudomonas aeruginosa*'nıninkine son derece benzerdir. *A. vinelandii* ve *A. chroococcum* tarafından sentez edilen polisakkaritler endüstriyel önem taşımaktadır bu nedenle bu polisakkaritler kültür koşullarına bağlı olarak yüksek konsantrasyonlarda üretilmektedir (Pena vd 2000, Vargas-Garcia vd 2003). Aynı zamanda tıbbi transplantasyon ya da ilaç taşıyıcı sistemlerinde de kullanılmaktadır (Draget 1997). Alginat sentezi ile ilgili genler *Azotobacter*'in tüm üyelerinde *Azomonas* ve *Pseudomonas* grubu bakterilerde de bulunmaktadır (Kennedy vd 2005).

2.7. Mikroorganizmaların Tanımlanmasında 16S rRNA Geninin Önemi

Ortak evrim genotipik düzeyde fenotipten daha az problemlidir. Benzer seçici kuvvetlerin etkisi farklı organizmalarda bağımsız şekilde aynı metabolik yeteneğin oluşmasına neden olabilmekte ancak ilgili gen dizileri karakteristik farklılıklar gösterebilmektedir. Dizi değişiminin oranı seçilimle sabit kalır ve bir genden bir başkasına ve aynı genin farklı parçalarında ve farklı gruplarda değişebilmektedir. Sonuç olarak bazı dizilerin varyasyon hızı diğerlerinden daha yüksek olabilmektedir. Örneğin, enzim ya da diğer proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonları, genelde organizma tolere edebilmektedir. Ancak yaşamsal fonksiyona sahip diziler büyük oranda sabit kalmakta ve tüm organizmalarda tanımlanabilmektedirler (Young 1992). Bununla birlikte evrensel filogenetik ağaç için kullanılan pek çok evrensel protein dizisi horizontal geçişler geçirmiş olmasından dolayı, organizmaların evrimsel ağacını oluşturmada anlamlı dallanmalar vermemektedir (Lawrence ve Ochman 1998). rRNA geni tüm organizmalarda bulunur ve protein sentezinde yer alır, bu genin dizisindeki değişiklik organizmanın normal fonksiyonlarını etkilemesinden dolayı ribozom yüksek oranda korunmuştur (Staley 2001). Bakteri cinslerinin nükleotit baz kompozisyonlarının G+C oranı % 30-70 oranında değişirken, rRNA genlerinin G+C oranları % 50-60 oranında değişmektedir (Staley ve Colwell 1973). Bakterilerdeki 1500 ya da daha fazla baz çifti uzunluğundaki 16S rRNA geni, bakterilerin tanımlanmasında yeterli olabilecek bilgiyi içermektedir. Bu genle ilgili olarak diğer önemli bir özellik ise organizmalar arasında horizontal olarak geçtiğine dair herhangi bir verinin mevcut olmamasıdır.

(Staley 2001). Sonuç olarak, 16S rRNA geni evrensel olup, tüm bakteriler arasındaki ilişkileri belirleyebilmektedir (Woese vd 1985, Woese 1987).

Yukarıdaki önemli nedenlerden dolayı son yirmi yıldan fazla süre içinde 16S rRNA bakterilerin tanısında ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde, mikrobiyal populasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanıldığı gözlenmektedir. Aynı zamanda hibridizasyon gibi güvenilir diğer tekniklerle karşılaştırıldığında maliyetinin de ucuz olduğu düşünülebilir. Son yıllarda bu gene ait dizilerin artması ve DNA baz dizilerinin yer aldığı veri bankalarının oluşması ve bu verileri değerlendirebilecek bilgisayar programlarının ve modellerinin geliştirilmiş olması bu genle yapılan çalışmaların çok yaygın olduğunu ve kullanışlılığını işaret etmektedir.

16S rRNA dizisini elde etmek ve kullanmak için öncelikle dizinin başında ve sonunda korunmuş bölgeye karşılık gelen evrensel primerler seçilmektedir. Genel olarak 500-1500 baz çifti uzunluğundaki diziler karşılaştırma için kullanılmasına karşın veri bankalarında dizi uzunlukları değişebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgesinin dizisi elde edildikten sonra PHYLIP, BLAST ve PAUP gibi paket programları aracılığıyla dizilerin karşılaştırılması ve anlamlı veriler haline dönüştürülmesi sağlanmaktadır (Miyamoto ve Cracraft 1991, Clarridge 2004, Hall 2005, Albert 2005).

2.8. Bakterilerin Karakterizasyonunda ARDRA (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi)

ARDRA, rRNA genindeki taksonomik ve filogenetik bilgiyi araştırmak için uygulanan bir metottur. Genin restriksiyon enzimleri ile muamelesinden sonra restriksiyon alanlarının haritalanması ya da kesim sonucu elde edilen jel elektroforetik bantlarındaki örnekler arasında paylaşılan DNA parçalarının oranlarının belirlenmesini sağlamaktadır (Heyndrickx vd 1996, Olive ve Bean 1999). Paylaşılan DNA parçalarının oranı ve bu sonuçlara bağlı olarak örnekler arasında matematiksel ilişkilerin kurulması ve gruplandırılması paket programlarıyla yapılabilmektedir (Nei ve Li 1979). Çok sayıda çalışmada ARDRA, bakterilerin cins ya da tür düzeyinde tanımlanmasında pratik

bir yaklaşım olmasından dolayı gruplara özgü olarak geliştirilmeye çalışılmıştır (Ruiz vd 2000, Atalan 2001, Coelho vd 2003, Aquilanti vd 2004b, Sudagidan vd 2005, De Albuquerque vd 2006, Dickerman vd 2006).

2.9. *NifH* Geninin Filogenideki Önemi

BAB'nın canlılığın ilk bölümünde mi ya da sonraki zamanlarda mı geliştiği tartışma konusudur. Araştırmacıların bir kısmı rRNA genlerinin filogenesi ile *nifH* genlerinin baz alındığı filogenilerin genel olarak birbiriyle uyumlu olduğunu ve benzer şekilde geliştiği konusunda birleşmektedir (Hennecke vd 1985, Young 1992). *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* gruplarına ait *nifH* genlerinin 16S rRNA geninden elde edilen ağacı yansıttığı belirtilmiştir (Hennecke vd 1985). Ancak, horizontal gen akışı evrimsel geçmişte genlerin dağılımını etkileyen bir durumdur ve bazı çalışmalar hem vertikal hem de horizontal gen akışlarının olabileceğini bildirmektedir (Cantera vd 2004). Örneğin *Frankia* ve *Anabaena* gruplarının *nifH* genlerini proteobakterilerden horizontal gen akışı ile aldıkları rapor edilmiştir. Benzer şekilde Haukka ve arkadaşları da horizontal gen akışının cins ya da daha düşük taksonomik düzeylerde önemli rol oynadığını belirtmektedir (Haukka vd 1998). *NifH* geni, 16S rRNA geni gibi yalnızca kromozomal DNA da bulunmaz, *Rhizobium* gibi bakterilerde sym plazmit DNA'sı üzerindedir ve kromozomal *nifH* genlerine kıyasla horizontal gen akışlarına maruz kalması çok daha kolaydır (Young 1992).

NifH geninin filogenetik kullanımlarında diğer bir sorun duplikasyonlardır. Bazı organizmalarda *nifH* geninin birden fazla bulunmasından dolayı *nifH* genlerinin gelişiminde duplikasyona maruz kaldığı görünmektedir. Alternatif gen gruplarının dizileri farklı gen ailelerini işaret etmektedir. Buna göre, farklı gen ailelerinin bakteri ve arke domainlerinin ortak atasından gen duplikasyonları sonucu oluşmuş olabileceği düşünülmektedir (Young 1992). Buna göre *Azotobacter* ve diğer organizmalarda da bulunan *vnfH* dizileri bir çok organizmada kaybolmuş olan genin duplike edilmiş versiyonunun bir kalıntısı olduğunu işaret etmektedir. *NifH* geni protein kodlayan bir gendir ve bazı koşullarda organizmanın yaşamı için avantaj sağlayabilmektedir. Bu

genin horizontal gen akışları geçirmiş olması şaşırtıcı olmayabilir. Bu genin filogenetik kullanımlara uygun olmasının nedeni 16S rRNA geni gibi az mutasyonlara maruz kalmasıdır ve istisnaları olmakla birlikte bir çok grup için özellikle proteobakterilerde bu genin filogenisinin 16S rRNA gen filogenisi ile uyumlu olmasıdır (Young 1992).

2.10. *Azotobacter* Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar

Azotobacter'in genel olarak Bergeys Manual'e göre biyokimyasal yöntemlerle tanımlandığı gözlenmektedir (Ravikumar vd 2004, Ahmad vd 2008). Suşlar azot bağlama özellikleri, oluşturdıkları PHB granülleri ya da salgıladıkları fitohormonlar gibi özellikleri ile karakterize edilmeye çalışıldığı görülmüştür.

Martinez-Toledo ve arkadaşları (1985) İspanya'da pirinç köklerinden azotsuz ortamda en hızlı çoğalan ve nitrojenaz aktivitesi yüksek olan *Azotobacter* izolatlarını elde etmeyi amaçlayan çalışmalarında, biyokimyasal olarak *A. chroococcum* suşlarını azot bağlama ve PHB özelliklerini belirlemişlerdir. Avusturalya'da sodyuma bağımlı *Azotobacter*'in tespiti için 27 toprak örneği incelenmiş ve bunlardan yalnızca 8'inde *Azotobacter* izole edilebilmiştir. Bu izolatlardan da iki suşun sodyuma gereksinim duyduğu anlaşılmıştır. Bu izolatların *A. salinestris*'e benzer olduğu ifade edilmiştir (Wang vd 1993). Brezilya topraklarından izole edilen *Azotobacter* izolatları farklı karbon, pigment üretimi ve melanin üretimi, sodyuma bağlı büyüme, siderofor üretimi, streptomisin antibiyotiğine direnç gibi özellikleri incelenerek karakterize edilmiştir. Bu izolatlardan dördü tanımlanarak birinin *A. armeniacus* ve diğer üçünün de *A. paspali* olduğu belirlenmiştir (De Mattos ve De Oliveira 1997).

Aquilanti ve arkadaşları (2004b) *Azotobacteraceae* familyasının ARDRA analizinde *RsaI*, *HhaI*, *HpaII*, *FnuDII* ve *AluI* restriksiyon enzimlerini kullanmıştır. Bu çalışmada, farklı bakteri grupları (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* gibi) ile *Azotobacter* referans bakteriler analiz edilmiş ve *Azotobacter* cinsi üyeleri için *RsaI* enzim profillerinin aynı olduğu tespit edilmiştir. Yalnızca *Azomonas* cinsine ait *Azm. macrocytogenes*'in, *RsaI* profilleri *Azotobacter* üyelerine

benzer bulunmuştur. Bu çalışmada özellikle *RsaI*, *HhaI* ve *HpaII* enzimlerinin *Azotobacter* türlerini ayırmada çok daha etkili olduğu görülmüştür.

Bhatia ve arkadaşları (2008) Hindistan'da pamuk ve buğday yetiştirilen tarlalardan izole edilen 20 *Azotobacter* spp. izolatının metabolik ve genetik parmak izi çalışmasında; izolatların BIOLOG profillerinde benzer karbon kullanım yetenekleri olduğunu göstermiştir. Üç enzimle (*HaeIII*, *MspI* ve *MnII*) yapılan ARDRA analizlerine göre ise tüm izolatlar iki ana gruba ayrılmış ve gruplardan biri kendi içinde dört gruba daha ayrılmıştır. Bu çalışmada BIOLOG, *Azotobacter* izolatlarının çeşitliliğinin belirlenmesinde yetersiz kalmıştır.

Betancourt ve arkadaşları (2008) farklı çevrelerden molibdenden bağımsız azot bağlayan bakterileri izole etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar arasında 18 *Azotobacter* türüne ait izolat 16S rRNA genine göre filogenetik olarak analiz edilmiştir. *A. beijerinckii* ve *A. vinelandii* türlerine ait oldukları belirlenen bu izolatların aynı zamanda *AnfG* ve *VnfG* genlerinde moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Azotobacter popülasyonlarına ait moleküler çalışmalarının, *Rhizobium* gibi azot bağlayan ya da bitki patojeni bakterilerine ait çalışmalara kıyasla çok sınırlı olduğu görülmektedir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada, Antalya bölgesinde yer alan farklı meralardan ve tarlalardan toprak örnekleri alındı (Çizelge 3.1). Her bir alandan her bir bitkiye ait rizosferden ve bitkisiz topraktan üç tekrarlı olarak örnekler alındı. Bitki rizosfer örnekleri kökleri ile birlikte, rizosfersiz örnekler ise 5-10 cm derinliğinden alındı. Örnekler toprağa saplanabilir ve kökle birlikte topraktan kesit alabilen bir alet (kürek) yardımı ile toplandı. Toprak örnekleri buz kutusu içinde aynı günde laboratuvara getirilerek + 4 °C’de bakteri izolasyonu işlemine kadar (en fazla bir gece) depo edildi.

Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin toplandığı alanlar, bitkiler ve tarihler

Yer	Bitki	Tarih
*Manavgat – Demirciler merası	<i>Hordeum</i> sp.	04.2006
*Akseki Çimi yaylası	<i>Hordeum bulbosum</i> , <i>Vicia villosa</i>	05.2006
*Elmalı – Eymir	<i>Hordeum</i> sp., <i>Medicago</i> sp.	05.2006
*İbradı – Eynif	<i>Hordeum</i> sp., <i>Medicago</i> sp.	06.2006
*Aşağıoba	<i>Hordeum</i> sp., <i>Medicago</i> sp.	04.2007
*Belek golf alanı	Çayır bitkileri	04.2007
*Belek	<i>Zea mays</i>	04.2007
*Korkuteli – Söğütçük	<i>Triticum sativum</i> , <i>Avena sativa</i>	05.2007
*Altınova	<i>Apium graveolens</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	05.2007
*Manavgat – Demirciler	<i>Hordeum</i> sp.	06.2007
*Akseki Çimi yaylası	<i>Hordeum bulbosum</i> , <i>Vicia villosa</i>	06.2007
*Elmalı – Eymir	<i>Hordeum</i> sp., <i>Medicago</i> sp.	06.2007
*İbradı – Eynif	<i>Hordeum</i> sp., <i>Medicago</i> sp., <i>Trifolium</i> sp.	06.2007
Bolu	<i>Zea mays</i>	08.2007

* Antalya ili sınırları içinde yer alanlar

3.2. Toprağın İzolasyon İçin Hazırlanması

Bitki ile birlikte laboratuvara getirilen rizosfer toprağı dikkatlice bitki köklerinden uzaklaştırıldı. Her toprak örneğı ayrı ayrı elekten (4 mm çaplı) geçirildi ve homojen dağılması için steril bir spatula ile karıştırıldı. Tüm işlemler steril şartlar altında yapıldı (Wollum 1982).

3.3. Çalışmada Kullanılan Referans Bakteriler

Topraktan *Azotobacter* izolasyon çalışmalarında, İtalya'dan Dr. Aquilanti tarafından gönderilen referans *A. vinelandii* suşu kullanıldı. İzolatların moleküler karakterizasyonu çalışmaları için (ARDRA), Almanya DSMZ'den referans bakteri temin edildi. Çalışmada, *Azotobacter* cinsine ait *A. vinelandii* DSM87, *A. chroococcum* DSM2286, *A. beijerinckii* DSM378, *A. salinestris* DSMZ11553, *A. armeniacus* DSM2284 ve *Azomonas* cinsine ait *Azm. macrocytogenes* DSM722 ve *Azm. agilis* DSM375 olmak üzere toplam 7 suş kullanıldı.

3.4. *Azotobacter* İzolasyonu ve *Azotobacter* İzolatlarının Seçilmesi

Azotobacter izolatlarının elde edilmesi için üç farklı izolasyon yöntemi kullanıldı.

Kullanılan ilk yöntemde (2006); 10 gr toprak örneğı 90 ml % 0,85 NaCl içeren 250 ml'lik erlenlere konularak 100 rpm'de 15 dak. oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi (Wollum 1982). Toprak süspansiyonu 10^{-2} - 10^{-5} sulandırma tüplerinden Brown *Azotobacter* zenginleştirme besi ortamına (mannitol; 5 gr, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.2 gr, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.04 gr, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0.005 gr, $CaCl_2$; 0.15 gr, noble agar; 12 gr ve K_2HPO_4 ; 0.8 gr (K_2HPO_4 ayrı olarak otoklav edilir), pH; 6.8-7) aktarıldı (Knowles 1982, Kennedy vd 2005). Mikroorganizmalar 29-30 °C'de 5-9 gün inkübe edildi. Özellikle 10^{-2} - 10^{-3} sulandırmadan gelen plaklardaki mukoid, sulu koloniler seçilerek TSA (Tryptic Soy Agar) besi ortamına aktarıldı ve saflaştırıldı.

Soil past olarak adlandırılan ikinci yöntemde (2006); toprak örneklerinin 30-50 gr'ı, % 1 mannitol ile steril bir plakta karıştırılarak macun kıvamına getirildi ve temiz bir plağa aktarılaraq üzeri düzleştirildi (Aquilanti 2004a). Plaklar 29-30 °C'de 5-9 gün inkübe edildi ve parlak, koloni benzeri bulunduran toprak partikülleri seçilerek, mannitol içeren Brown'un azotsuz katı besi ortamına aktarıldı. Bu besi ortamındaki mukoid ve sulu koloniler seçilerek TSA besi ortamına aktarıldı ve saflaştırıldı.

Birinci ve ikinci izolasyon besi ortamlarından gelen bakteri izolatlarının ilk aşamada Gram özellikleri belirlendi. KOH testi uygulanarak Gram negatif izolatlar seçildikten sonra, izolatlar *Azotobacter* için seçici LG (sükroz; 20 gr, MgSO₄.7H₂O; 0.2 gr, FeSO₄.7H₂O; 0.003 gr, Na₂MoO₄.2H₂O; 0.001 gr, CaSO₄.2H₂O; 0.05 gr, NaCl; 0.2 gr, K₂HPO₄; 0.64 gr, KH₂PO₄; 0.2 gr, agar; 15 gr, 2 ml bromthymol blue (% 0.5 etanol içinde) (Fe, Mo ve karbon kaynakları ayrı ayrı otoklav edildi) besi ortamında çoğaltıldı (Kennedy vd 2005). LG besi ortamında *Azotobacter* kolonileri sarı görünmesinden dolayı sarı koloniler seçildi (Aquilanti vd 2004a).

Üçüncü izolasyon yönteminde (2007); Burk'un sıvı besi ortamı (LG besi ortamına bromthymol blue eklenmemişi) kullanıldı (Kennedy vd 2005). Toprak örneğinin 2 gr'ı 250 ml'lik erlen içinde 18 ml Burk sıvı besi ortamına eklendi ve iki günlük inkübasyon aralarında kültür ortamının besi ortamı yenilenerek dört pasajdan sonra Burk'un katı besi ortamına aktarıldı. Bu ortamdan beyaz, mukoid ve sulu koloniler seçilerek Burk katı besi ortamında izolatlar saflaştırıldı. Burk ortamında gelişen izolatlar mikroskop kullanılarak *Azotobacter* hücresi görünümü veren koloniler seçildi. Koloniden alınan örnek basit boyama (Metilen boyası) yapıldıktan sonra 400 ve 1000'lik büyütme ile ışık mikroskopunda incelendi ve *Azotobacter* hücre morfolojisine benzer koloniye sahip izolatlar gliserol (% 40) stoklarında -80 °C de ve -20 °C de depo edildi.

3.4.1. KOH testi

% 3'lük KOH çözeltisinden bir yada iki damla lam üzerine damlatıldıktan sonra bakteri izolatlarının kolonilerinden alındı ve lam üzerinde damla halindeki çözelti içinde

öze yardımıyla karıştırıldı. Örneğin öze ile karıştırılması sırasında lam üzerinde vizkoz hal alması ve uzantılar meydana getirmesi örneğin Gram negatif olduğunu, çökelme oluşuyorsa Gram pozitif olduğunu göstermektedir (Ryu 1938).

3.5. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

Azotobacter olduğu varsayılan izolatların kesin tanısı ve aralarındaki farklılıklarının belirlenmesi amacı ile moleküler karakterizasyon yapılmıştır.

3.5.1. DNA izolasyonu

TSA ya da Burk katı besi ortamında geliştirilen izolatların iki farklı metot kullanılarak DNA'ları izole edildi.

Birinci yöntemde; İki ya da üç koloni, 500 µl steril çift distile steril su içinde süspansiyon edildikten sonra santrifüjle çöktürüldü ve 100 µl su içinde tekrar süspansiyon edildi ve 10 mM Tris-HCl'den (pH, 8.2) 100 µl eklendikten sonra karıştırıldı. Süspansiyona 1 mg/ml proteinaz K'dan 13 µl eklendikten sonra su banyosunda 55 °C'de 2 saat inkübe edildi (Aquilanti vd 2004a). Lizize uğrayan hücreler santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alınarak + 4 °C de depo edildi.

İkinci yöntemde; İki ya da üç koloni, 100 µl çift distile steril su içeren PZR tüpünde süspansiyon edildi ve termal döngü cihazında DNA izolasyon programına tabii tutuldu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Bakteri hücrelerinden DNA izolasyonunda kullanılan PZR döngü programı

94 °C	4 dak		4 döngü
94 °C	30 sn		
4 °C	30 sn		

3.5.2. 16S rRNA geninin çoğaltılması

Genin çoğaltılmasında bakterilerin 16S rRNA genini hedefleyen 27f (GAGATTTGATCCTGGCTCAG) ve 1495r (CTACGGCTACCTTGTTACGA) evrensel primerler (Weisburg vd 1991) kullanıldı. PZR ile 16S rRNA genin çoğaltılması 25 µl karışım (master mix) (5 µl 5X tampon, 0.25 µl 25 mM dNTP, 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 20 pmol 27f primer, 0.5 µl 20 pmol 1495r primer, 0.5 U GoTaq DNA polimeraz) içinde gerçekleştirildi. Her karışıma 2 µl örnek DNA eklendi. İzolatların bir çoğu için Çizelge 3.3'deki PZR döngüsü kullanılmasına karşın, bazı izolatların PZR'nunda tutunma sıcaklığı bir derece yükseltildi.

Çizelge 3.3. 16S rRNA genin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngü programı

Başlangıç inkübasyonu	95	5 dak.		
DNA denaturasyonu	95	30 sn	↑	
Tutunma	55	30 sn	↓	
Uzama	72	1.30 sn		35 döngü
Son inkübasyon	72	5 dak.		

3.5.3. ARDRA

Çoğaltılmış 16S rDNA'nın restriksiyon analizi için, *Rsa I* (Biolab) ve *Hha I* (Biolab), *HpaII* (Fermentas), *FnuDII* (Fermentas) restriksiyon enzimleri kullanıldı. Bu restriksiyon enzimlerinin seçimi hem literatürden (Aquilanti vd 2004b) hem de 16S rRNA gen dizilerinin elektronik ortamda workbench programı kullanılarak en uygun profili verenlerine göre seçildi. İzolatlara ait 16S rDNA PZR ürünü (8 µl), 10 U restriksiyon enzimi, BSA ve NaCl ile toplam hacim 10ml olarak (enzimin alındığı şirketin önerdiği şekilde) karıştırıldı. Karışımı içeren ependorf tüpler 37 °C'de etüvde 12 saat inkübe edildi.

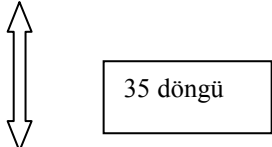
3.5.4. *NifH* genin PZR ile çoğaltılması

Genin çoğaltılmasında bakterilerin *nifH* genini hedefleyen primer çifti; *nifHg1-f* (GGTTGTGACCCGAAAGCTGA) ve *nifHg1-r* (GCGTACATGGCCATCATCTC)

kullanıldı (Bürgmann vd 2004). PZR ile *nifH* geninin çoğaltılması 25 µl karışım (master mix) (5 µl 5X tampon, 0.25 µl 25 mM dNTP, 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 20 pmol nifHg1-f primer, 0.5 µl 20 pmol nifHg1-r primer, 0.5 U GoTaq DNA polimeraz) içinde Çizelge 3.4'deki PZR döngü programı kullanılarak gerçekleştirildi. Her karışıma 2 µl örnek DNA eklendi.

Çizelge 3.4. *NifH* genin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngü programı

Başlangıç inkübasyonu	95	5 dak.		
DNA denaturasyonu	95	30 sn		
Tutunma	50	30 sn		
Uzama	72	30 sn		
Son inkübasyon	72	7 dak.		



3.5.5. DNA için agoroz jelin hazırlanması

PZR ürünleri için agoroz; çoğaltılmış DNA ürünleri, % 0.5'lik agoroz jelde 1x TBE (10x için, tris baz; 108.55 gr, borikası; 61.83 gr, EDTA; 0.5 M, pH; 8) tamponu içeren elektroforez sisteminde 90 voltta 30-60 dak. yürütüldü. ARDRA için 16S rRNA geninin restriksiyon enzimleri sonucu oluşan DNA parçaları % 2.5'luk agoroz jelde 1x TBE tamponu içinde 70 voltta 2-3 saat yürütüldü. PZR ürünlerinin ya da ARDRA'dan elde edilen DNA parçalarının büyüklüklerinin saptanmasında belirteç olarak DNA ladder kullanıldı. Jeller etidium bromid ile boyanarak jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.5.6. ARDRA sonuçlarının değerlendirilmesi

16S rRNA geninin kesim sonuçlarının agoroz jelde elde edilen bant profillerinin değerlendirilmesinde her bant bir karakter olarak kabul edildi. İzolatların 16S rRNA genlerinin restriksiyon enzimleri ile kesiminden elde edilen, belirli molekül ağırlığına sahip bantların varlığı yada yokluğu temeline dayanan 1 ya da 0 kodlaması yapılarak bir matris oluşturuldu. Tüm izolatlar için tüm enzimlerden elde edilen data matrisi Bioedit 5, PHYLIP 3.66 programları kullanılarak bakteri izolatları UPGMA (Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average) gruplandırma analizi ile gruplandırıldı

(Felsenstein 1990, Sneath ve Sokal 1973). Gruplar arasındaki genetik uzaklık Nei ve Li'e (1979) göre hesaplandı. İzolatların gruplandırılmasını göstermek için Treeview 1.66 programında (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) dendrogramları yapıldı.

3.5.7. Dizi analizleri

16S rRNA ve *nifH* genleri PZR aracılığı ile çoğaltıldıktan sonra toplam 23 µl olan PZR ürünleri MACROGEN-Kore firmasına gönderildi. 16S rRNA için yaklaşık 850 bp, *nifH* geni için yaklaşık 340 bp uzunluğunda okuma yapıldı. 16S rRNA geni için yapılan yaklaşık 850 bp uzunluğundaki hem ileri (5'-3') hem de ters (3'-5') okumalar Bioedit programında birleştirildi ve yaklaşık 1430 bp uzunluğunda tek diziye dönüştürüldü. İzolatlara ait 16S rRNA dizilerinin NCBI'in web sitesinde BLAST analizleri yapıldı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). 16S rRNA gen dizileri Bioedit 5 ve CLUSTAL X (1.83) programları kullanılarak dizilerin hizalanması (alignment) yapıldı. *Azotobacter* türlerine ait olan ve yakın akraba *Azomonas* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin 16S rRNA gen dizileri NCBI gen veri bankasından temin edildi. Referans bakterilerin ve izolatların 16S rRNA gen dizilerinin hizalanması sonucu eşit uzunlukta diziler elde etmek için dizilerin baş ve son bölümleri kesilerek eşitlenmesi sağlandı. 16S rRNA genin hizalanması sonucu yaklaşık 1316 bp uzunluğundaki dizi matrisi elde edildi. *NifH* geni için ise 265 bp uzunluğundaki diziler kullanıldı. Hem 16S rRNA hem de *nifH* geninden elde edilen dizi matrisleri MacClade v4.03 programında nexus formatına dönüştürülerek PAUP uygulaması yapıldı. Nexus formatındaki dizi matrisine MODEL TEST v3.06 uygulanarak hem Akaike Information Criterion (AIC) ve hem de Hierarchical Likelihood (hLRT) esasına uygun modeller saptandı (Akaike 1974, Posada ve Krandal 1998). DNA dizi matrisine farklı algoritmalar kullanılarak PAUP v.4.0b10 (Cracraft ve Helm-Bychowski 1991, Swofford 2002) programı ile filogenetik olarak analiz edildi. Maksimum Likelihood (ML) opsiyonu altında komşu bağlama (Neighbor-joining (NJ)) genetik uzaklık ve Uzaklık (Distance) opsiyonu ile 1000 tekrarlı seç-bağla (Bootstrap) filogenetik analizleri ayrı ayrı uygulandı (Felsenstein 1981, Saitou ve Nei 1987).

3.6. Toprak Analizi

Toprak örnekleri bakteri izolasyonu yapıldıktan sonra + 4 °C depo edildi. Toprak özelliklerinin analizi için özel toprak analiz laboratuvarından (Laben, Antalya) faydalanıldı. Bu laboratuvar da yapılan analizler ve kullanılmış olan teknikler Çizelge 3.5’de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Toprak analizleri ve kullanılan metotlar

Yapılan Analizler		Metotlar
pH	--	1 : 2,5
Kireç	(%)	Kalsimetrik
Tuz	(%)	1 : 2,5
Doygunluk	(%)	Saturasyon
Nem	(%)	Kuru Yakma
Organik Madde	(%)	Kuru Yakma
Organik C	(%)	Walkey-Black
Toplam N	(%)	Kjeldahl
Alınabilir P	(kg P ₂ O ₅ /da)	Olsen-ICP
Alınabilir K	(kg K ₂ O/da)	A.Asetat-ICP
Alınabilir Ca	(kg CaO/da)	A.Asetat-ICP
Alınabilir Mg	(kgMgO/da)	A.Asetat-ICP
Alınabilir Fe	(ppm)	DTPA-ICP
Alınabilir Mn	(ppm)	DTPA-ICP
Alınabilir Zn	(ppm)	DTPA-ICP
Alınabilir Cu	(ppm)	DTPA-ICP

Bakteri izole edilen ve edilemeyen toprakların kimyasal özellikleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak analiz edildi. Organik madde, organik karbon, toplam azot, potasyum, kalsiyum ve bakır miktarları arasındaki farklılık t Testi ile analiz edilmiştir. C/N, fosfor, magnezyum, demir, tuz, kireç, nem ve pH miktarları arasındaki farklılık Mann-Whithney Testi (U testi) ile analiz edildi. Bu analizler Windows’da SPSS 13.0 (SPSS Inc.) paket programı kullanılarak yapıldı.

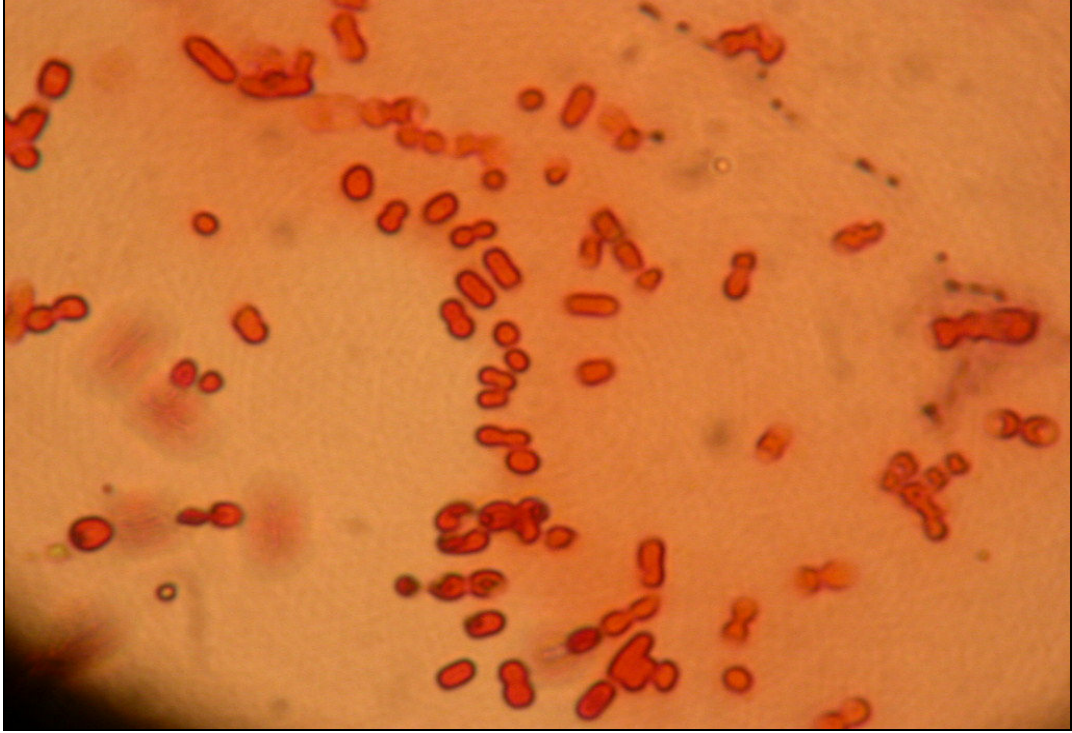
4. BULGULAR

Antalya bölgesine ait farklı çayır-mera (Elmalı-Eymir, Manavgat-Demirciler, İbradı-Eynif, Merkez-Aşağıoba, Akseki-Çimi yaylası) ve tarlalardan (Korkuteli, Belek, Altınova) 2006-2007 bahar aylarında (Nisan, Mayıs, Haziran) farklı bitki rizosferi ve bitkisiz toprak örneklerinden *Azotobacter* izolasyonu çalışması yapılmıştır.

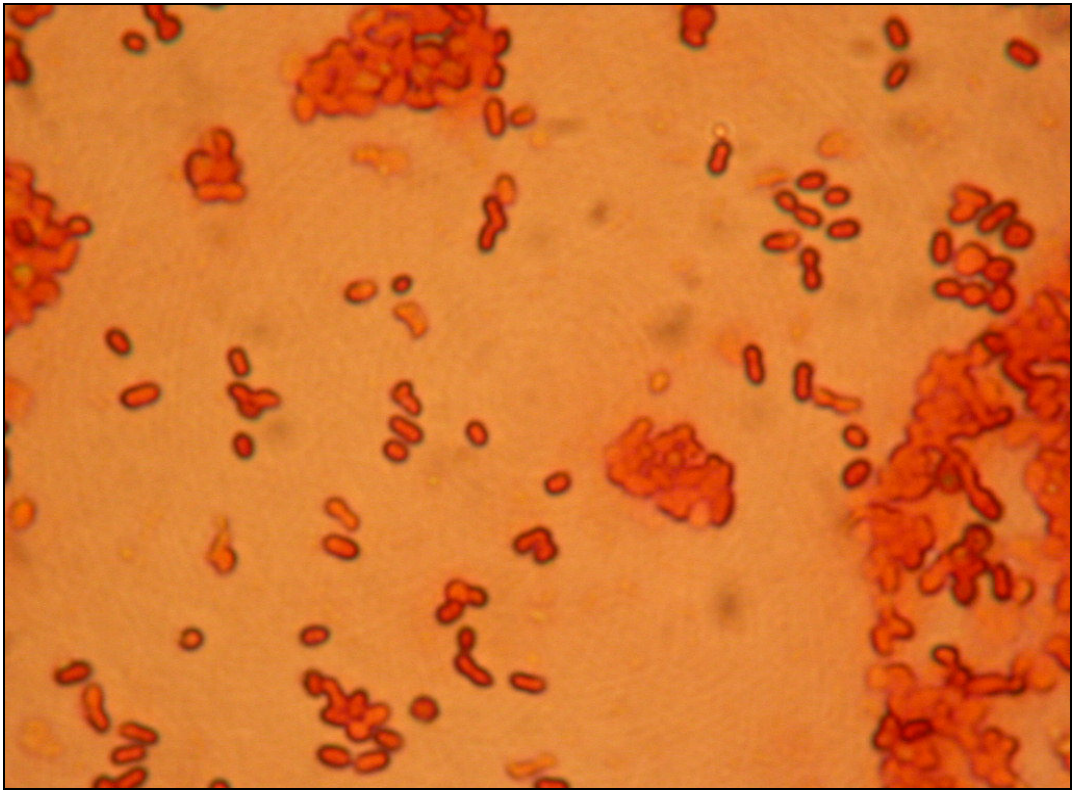
4.1. *Azotobacter* İzolasyonu

Farklı yıllarda (2006 ve 2007) gerçekleştirilen *Azotobacter* izolasyonlarında farklı izolasyon metotları uygulanmıştır. İzolasyon çalışmalarının birinci yılında Brown'nun azotsuz katı besi ortamı ve soil-past kullanılmıştır. Bu ortamlarda beyaz, sulu, koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Gram testi yapılarak Gram negatif izolatlar LG besi ortamına aktarıldıktan sonra kolonilerin sarı pigment oluşturma özelliklerine göre taranmış ve sarı pigment verenler belirlenmiştir. Yaklaşık 800 bakteri izolatu saflaştırılmış ve bu izolatlar arasından 120 izolat ARDRA analizi için seçilmiştir. ARDRA uygulanan izolatların seçilmesinde Brown besi ortamındaki büyüme özellikleri (mukoid ve sulu) ve LG seçici besi ortamındaki pigment (sarı renk kolonilerin görülmesi) özellikleri dikkate alınmıştır.

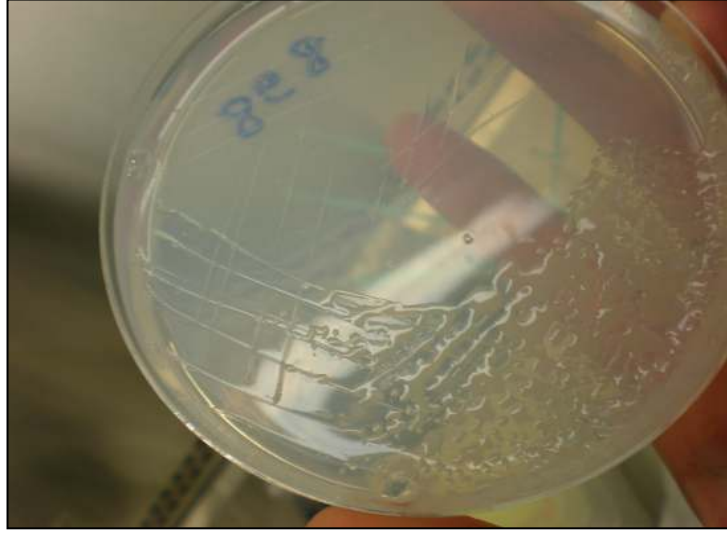
Çalışmada ilk yıl (2006) izole edilen 120 izolatu *Azotobacter* olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle ikinci yıl (2007) *Azotobacter* izolasyon metodu değiştirilmiş ve aynı zamanda örnek alınan toprak sayısı da artırılmıştır. İkinci yıl *Azotobacter* izolasyon çalışmalarında Burk'un azotsuz sıvı besi ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda çoğalan bakteriler Burk'un azotsuz katı besi ortamına ekilmiş ve beyaz, sulu, mukoid koloniler saflaştırıldıktan sonra Gram testi yapılmış ve Gram negatif izolatlar basit boyama yapılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. *Azotobacter* hücre morfolojisine benzeyen izolatlar belirlenmiştir. Işık mikroskopunda 1000'lik büyütme gücünde, hücreler tek ya da çift ya da zincir halinde ve genel olarak oval şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). *Azotobacter*'lerin Burk katı besi ortamındaki görüntüsü Şekil 4.3, Şekil 4.4. ve Şekil 4.5'de sunulmuştur. Bu *Azotobacter* izolasyon çalışmasından 80 izolatu *Azotobacter* olabileceği belirlenmiş ve ARDRA analizi için seçilmiştir.



Şekil 4.1. *A. beijerinckii* DSM378 hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü (Büyütme gücü 1000)



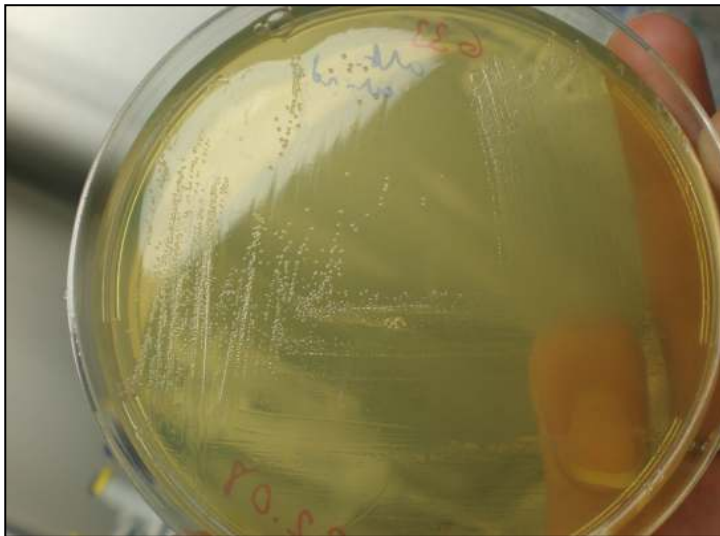
Şekil 4.2. BZ1 izolatı hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü (Büyütme gücü 1000)



Şekil 4.3. BOZ2 izolatının Burk azotsuz mannitollü katı besi ortamındaki görüntüsü



Şekil 4.4. BZ5 izolatının Burk azotsuz mannitollü katı besi ortamındaki görüntüsü

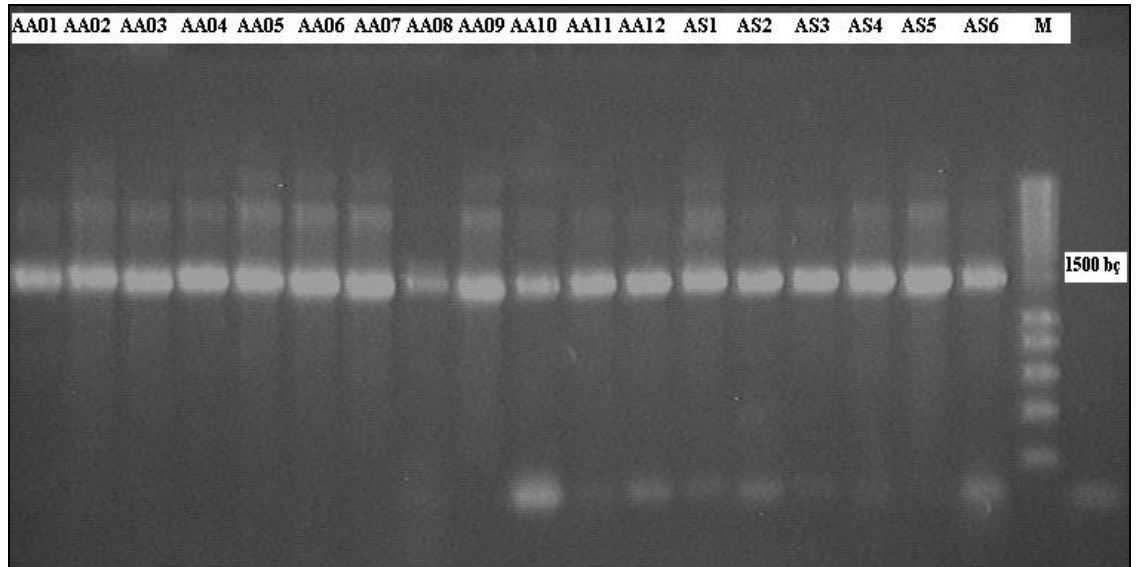


Şekil 4.5. AA11 izolatının TSA katı besi ortamındaki görüntüsü

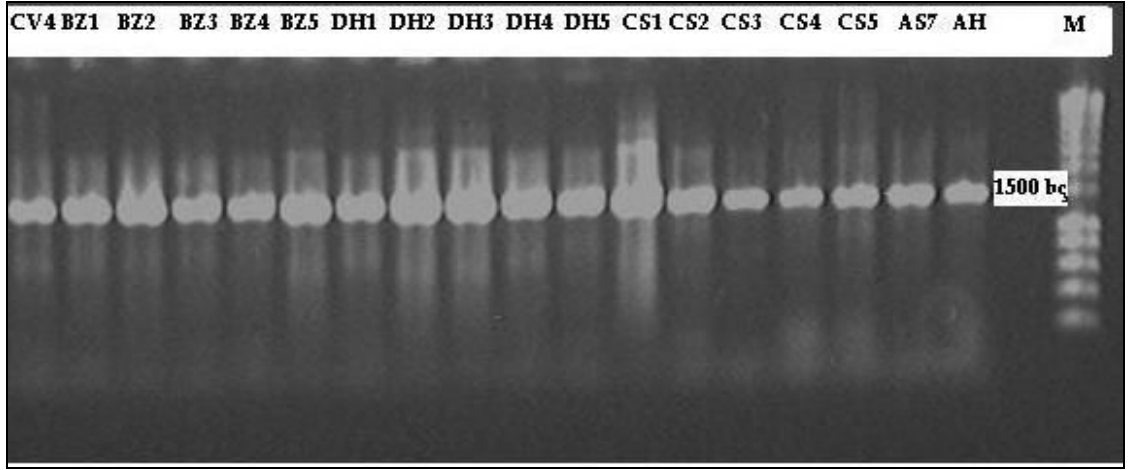
4.2. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

4.2.1. ARDRA

Azotobacter tanısı ve karakterizasyonunda, 16S rRNA genin çoğaltılarak bu bölgenin restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden sonra elde edilen DNA profillerinden faydalanılmıştır. İzolatların yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki 16S rRNA genleri, 27f ve 1495r evrensel primerlerle çoğaltılmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). 16S rRNA geninin ARDRA analizinde *RsaI*, *HhaI*, *HpaII* ve *FnuDII* olmak üzere dört enzim kullanılmıştır.



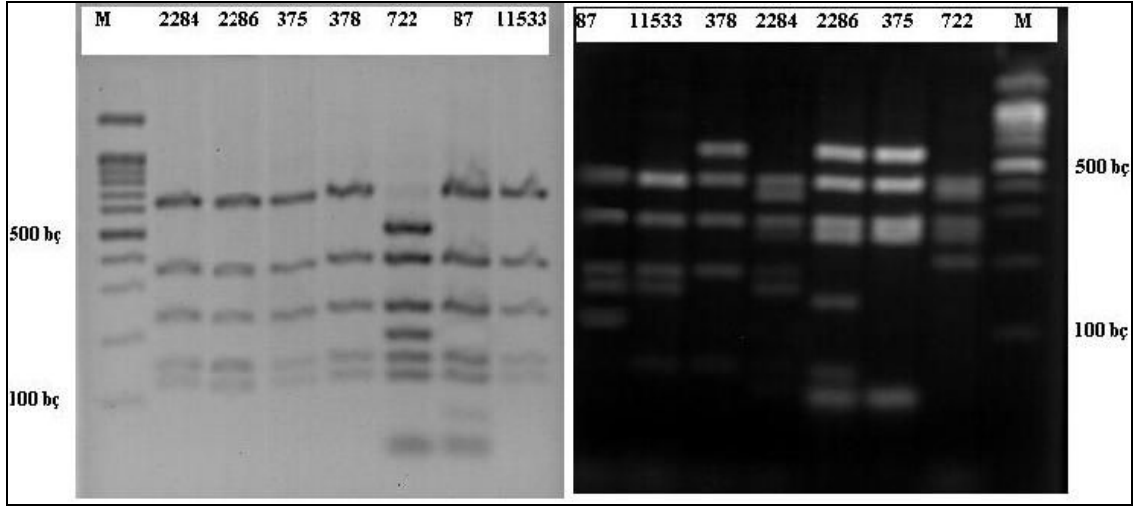
Şekil 4.6. İzolatların 16S rRNA genlerinin 1500 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin Agoroz jel görüntüsü. AA01, AA02, AA03, AA04, AA05, AA06, AA07, AA08, AA09, AA10, AA11, AA12, AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6 ve M (belirteç)



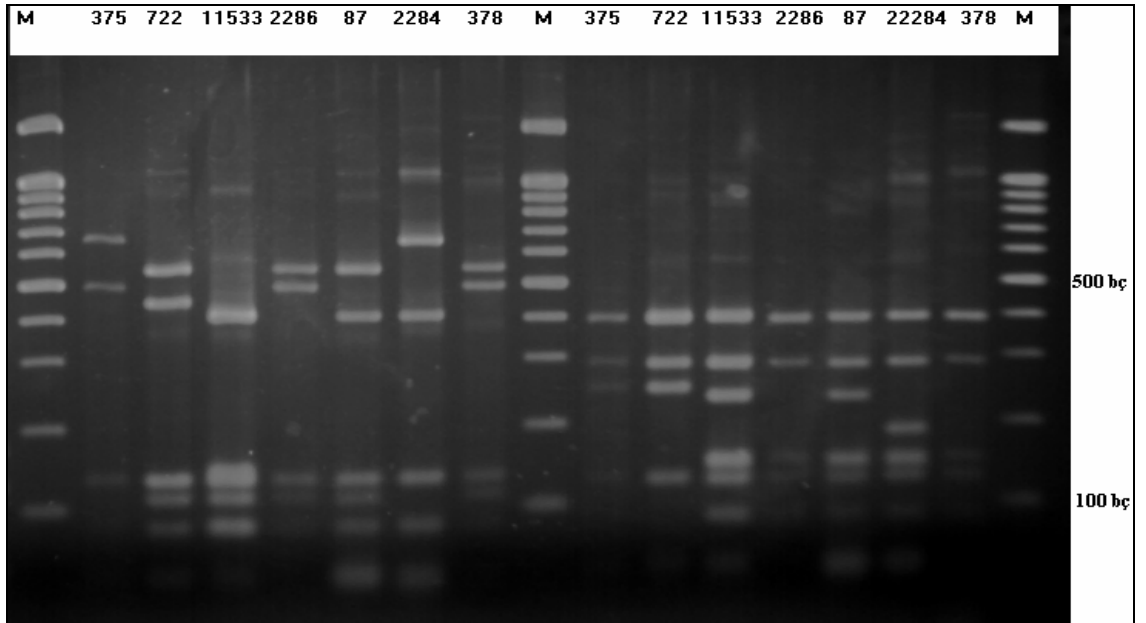
Şekil 4.7. İzolatların 16S rRNA genlerinin 1500 bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin Agoroz jel görüntüsü. CV4, BZ1, BZ2, BZ3, BZ4, BZ5, DH1, DH2, DH3, DH4, DH5, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS7 AH ve M (belirteç)

2006 yılında izole edilen izolatların 120'sine ARDRA analizi yapılmıştır. Bu izolatların hiç birinde 16S rRNA geninin *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bantlar *Azotobacter* profiline karşılık gelmediği için bu izolatların *Azotobacter* olmadığına karar verilmiştir.

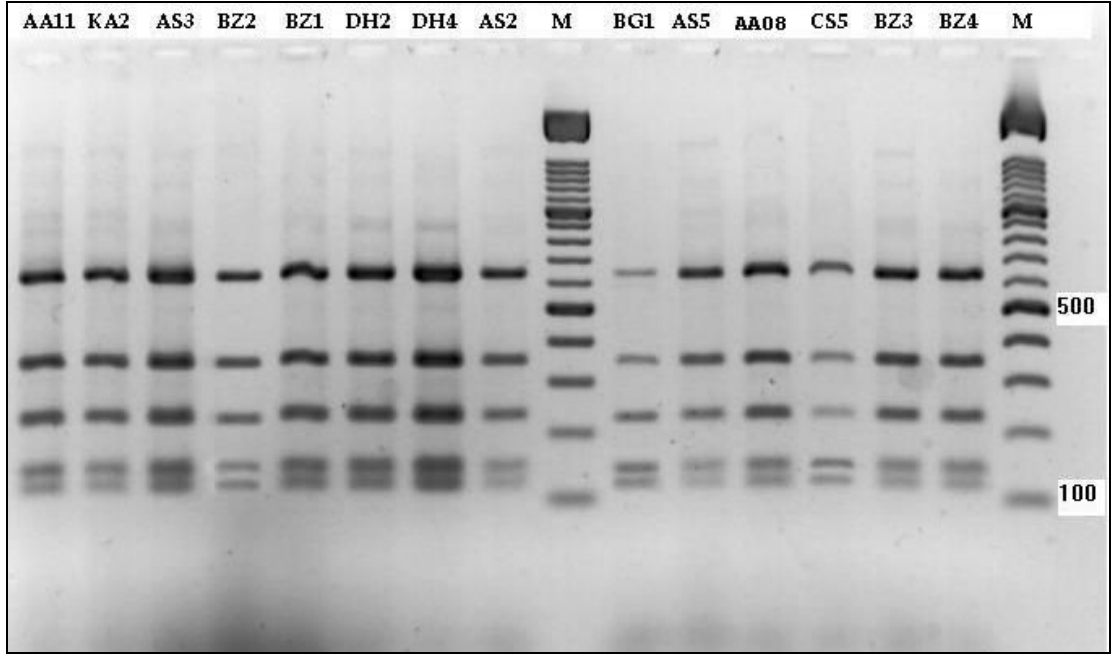
2007 yılında izole edilen 80 izolata ARDRA analizi yapılmıştır. Aynı şekilde, *Azotobacter* ve *Azomonas* referans bakteri suşlarına da ARDRA uygulanmıştır (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). *Azotobacter* referans bakteri suşlarının (*A. vinelandii* DSM87, *A. chroococcum* DSM2286, *A. armeniacus* DSM2284, *A. beijerinckii* DSM378, *A. salinestris* DSM11553) *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu agoroz jel üzerinde 650, 350, 240, 150 ve 120 bp büyüklüğünde bantlar vermiştir (Şekil 4.8). ARDRA uygulanan 80 izolattan, 45 izolatın 16S rRNA geninin *RsaI* profilleri *Azotobacter* cinsi üyelerinin *RsaI* restriksiyon enzimi profiline benzer sonuç vermiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Bu 45 izolatın 16S rRNA genleri ayrı ayrı *HhaI*, *HpaII* ve *FnuDII* restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra oluşan profiller, izolatların birbirinden ayrılması için kullanılmıştır. *Azotobacter* referans suşlarının (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) ve izolatların çoğaltılmış 16S rRNA genlerinin *FnuDII* (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13), *HpaII* (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15), *HhaI* (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17) restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen % 2.5'luk agoroz jel görüntüleri şekillerde sunulmuştur.



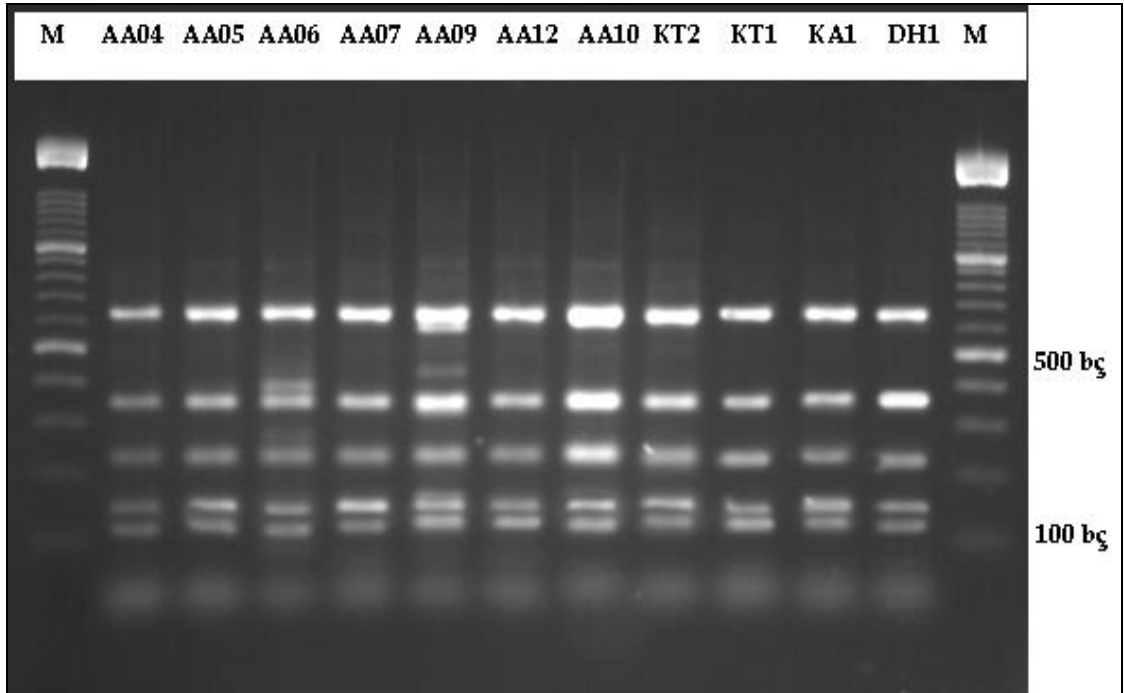
Şekil 4.8. *Azotobacter* ve *Azomonas* referans suşlarının 16S rRNA genlerinin *RsaI* (soldaki) ve *HhaI* (sağdaki) enzimlerinin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. 2284: *A. armeniacus* DSM; 2286: *A. chroococcum* DSM; 375: *Azm. agilis* DSM; 378: *A. beijerinckii* DSM; 87: *A. vinelandii* DSM; 11533: *A. salinestris* DSM; 722: *Azm. macrocytogenes* DSM, M: belirteç (100 -1500 bç)



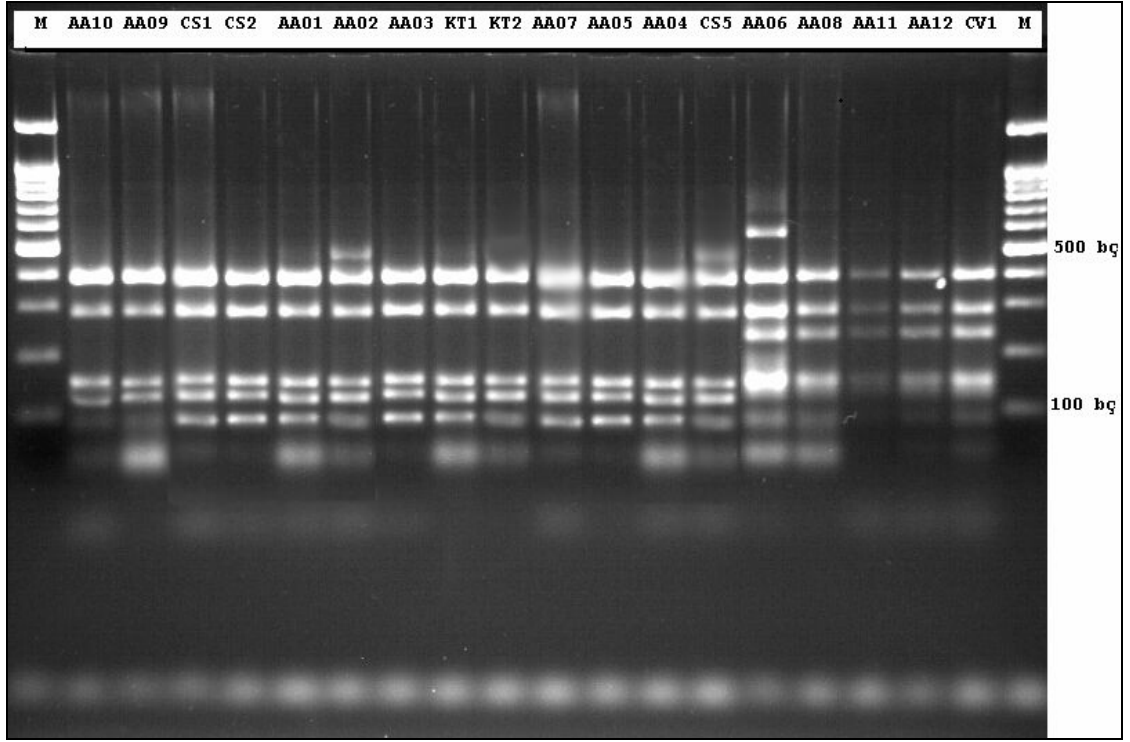
Şekil 4.9. *Azotobacter* ve *Azomonas* referans suşlarının 16S rRNA genlerinin *HpaII* (soldaki) ve *FnuDII* (sağdaki) enzimlerinin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. 2284: *A. armeniacus* DSM; 2286: *A. chroococcum* DSM; 375: *Azm. agilis* DSM; 378: *A. beijerinckii* DSM; 87: *A. vinelandii* DSM; 11533: *A. salinestris* DSM; 722: *Azm. macrocytogenes* DSM, M: belirteç (100 -1500 bç)



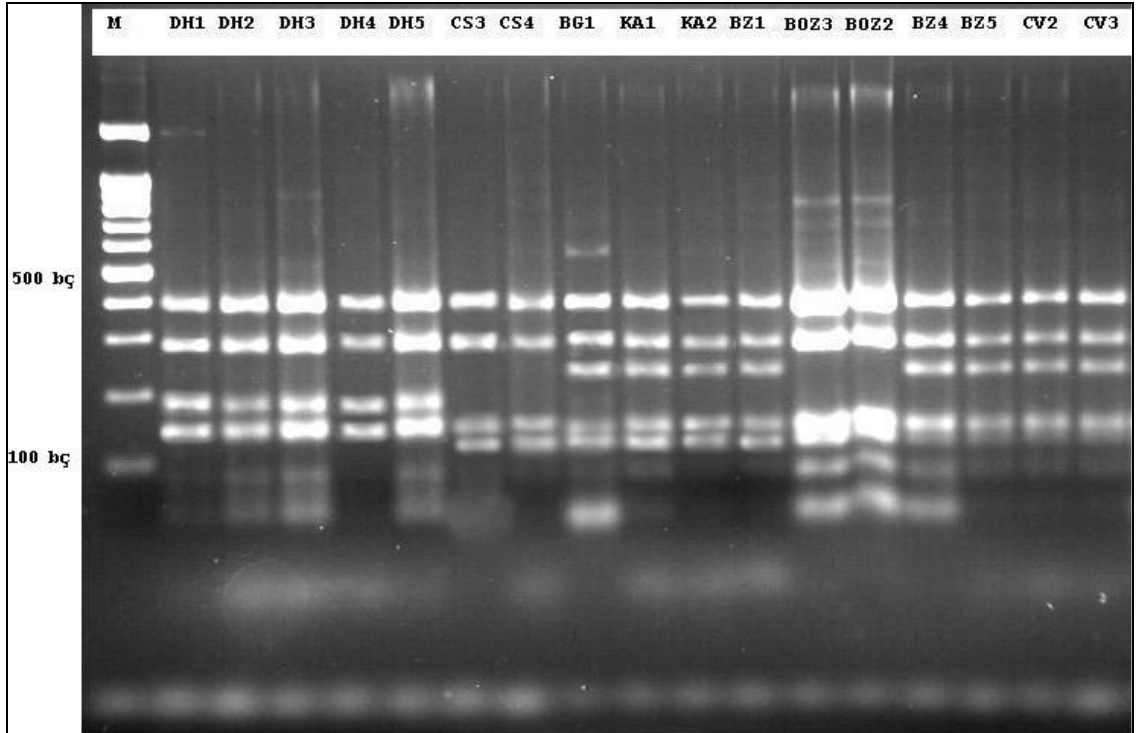
Şekil 4.10. İzolatların 16S rRNA genlerinin *RsaI* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. AA11, KA2, AS3, BZ2, BZ1, DH2, DH4, AS2, M, BG1, AS5, AA08, CS5, BZ3, BZ4 ve M: belirteç (100 -1500 bç)



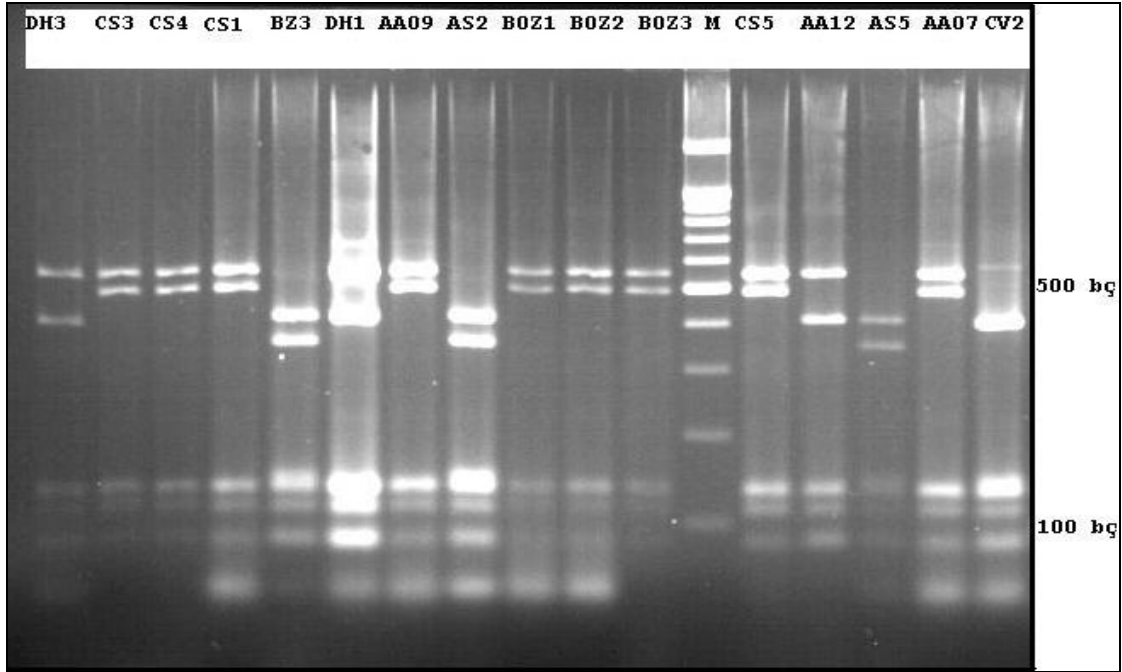
Şekil 4.11. İzolatların 16S rRNA genlerinin *RsaI* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, AA04, AA05, AA06, AA07, AA09, AA12, AA10, KT2, KT1, KA1, DH1 ve M: belirteç (100 -1500 bç)



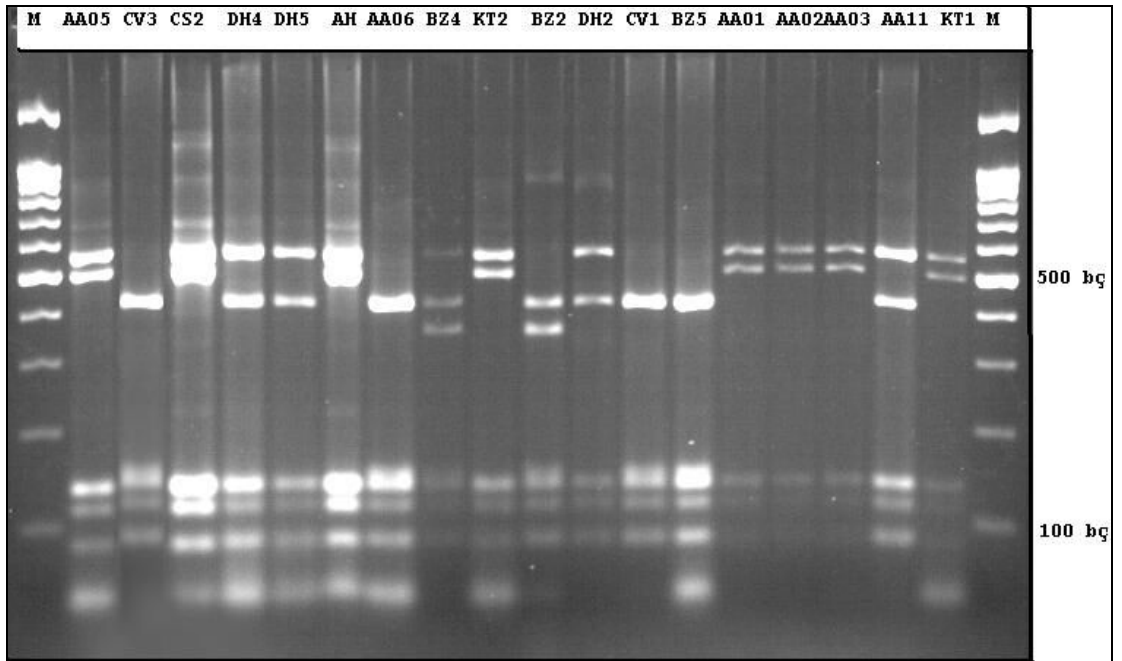
Şekil 4.12. İzolatların 16S rRNA genlerinin *FnuDII* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, AA10, AA09, CS1, CS2, AA01, AA02, AA03, KT1, KT2, AA07, AA05, AA04, CS5, AA06, AA08, AA11, AA12, CV1 ve M: belirteç (100 -1500 bç)



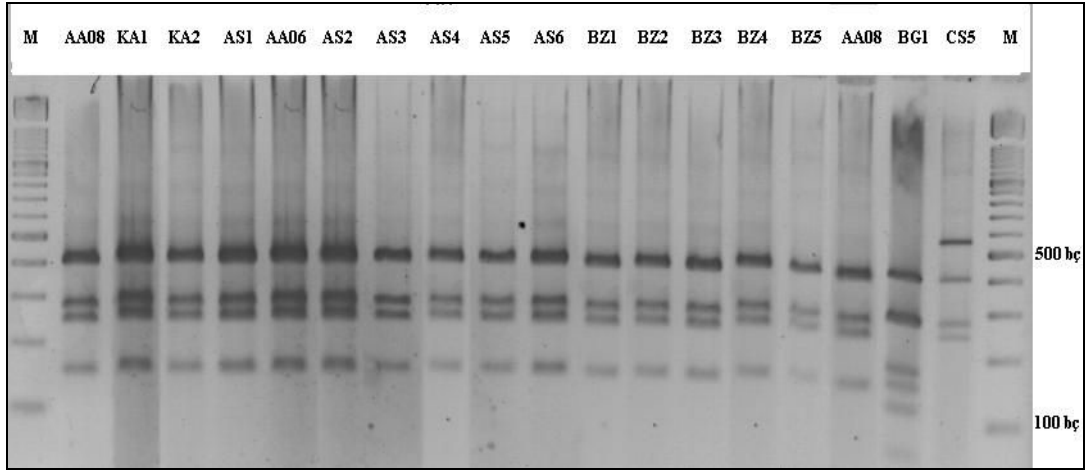
Şekil 4.13. İzolatların 16S rRNA genlerinin *FnuDII* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, DH1, DH2, DH3, DH4, DH5, CS3, CS4, BG1, KA1, KA2, BZ1, BOZ3, BOZ2, BZ4, BZ5, CV2 ve CV3. M: belirteç (100 -1500 bç)



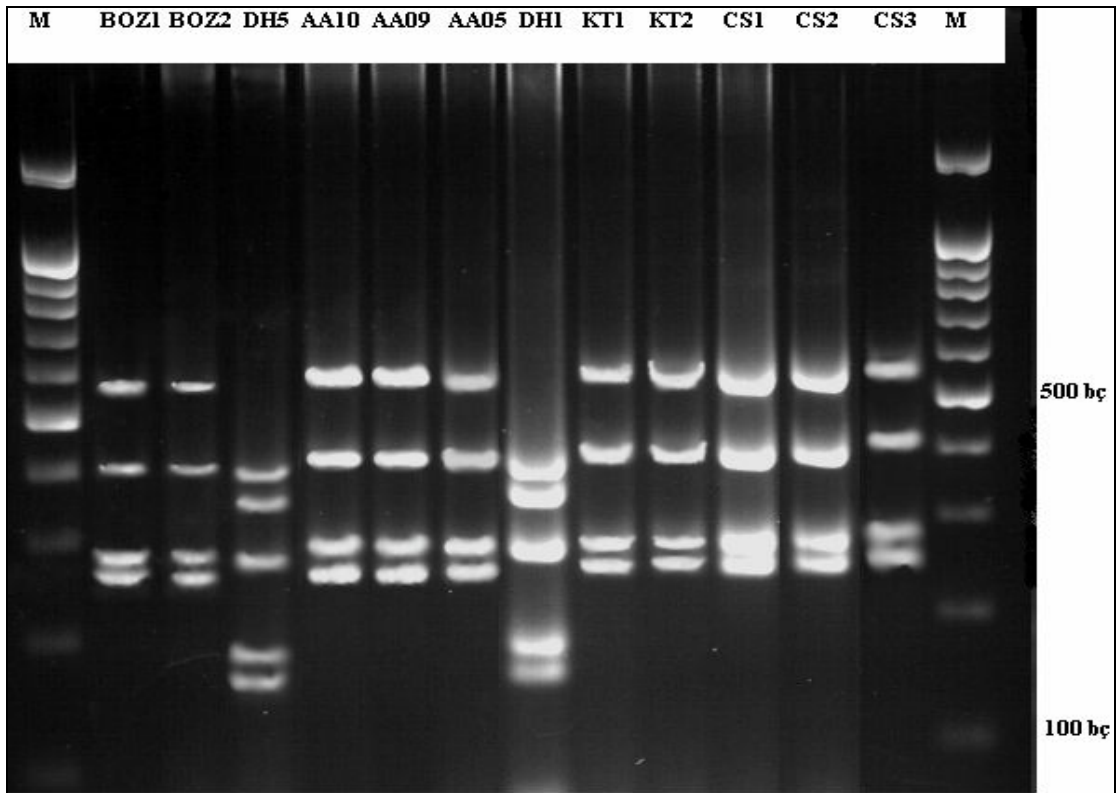
Şekil 4.14. İzolatların 16S rRNA genlerinin *HpaII* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. DH3, CS3, CS4, CS1, BZ3, DH1, AA09, AS2, BOZ1, BOZ2, BOZ3, M, CS5, AA12, AS5, AA07 ve CV2. M: belirteç (100 -1500 bç)



Şekil 4.15. İzolatların 16S rRNA genlerinin *HpaII* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, AA05, CV3, CV2, DH4, DH5, AH, AA06, BZ4, KT2, BZ2, DH2, CV1, BZ5, AA01, AA02, AA03, AA11, KT1, M: belirteç (100 - 1500 bç)



Şekil 4.16. İzolatların 16S rRNA genlerinin *HhaI* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, AA08, KA1, KA2, AS1, AA06, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, BZ1, BZ2, BZ3, BZ4, BZ5, AA08, BG1, CS5, M: belirteç (100 -1500 bç)



Şekil 4.17. İzolatların 16S rRNA genlerinin *HhaI* enziminin kesiminden elde edilen agoroz jel görüntüsü. M, BOZ1, BOZ2, DH5, AA10, AA09, AA05, DH1, KT1, KT2, CS1, CS2, CS3, M: belirteç (100 -1500 bç)

ARDRA verilerine göre izolatların haplotipleri belirlenmiştir. Haplotipler, ARDRA yapılan izolatların ve referans bakterilerin 16S rRNA genlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu elde edilen ve agaroz jel üzerinde gözlemlenen farklı büyüklükteki DNA bantları esas alınarak oluşturulmuştur (Çizelge 4.1). ARDRA sonucunda, 45 izolatın ve referans *Azotobacter*'lerin *RsaI* profilleri aynı haplotipi (a) vermiştir. Yalnızca *Azm. macrocytogenes* DSM722 suşu *RsaI* enzimiyle farklı bir haplotip (a1) vermiştir. İzolatlar *HpaII* ve *HhaI* enzimleri ile beş haplotip oluştururken *FnuDII* enzimi yalnızca üç haplotip vermiştir. İzolatların ve referans bakterilerin göstermiş oldukları haplotip çeşitleri Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

İzolatları gruplandırabilmek, benzerlik ve farklılıklarının belirlenmesi için, ARDRA analizi sonucu agaroz jellerde görülen her bir bantın varlığı (1) ya da yokluğuna (0) dayalı olarak oluşturulan matris PHYLIP programında restriksiyon analizlerini değerlendiren Nei ve Li benzerlik indeksi ile UPGMA kullanılarak dendrograma dönüştürülmüştür (Şekil 4.18). Dendrogramda DSMZ'den temin edilen 5 *Azotobacter* (*A. vinelandii* DSM87, *A. chroococcum* DSM2286, *A. beijerinckii* DSM378, *A. armeniacus* DSM2284 ve *A. salinestris* DSM11553) ve *Azomonas* (*Azm. agilis* DSM375 ve *Azm. macrocytogenes* DSM722) referans suşu kullanılmış ve 45 izolat gruplandırılmıştır (Şekil 4.18).

Azotobacter izolatları, ARDRA'dan elde edilen UPGMA dendrogramında iki ana gruba ayrılmıştır (Şekil 4.18). Bunlardan birincisi kendi içinde dört alt gruba (I, II, III ve IV) daha ayrılmıştır. V. alt grup ise diğer (ikinci) ana grup içinde yer almıştır. I. ve II. alt gruplar *A. salinestris* ile gruplanırken, III. alt grup ise hem diğer izolatlardan hem de referans suşlardan ayrılmıştır. III. alt grupta yer alan AA06, BZ3 ve AA06 izolatları III grupta yer alan diğer izolatlardan da ayrılmıştır. IV. alt grupta, *A. armeniacus* ve 5 izolat birlikte gruplanmıştır. V. alt gruba ise *A. chroococcum* ve *A. beijerinckii* referans suşlarıyla birlikte 19 izolat yerleşmiştir ve bu 19 izolat *A. chroococcum* ile gruplanmıştır. *Azm. macrocytogenes* en dış grup olarak ayrılırken, *Azm. agilis* ise *A. beijerinckii* ve *A. chroococcum*'un olduğu gruptan ayrı bir dala ayrılmıştır (Şekil 4.18).

Sonuç olarak, ARDRA'dan elde edilen UPGMA dendrogramına göre, I. ve II. gruplara ait izolatların *A. salinestris*'e yakın olduğu, III. gruba ait izolatların ise bir referans bakteri ile birlikte gruplanmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.1. İzolatlara ve referans bakterilere ait 16S rRNA genlerinin dört farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz jel üzerindeki bç uzunluğundaki bant büyüklükleri ve bu büyüklüklere karşılık gelen haplotipler

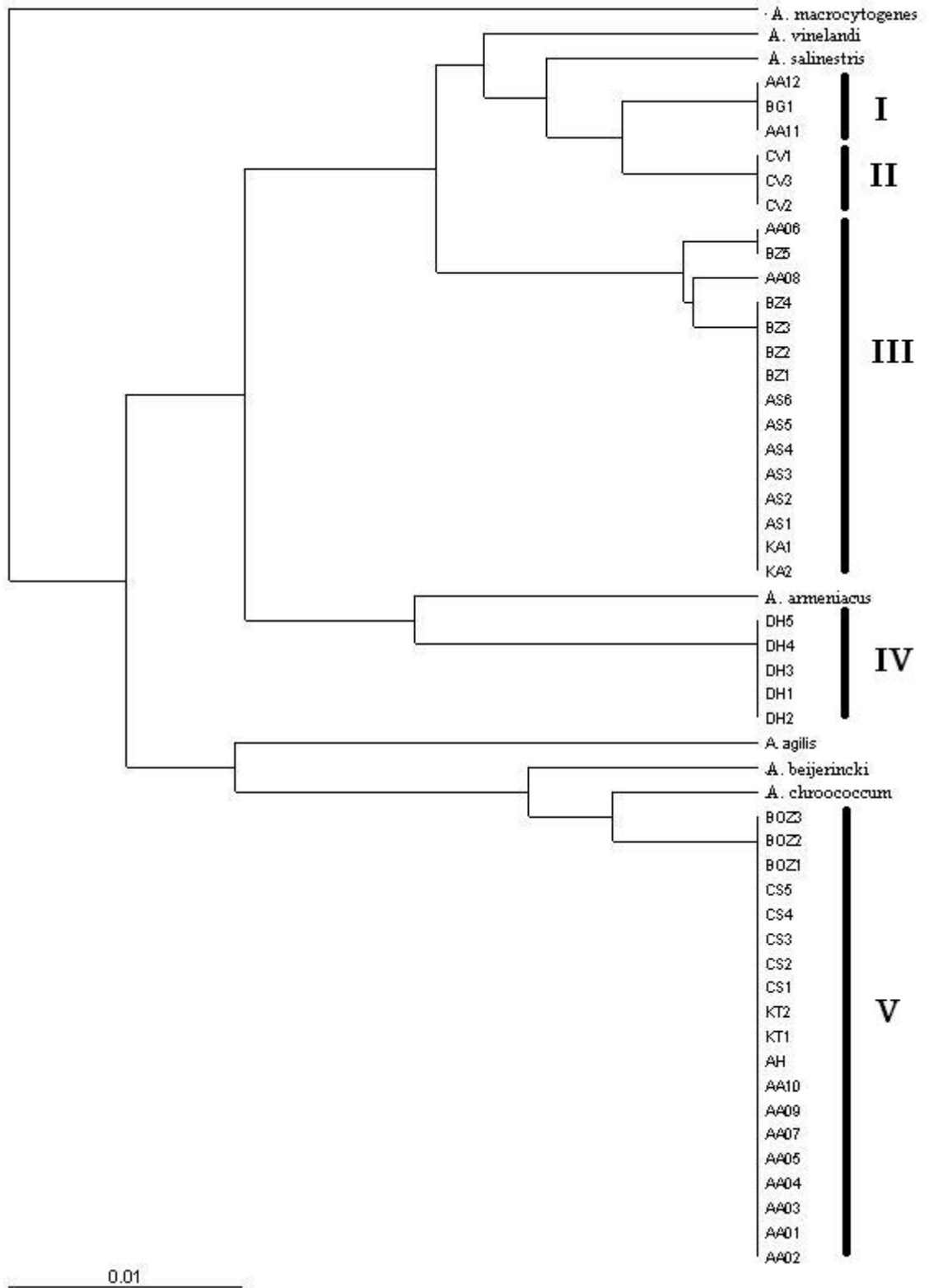
Enzimler	Haplotip	bç
<i>RsaI</i>	a	650; 350; 240; 150; 120
	a1	500; 350; 240; 180; 150;120
	b	410; 380; 280; 180; 160
	b1	410; 380; 280; 260; 180;160
	b2	410; 380; 280; 260; 200
	c	580; 410; 280; 260
<i>HhaI</i>	c1	580; 410; 280; 260; 160
	c2	580; 410; 280; 180
	d	410; 280; 260; 160
	e	410; 280; 180; 160; 120
	f	410; 280; 180; 160
<i>FnuDII</i>	g	400; 280; 150; 140; 80
	g1	400; 280; 150; 140
	h	400; 280; 250; 150; 140; 80
	h1	400; 280; 250; 140
	h2	400; 280; 240; 150;140;80
	h3	400; 280; 240; 150;140
<i>HpaII</i>	j	400; 280; 180; 150; 80
	ji	400; 280; 180; 150; 140
	i	550; 500; 140; 120; 80
	i1	650; 500; 140; 120
	i2	650; 420; 140; 120; 80
	l	420; 380; 140; 120; 80
<i>HpaII</i>	k	550; 420; 140; 120; 80
	k1	550; 440; 140; 120; 80
	m	420; 140; 120; 80
	n	550; 420; 380; 140; 120; 80

Renkli bölgeler referans bakterilere ait haplotiplerdir

Çizelge 4.2. İzolatların ve referans suşların restriksiyon enzimlerine karşılık gelen haplotipleri

İzolat / referans türler	<i>RsaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>FnuDII</i>	<i>HpaII</i>
AA11, AA12, BG1	a	e	h	k
CV1, CV2, CV3	a	f	h	m
AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, BZ1, BZ2, BZ3, BZ4, KA1, KA2	a	d	h	l
BZ5	a	d	h	m
AA06	a	d	h	m
AA08	a	d	h	n
DH1, DH2, DH3, DH4, DH5	a	b	j	k
AA01, AA02, AA03, AA04, AA05, AA07, AA09, AA10, AH, BOZ1, BOZ2, BOZ3, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, KT1, KT2	a	c	g	i
* <i>A. vinelandii</i> DSM87	a	e	h3	k
* <i>A. salinestris</i> DSM11533	a	f	h2	m
* <i>A. armeniacus</i> DSM2284	a	b1	j1	i2
* <i>A. chroococcum</i> DSM2286	a	c1	g1	i
* <i>A. beijerinckii</i> DSM378	a	c2	g1	i
* <i>Azm. agilis</i> DSM375	a	c	h1	i1
* <i>Azm. macrocytogenes</i> DSM722	a1	b2	h1	k1

* Referans suşlar



Şekil 4.18. ARDRA verilerinden elde edilen UPGMA dendrogramı. Dendrogram, *Azotobacter* ve *Azomonas* referans suşları (*A. vinelandii* DSM87, *A. chroococcum* DSM2286, *A. armeniacus* DSM2284, *A. salinestrus* DSM11533, *Azm. agilis* DSM375 ve *Azm. macrocytogenes* DSM722) ve 45 *Azotobacter* izolatının dört farklı enzim kullanılan ARDRA verilerinden elde edilmiştir. İzolatların benzerlik tahminleri Nei ve Li'e göre hesaplanmıştır (Nei ve Li 1979)

4.2.2. 16S rRNA geni dizi analizi

ARDRA analizi sonucu *Azotobacter* profili veren izolatların *Azotobacter* olduklarını teyit etmek için 16S rRNA genlerinin dizi analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rRNA genlerinin yaklaşık 1500 bç uzunluğunda DNA kısmı 27f ve 1495r evrensel primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldıktan sonra DNA baz dizileri belirlenmiştir. 16S rRNA geninin çift taraflı (5'-3' ve 3'-5' yönlerinde) yapılan baz okumaları sonucu her bir yönden yaklaşık 850 baz dizilik kısmı belirlenmiştir. Her iki (5'-3' ve 3'-5') okuma yönünden elde edilen diziler Bioedit programında düzenlenerek 16S rRNA geninin 1430 baz uzunluğundaki dizileri elde edilmiştir. İzolatlara ait 16S rRNA genlerinin, NCBI'nın web sayfasında BLAST analizleri yapılmıştır. BLAST analizlerinden elde edilen benzerlik yüzdeleri ve karşılık gelen bakteriler çizelgede sunulmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. BLAST analizi sonucu izolatlara karşılık gelen bakteriler ve benzerlik oranları

İzolat	benzerlik	Erişim no	isim
(I. grup) AA11	% 99	*AY336565.1, EF620447.1, EF620452.1, AB175657, EF620451, EF620449.1	<i>A. vinelandii</i>
	% 97	EF620439, EF620434, EF100155.1	<i>A. vinelandii</i>
	% 97	*AB175656.1	<i>A. salinestris</i>
(II ve III. grup) AS3, BZ3, CV1, CV3, KA2	% 99	EF620439, EF620434, EF620436	<i>A. vinelandii</i>
	% 99	*AB175656.1	<i>A. salinestris</i>
	% 98	*AB175655.1	<i>A. armeniacus</i>
	% 97	*AB175651.1	<i>A. nigricans</i>
(IV. grup) DH3 ve DH5	%100	*AB175651.1	<i>A. nigricans</i>
(V. grup) AA04, AA09, AA10, AH, CS1, CS2, CS3 ve BOZ3	% 99	EU930421.1, AB430880.1, *AB175653.1, *EF100153.1	<i>A. chroococcum</i>
	% 99	EF620440.1, AB429527.1, EF620428.1, EF620427.1	<i>A. beijerinckii</i>

* Tip suşlar

Bu çalışmadan elde edilen 45 izolat ARDRA uygulamasıyla beş gruba ayrılmıştır. Grupları temsil eden toplam 18 izolatın 16S rRNA geninin dizi analizi yapılmıştır. Bunlardan iki izolatın (AA08 ve BG1) dizi analizi sonuçlarının kullanışsız olmasından dolayı bu izolatların 16S rRNA gen dizileri dizi hizalama uygulamasına dahil edilmemiştir. İzolatların 16S rRNA gen dizileri ve NCBI gen veri bankasından elde edilen *Azotobacter* türlerine ve yakın akraba cins (*Azomonas* ve *Pseudomonas*) üyelerinin (*Azm. macrocytogenes* ve *Azm. agilis*, *P. aeruginosa*) 16S rRNA gen dizileri CLUSTAL X (1.83) programıyla homolojik ve varyasyonel bölgelerine göre hizalandırılmıştır (alignment). Onaltı izolata ait ve gen dizi bankasından elde edilmiş 17 bakteriye ait 16S rRNA gen dizilerine en uygun substitüsyon modelini belirlemek amacıyla MODELTEST v.3.6 programı kullanılmıştır. Buna göre en uygun model hem Akaike Information Criterion (AIC) opsiyonu hem de hLRT opsiyonuna göre TrN + I + G (Tamura-Nei) olarak seçilmiştir. Bu testin sonuçlarına göre $-\ln L = 3208.9802$, (I) = 0.7437, (G) = 0.3617 olarak belirlenmiştir. Önerilen model ve parametrelere bağlı olarak PAUP v4.0b10 programı kullanılarak farklı algoritmalarla filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik ağaç için kullanılan baz dizi matrisindeki değişken baz dizisi bölgeleri çizelgede sunulmuştur (Çizelge 4.4). Analizde kullanılan 1316 bazın, 1186'sı korunumlu, 36'sı değişken ve 94'ünün parsimonik olarak bilgi verici olduğu saptanmıştır. Uzaklık opsiyonuyla AIC'nin önerdiği TrN + I + G modeline göre uygulanan NJ algoritmasıyla seç-bağla değerli (Şekil 4.19) ve ML opsiyonuyla uzaklığa bağlı (Şekil 4.20) iki ağaç elde edilmiştir. Her iki ağaç üzerinde *P. aeruginosa* dış grup olarak seçilmiştir. Bu ağaçlara göre *Azm. macrocytogenes* ve *Azm. agilis*, *Azotobacter* cinsinden uzaklaşmıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Bu ağaçlar üzerinde *Azotobacter* türleri iki ana gruba bölünmüştür. *A. salinestris*, *A. tropicalis*, *A. vinelandii*, *A. nigricans* subps. *nigricans* ve *A. armeniacus* gruplardan birincisi (I, II, III ve IV); *A. chroococcum* ve *A. beijerinckii* ise ikinci ana grubu (V) oluşturmuştur (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). *A. tropicalis*, *A. vinelandii*'nin bulunduğu gruptan ayrı bir dalla uzaklaşmıştır. *A. salinestris*, *A. vinelandii*, *A. armeniacus*, ve *A. nigricans* subsp. *nigricans* bulunduğu politomik grup 64 seç bağla değeri ile desteklenmiştir (Şekil 4.19). Bununla birlikte bu çalışmadan izole edilen ve bu gruba ait *Azotobacter* izolatları ise yüksek seç bağla değerleri ile farklı gruplara

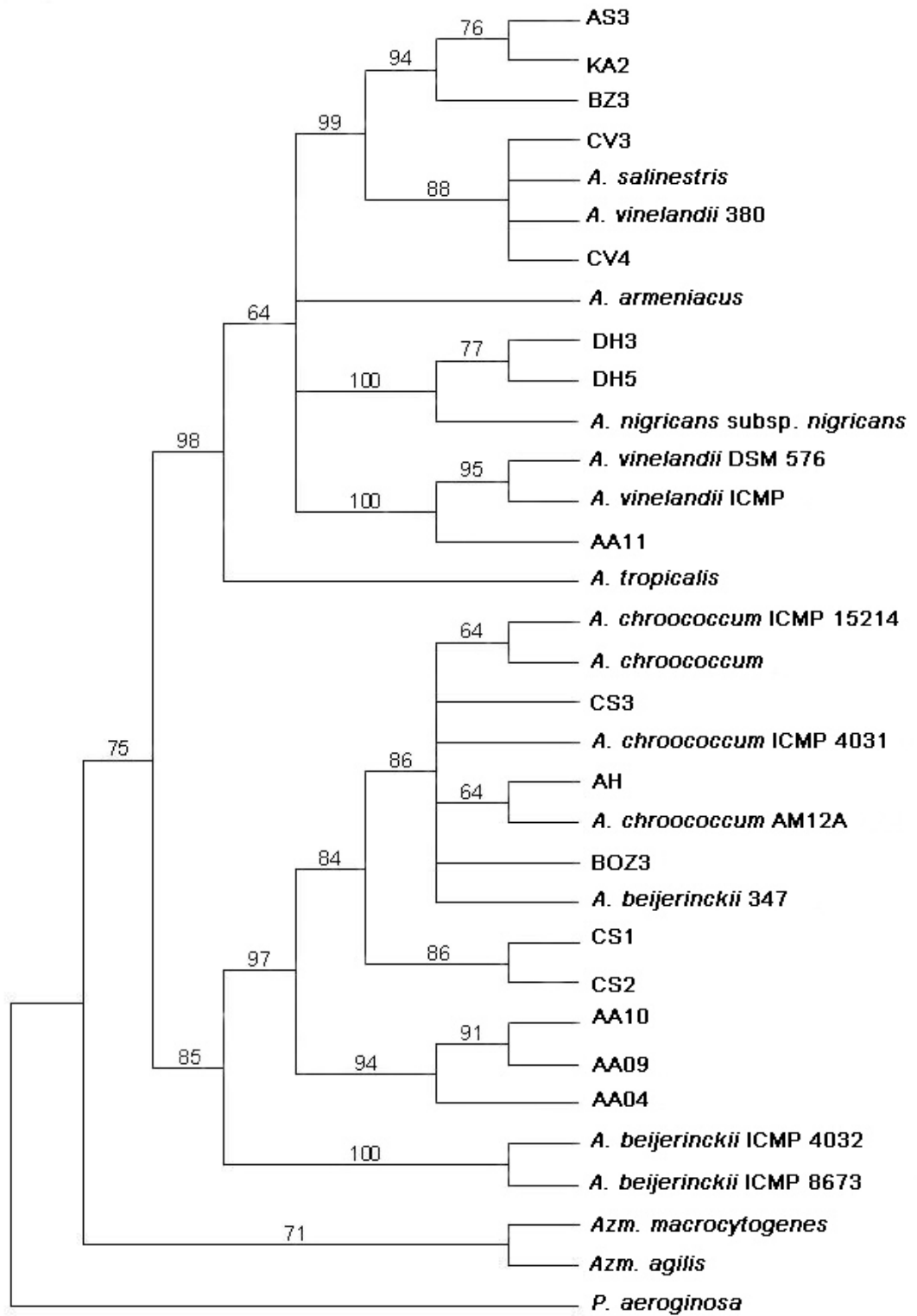
ayrılmıştır. BG1, AA11 ve AA12 izolatları, ARDRA'dan elde edilen dendrogramda I. grup içinde yer almaktadır (Şekil 4.18) ve bu grubu temsil eden AA11 izolatı 16S rRNA gen dizisi NJ ağacı üzerinde *A. vinelandii* DSM576 suşuyla aynı grupta yer almakta olup, 100 seç-bağla değeriyle desteklenmiştir (Şekil 4.19).

AS3, BZ3, KA2, CV1 ve CV3 izolatları (grup II ve III), *A. salinestris* ve *A. vinelandii* 380 suşuyla ayrı bir monofiletik grup oluşturmuş ve bu grup 99 seç bağla değeriyle desteklenmiştir (Şekil 4.19). *A. salinestris* ve *A. vinelandii* 380, CV3 ve CV4 (grup II) suşunun yer aldığı monofiletik grup 88 ve AS3, KA2 ve BZ3 (grup III) 94 seç bağla değerleri ile iki ayrı gruba daha ayrılmıştır. Bu monofiletik gruplardaki izolatlar ARDRA'dan elde edilen UPGMA dendrogramında da benzer şekilde gruplanmışlardır. DH3 ve DH5 (IV) izolatları diğer türlerden ayrılarak *A. nigricans* subsp. *nigricans* ile grup olmuştur ve bu grup 100 seç bağla değeriyle desteklenmiştir. *A. beijerinckii*, *A. chroococcum*'dan farklı gruplanarak bu çalışmadaki izolatlardan ayrılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen AA04, AA09, AA10, AH, CS1, CS2, CS3, BOZ3 izolatları (V), *A. chroococcum* suşları ve *A. beijerinckii* 347 grubuna dahil olmuştur (Şekil 4.19 ve Şekil 20).

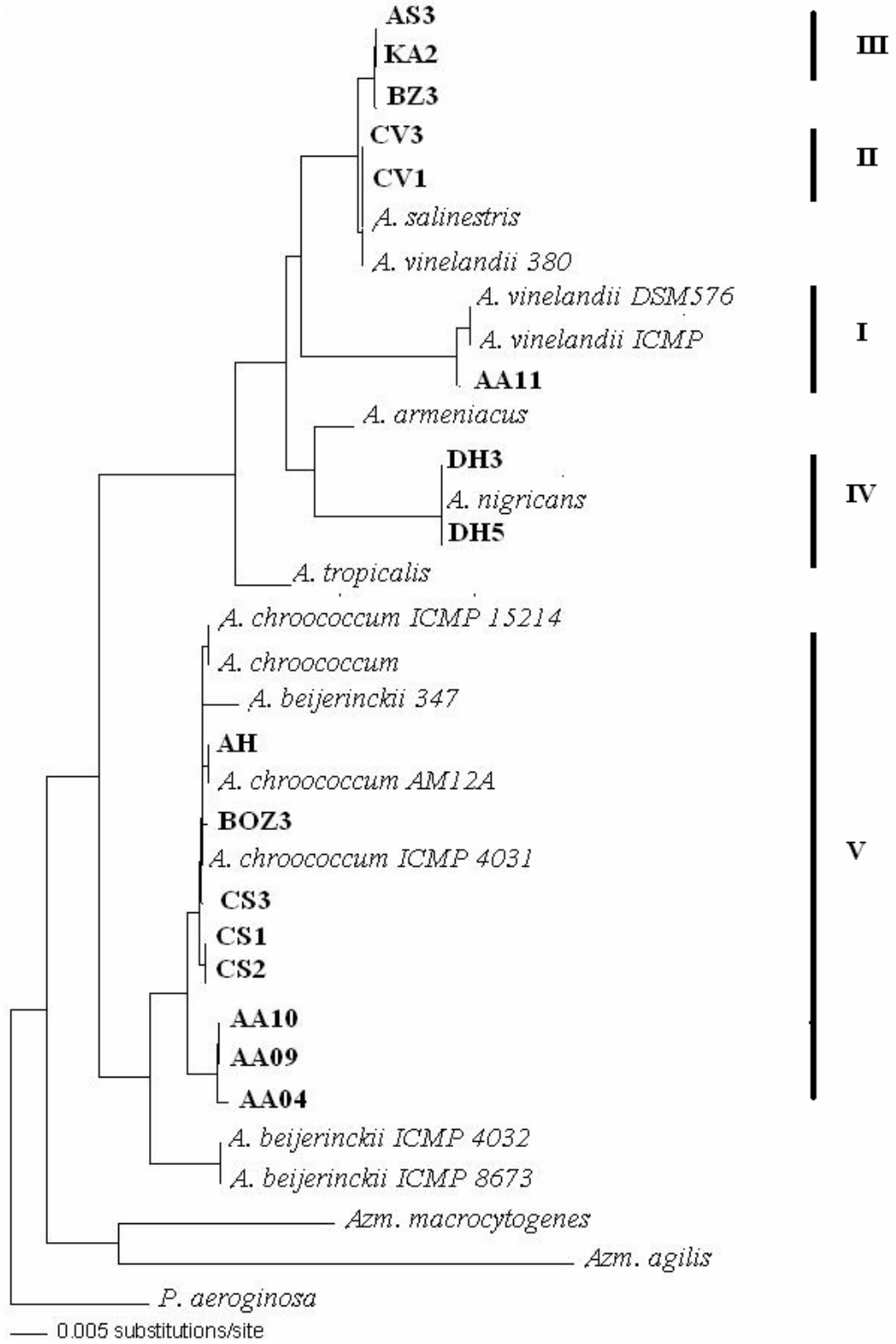
Sonuç olarak I. gruba ait izolatlar *A. vinelandii* ile, II . ve III. gruplara ait izolatlar ise *A. salinestris* ve *A. vinelandii* 380 suşları ile yakın ilişkilidir. IV. grupta yer alan izolatlar *A. nigricans* subsp. *nigricans* ve V. gruptaki izolatlar ise *A. chroococcum* ile yakın ilişkilidir.

Çizelge 4.4. Referans bakterilerin ve izolatların 16S rRNA gen dizilerinin değişken bölgeleri

[illegible]



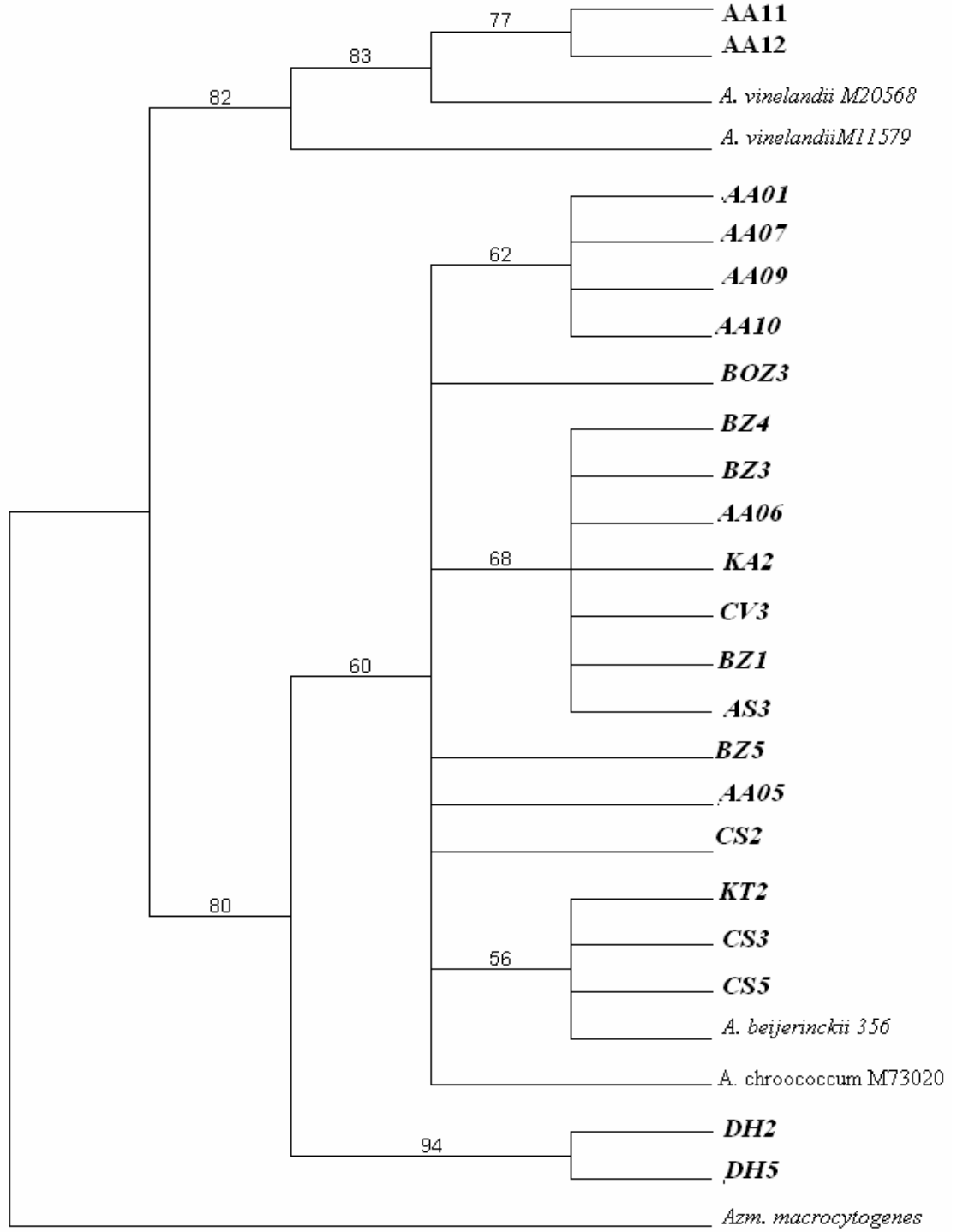
Şekil 4.19. 16 izolat ve *Azotobacter*, *Azomonas* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin 16S rRNA geni filogenetik (1000 tekrarlı seç bağla) ağacı. Ağaç, NJ algoritması kullanılarak oluşturulmuştur



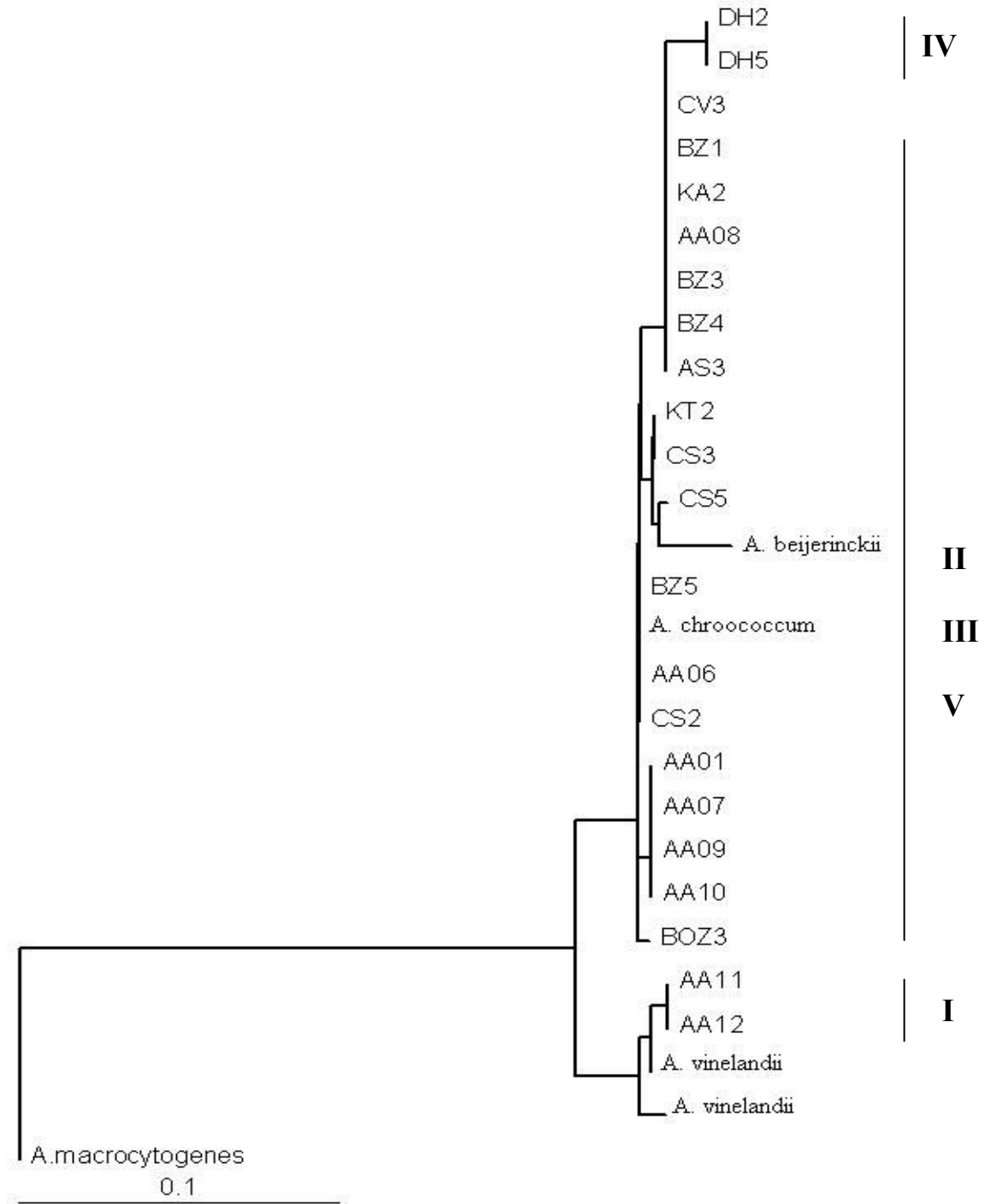
Şekil 4.20. 16 izolat ve *Azotobacter*, *Azomonas* ve *Pseudomonas* cinslerine ait türlerin 16S rRNA geni filogenetik (uzaklık) ağacı. Ağaç, NJ algoritması kullanılarak oluşturulmuştur

4.2.3. *NifH* gen dizi analizi

NifH gen dizi analizi 16S rRNA verilerini desteklemek ve izolatlar arasındaki ilişkiyi görebilmek için yapılmıştır. İzolatların *nifH* genleri *Azotobacter* grubunun *nifH* genlerini hedef alan primerlerle PZR ile çoğaltılmış ve yaklaşık 500 bp büyüklüğünde agaroz jel üzerinde bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.21). ARDRA sonucu elde edilen gruplara ait toplam 22 izolatın *nifH* geninin dizi analizi yapılmıştır. Bu gene ait PZR ürünleri Kore-Macrogen firmasına gönderilmiş ve 340 bp uzunluğunda dizi okuması yapılmıştır. Çift taraflı okunan diziler Bioedit programında karşılaştırılarak tek diziye dönüştürülmüştür. İzolatlara ait *nifH* gen dizileri NCBI'nın web sayfasında BLAST yapılmış ve dizilere yakın bulunan diziler seçilmiştir. Gen veri bankasından elde edilen ve 22 izolata ait *nifH* genin 265 bp uzunluğundaki dizileri CLUSTAL X (1.83) programlarında karşılaştırılmıştır. Yirmi iki izolata ait ve beş gen bankasından elde edilmiş *nifH* gen dizilerine en uygun substitüsyon modelini belirlemek amacıyla MODELTEST v.3.6 programı kullanılmıştır. Buna göre en uygun model AIC'e göre TrN + I olarak belirlenmiştir (I = 0.7381). Önerilen model ve parametrelere bağlı olarak PAUP v4.0b10 programı kullanılarak farklı algoritmalarla filogenetik analizler yapılmıştır. Analize dahil edilen toplam 265 bazın 228 bazlık kısmı korunmuş, 22 bazı değişken ve 15 bazı parsimonik olarak bilgi verici olduğu belirlenmiştir. Bu gene ait değişken baz dizi bölgeleri Çizelge 4.5'de sunulmuştur. ML opsiyonuyla AIC'nin önerdiği TrN + I modeline göre uygulanan uzaklık NJ ağacı ve Uzaklık opsiyonuyla 1000 tekrarlı seç bağla NJ ağacına göre izolatlar iki gruba ayrılmıştır (Şekil 4.22 ve 4.23). *Azm. macrocytogenes* dış grup olarak seçilmiştir. Ana gruplardan birinde yalnızca iki izolat (AA11 ve AA12) ve *A. vinelandii* bir monofiletik grup oluştururken diğer grupta tüm izolatlar bir arada gruplanmıştır. Bir arada gruplanmış ve 80 seç bağla değeri ile desteklenmiş gruba dahil DH2 ve DH5 izolatları diğer izolatlardan 94 seç bağla desteği ile ayrı bir grup oluşturmuştur (Şekil 4.22). Sonuç olarak *nifH* geni, izolatların arasındaki farklılığı *A. nigricans* subsp. *nigricans* ve *A. vinelandii* izolatları haricinde çözüm getirememiştir.



Şekil 4.22. 22 izolat ve *Azotobacter* ve *Azomonas* cinslerine ait türlerine *nifH* geni filogenetik (1000 tekrarlı seç bağla) ağacı. Ağaç, NJ algoritması kullanılarak oluşturulmuştur



Şekil 4.23. 22 izolat ve *Azotobacter* ve *Azomonas* cinsi türlerine ait *nifH* geni filogenetik (uzaklık) ağacı. Ağaç, NJ algoritması kullanılarak oluşturulmuştur

Çizelge 4.6. *Azotobacter* izolatlarının moleküler analizlere göre yakın ilişkili olduğu *Azotobacter* türleri ve izolatların izole edildiği alan ve bitkiler

	izolat adı	Alan	Bitki ya da toprak
<i>A. vinelandii</i> (I. grup)	AA11	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA12	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	BG1	Belek	<i>Golf çim sahası</i>
<i>A. salinestris</i> (II. grup)	CV1	Akseki Çimi Y	<i>Vicea villosa</i>
	CV2	Akseki Çimi Y	<i>Vicea villosa</i>
	CV3	Akseki Çimi Y	<i>Vicea villosa</i>
<i>A. salinestris</i> (III. grup)	AA06	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA08	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	KA1	Korkuteli T	<i>Avena sativa</i>
	KA2	Korkuteli T	<i>Avena sativa</i>
	AS1	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	AS2	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	AS3	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	AS4	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	AS5	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	AS6	Altınova T	<i>Solanum tuberosum</i>
	BZ1	Belek-Kadriye T	<i>Zea mays</i>
	BZ2	Belek-Kadriye T	<i>Zea mays</i>
	BZ3	Belek-Kadriye T	<i>Zea mays</i>
	BZ4	Belek-Kadriye T	<i>Zea mays</i>
	BZ5	Belek-Kadriye T	<i>Zea mays</i>
<i>A. nigricans</i> (IV. grup)	DH1	Demrciler M	<i>Hordeum sp.</i>
	DH2	Demrciler M	<i>Hordeum sp.</i>
	DH3	Demrciler M	<i>Hordeum sp.</i>
	DH4	Demrciler M	<i>Hordeum sp.</i>
	DH5	Demrciler M	<i>Hordeum sp.</i>
<i>A. chroococcum</i> (V. grup)	AH	Aşağıoba M	<i>Hordeum sp.</i>
	AA01	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA02	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA03	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA04	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA05	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA07	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA09	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	AA10	Altınova T	<i>Apium graveolens</i>
	KT1	Korkuteli T	<i>Triticum sativum</i>
	KT2	Korkuteli T	<i>Triticum sativum</i>
	CS1	Akseki Çimi Y	Toprak
	CS2	Akseki Çimi Y	Toprak
	CS3	Akseki Çimi Y	Toprak
	CS4	Akseki Çimi Y	Toprak
	CS5	Akseki Çimi Y	Toprak
	BOZ1	Bolu T	<i>Zea mays</i>
	BOZ2	Bolu T	<i>Zea mays</i>
	BOZ3	Bolu T	<i>Zea mays</i>

M: mera, Y: yayla, T: tarla

4.3. *Azotobacter* İzolatları ve İzole Edildiği Habitatlar

Farklı topraklardan izole edilmiş *Azotobacter* izolatları 16S rRNA gen dizilerine ve ARDRA sonuçlarına göre tanımlanmıştır. Buna göre Manavgat-Demirciler merasından *Hordeum* sp. (yabani arpa) rizosferinden beş izolat *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak tanımlanmıştır. *Apium graveolens* (kereviz) bitkisinden ve golf çim sahasından *A. vinelandii* türüne ait 3 izolat (AA11, AA12 ve BG1) izole edilmiştir. Akseki Çimi yaylasından *Vicea villosa* rizosferinden izole edilmiş 3 izolat (CV1, CV2 ve CV3) *A. salinestris* olarak tanımlanmış olup, bu izolatlardan farklı olarak *Solanum tuberosum*'dan (patates) (AS1, AS2, AS3, AS4, AS5 ve AS6), *Apium graveolens* (AA06 ve AA08), *Zea mays* (mısır) (BZ1, BZ2, BZ3, BZ4 ve BZ5), *Avena sativa* (yulaf) (KA1 ve KA2) bitkilerinden izole edilmiş 15 izolatında da *A. salinestris* olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). *A. chroococcum* olduğu belirlenen izolatlar ise *Apium graveolens* (AA01, AA02, AA03, AA04, AA05, AA07, AA08, AA09, AA10), *Triticum sativum* (buğday) (KT1 ve KT2), *Zea mays* (BOZ1, BOZ2, BOZ3), *Hordeum* sp. (AH) rizosferlerinden izole edilmiştir (Çizelge 4.6). Bu sonuçlara göre Akseki Çimi yaylasından *Vicea villosa* rizosferinden *A. salinestris* olarak tanımlanan izolatlar elde edilirken, aynı alandan alınan toprak örneğinden *A. chroococcum* olarak tanımlanan izolatlar tespit edilmiştir. Alınan her bitki rizosferinden bir *Azotobacter* türü izole edilmişken yalnızca *Apium graveolens* rizosferinden üç farklı *Azotobacter* (*A. chroococcum*, *A. vinelandii* ve *A. salinestris*) olduğu belirlenen izolatlar elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

Bu çalışmadan elde edilen izolatlardan yalnızca üç izolat (BOZ1, BOZ2 ve BOZ3) Antalya ili dışından, Bolu'ya ait *Zea mays* rizosferinden elde edilmiştir. Bolu coğrafik olarak Türkiye'nin Kuzey Batı bölgesindedir. Bu çalışmaya BOZ1, BOZ2 ve BOZ3 izolatları, Antalya'a ait *Zea mays* rizosferinden elde edilen izolatlarla karşılaştırmak için dahil edilmiştir. *A. chroococcum* olarak tanımlanan BOZ3 izolatı 16S rRNA geni NJ ağaçlarında AH ve CS1, CS2 ve CS3 izolatları ile birlikte gruplanmıştır.

Bu çalışmadan izole edilen izolatların isimlendirilmeleri izole edildikleri alan ve bitki isimlerinin baş harfleri dikkate alınarak yapılmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. İzolatların isimlendirilmesinde kullanılan izolatların izole edildikleri alanlar ve bitkiler

İzolat adı	İzole edildiği alan-bitki/toprak
AA01	Altınova- A pium
KT1	Korkuteli- T riticum
AS1	Altınova- S olanum
BZ1	Belek- Z ea
DH1	Demirciler- H ordeum
CS1	Çimi-(Soil) toprak
BG1	Belek-Golf çim sahası
CV1	Çimi- V icea
BOZ1	Bolu- Z ea
AH	Aşağıoba- H ordeum

4.4. Toprak Analizleri

Farklı mera ve tarlalardan alınan toprakların kimyasal ve bünye özellikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada 2007 yılında toplam 64 toprak örneği alınmıştır ve bunlardan 31 örneğin analizi yapılmıştır. Analiz edilen toprakların pH değerleri 7,1-8,1 arasında değişmektedir. Yalnızca İbradı Eynif merasından alınan bir toprak örneğinin pH'sı 5,7'dir. Sonuç olarak analiz edilen toprakların pH özelliği nötr ya da nötre yakın değerdedir. Analiz edilen toprakların bünye yapısı da birbirinden çok farklı değildir. Yalnızca Manavgat Demirciler merasından alınan bir örneğin bünyesi kumlu belirlenmiştir. Diğer toprak bünyeleri tınlı ya da killi tınlı olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Analiz edilen toprakların örnek alınan alanlara göre bünye özellikleri

Alanlar	Bünye
Manavgat Demirciler Merası	Tınlı
İbradı Eynif Merası	Tınlı ya da killi tınlı
Elmalı Eymir Merası	Tınlı yada killi tınlı
Akseki Çimi Yaylası	Tınlı ya da killi tınlı
Belek mısır Tarlası	Tınlı
Korkuteli buğday Tarlası	Killi tınlı
Altınova kereviz Tarlası	Tınlı ya da killi tınlı
Altınova patates Tarlası	Killi tınlı
Bolu mısır Tarlası	Tınlı

Bakteri izole edilmiş topraklar ile izole edilememiş toprakların kimyasal özellikleri karşılaştırıldığında; nem, tuz, kireç, organik karbon, organik madde, toplam azot (N), potasyum (K), C/N, fosfor (P), magnezyum (Mg), demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn) ve bakır (Cu) miktarlarının ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($P>0.05$), yalnızca kalsiyum (Ca) miktarları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.01$). Bakteri izole edilmiş ve izole edilememiş toprakların kimyasal özelliklerinin ortalamaları ve p değerleri çizelgede sunulmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Azotobacter* izole edilmiş ve edilmemiş toprak örneklerinin toprak özellikleri miktarlarının ortalamaları ve p değerleri

Toprak özellikleri		X ₁	X ₂	p
Nem ²	(%)	15,81	16,20	0,906
Tuz ²	(%)	13,88	18,27	0,177
Kireç ²	(%)	14,31	17,80	0,286
C / N ²		16,80	15,25	0,635
Organik madde ¹	(%)	2,28	2,518	0,593
Organik karbon ¹	(%)	1,518	1,399	0,664
Toplam azot ¹	(%)	0,158	0,149	0,682
Potasyum ¹	kg K ₂ O/da	72,946	82,156	0,620
Kalsiyum¹	kg CaO/da	1760,9	2317,53	0,006
Fosfor ²	kg P ₂ O ₅ /da	18,03	14,09	0,228
Magnezyum ²	kg MgO/da	18,77	13,41	0,101
Demir ²	ppm	19,17	13,03	0,06
Mangan ²	ppm	13,90	17,97	0,213
Bakır ¹	ppm	1,3387	1,829	0,164
Çinko ²	ppm	14,40	17,50	0,342

X₁ *Azotobacter* izole edilmemiş toprakların ortalamaları

X₂ *Azotobacter* izole edilmiş toprakların ortalamaları

¹ Normal dağılım gösteren ve t testi uygulanan değişkenler

² Normal dağılmayan ve U testi uygulanan değişkenler

P<0.05 olan değişken koyu puntolu olarak gösterilmiştir

5. TARTIŞMA

5.1. *Azotobacter* İzolatlarının Elde edilmesi ve Farklı İzolasyon Yaklaşımları

Azotobacter cinsine ait türler aerobik, kemoheterotrof ve azot bağlayan bakterilerdir. Bu bakteriyi izole etmek için uygun bir pH ile birlikte, organik karbon kaynağı ve molibden gibi bir iz elementin ortamda bulunması yeterli olabilmektedir (Becking 1992). Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif, Manavgat-Demirciler meralarından ve Akseki Çimi yaylasından 2006 yılında toplam 42 toprak örneği alınmıştır ve yapılan ilk izolasyonda soil-past ve Brown'nun katı besi ortamı kullanılmıştır. İzole edilen beyaz ve sulu koloni veren izolatlar LG seçici besi ortamında taranmış ve sarı renk koloni verme özelliklerine göre seçilmiştir. Seçilen 120 izolatın *RsaI* restriksiyon enzimi ile yapılan ARDRA sonuçları ve 16S rRNA geni dizi analizleri, bu izolatların *Azotobacter* olmadığını göstermiştir. 2007 yılında gerçekleştirilen ikinci izolasyon çalışmasında *Azotobacter* zenginleştirici Burk'un azotsuz sıvı besi ortamı kullanılmıştır. Sıvı besi ortamında çoğalan karışık mikroorganizma kültürü Burk'un azotsuz katı besi ortamına aktarıldığında oluşan beyaz ve sulu koloniler saflaştırılarak mikroskopik gözlemden sonra *Azotobacter* hücre morfolojisine benzer izolatlar seçilmiştir. Bu izolasyon çalışmasından 80 izolatın *Azotobacter* olabileceği varsayılmış ve ARDRA yapmak için seçilmiştir. Bu yöntemle 45 izolat *Azotobacter* olarak tanımlanmıştır.

Birinci (2006) ve ikinci yılda (2007) uygulanan *Azotobacter* izolasyon yöntemleri karşılaştırıldığında, Brown'nun katı besi ortamı ve soil past yöntemlerinin, Burk'un sıvı besi ortamına göre yetersiz kaldığı görülmüştür. Aquilanti ve arkadaşlarının (2004a) *Azotobacter* izolasyonunda faydalandıkları üç farklı besi ortamını (Brown, Winogradsky azotsuz besi ortamları ve soil-past) karşılaştırdıkları çalışmalarında soil-past yönteminin diğerlerine göre etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak Aquilanti ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmada, 196 izolattan yalnızca 40'nın *Azotobacteraceae* familyasına ait olduğu saptanmıştır. Bunlardan 15 izolatın *A. chroococcum* ve diğerlerinin *Azomonas* (*Azm. insignis* ve *Azm. macrocytogenes*) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada yalnızca 15 *Azotobacter* izole edilebilmiş olması bu çalışmada da kullanılan Brown ve soil-past izolasyon ortamlarının yetersiz

olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada LG seçici besi ortamının *Azotobacter* seçiminde kolaylık sağladığı belirtilmiş olmasına karşın, şu anki çalışmanın sonuçlarına göre mikroskopik gözleme dayalı hücre morfolojisinden yararlanarak *Azotobacter* hücrelerine benzer izolatların seçiminin daha etkili olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada 2006 yılında toplam 42 ve 2007 yılında 64 toprak örneği toplanmıştır. İlk yıl yalnızca Antalya bölgesindeki Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif, Akseki-Çimi ve Manavgat-Demirciler'deki çayır-mera topraklarından örnek alınmıştır. 2007 yılında ise bu alanlara ek olarak Antalya merkez Aşağıoba merasından, Belek golf çim sahalarından ve tarlalardan (Korkuteli buğday ve yulaf, Belek mısır, Altınova patates ve kereviz, Bolu mısır tarlaları) örnekler toplanmıştır. İlk yıl *Azotobacter* izolasyonu yapılan topraklarda *Azotobacter* tespit edilmemiştir. Bunun nedeni olarak ilk yıl uygulanan Brown ve soil-past izolasyon yönteminin yetersiz olduğu düşünülebilir. Ancak ikinci yıl uygulanan izolasyon yönteminde 45 *Azotobacter* bakterisi izole edilmesine karşın, aynı yöntemle ilk yıl alınan Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif meralarından *Azotobacter* izole edilmemiştir. Sonuç olarak birinci yıl *Azotobacter* izolasyonunda izolasyon yöntemine ek olarak alınan toprak örneklerinde *Azotobacter* bulunmamasından dolayı *Azotobacter* izole edilemediği de ileri sürülebilir. Bununla birlikte ilk yıl *Azotobacter* izole edilemeyen Akseki-Çimi ve Manavgat-Demircilerden *Azotobacter* izole edilmesi *Azotobacter* izolasyonunda kullanılan besi ortamının ve izolat seçilmesindeki yöntemin önemini göstermektedir.

5.2. *Azotobacter* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışmada, farklı çayır-mera ve tarlalardan elde edilmiş toplam 45 *Azotobacter* izolatının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. İzolatların tanımlanması ve gruplandırılması için ARDRA metodundan faydalanılmıştır. ARDRA'dan elde edilen dendrogram'a göre toplam 45 izolat beş farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 4.18) ve bu grupları temsil eden 16 izolatın 16S rRNA gen dizi analizi yapılmıştır. 16S rRNA geninin 1316 bp uzunluğundaki baz dizilerinden elde edilen veriler, NJ uzaklık ve seç bağla (1000 tekrarlı) yaklaşımlarıyla filogenetik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu ağaçlar üzerinde izolatlar benzer şekilde gruplanmıştır. Bu ağaçlara

göre dış grup olarak seçilen *P. aeruginosa*, *Azotobacter* ve *Azomonas* cinslerinden tümüyle ayrılmıştır. Bu ağaç üzerinde *Azomonas* cinsine ait *Azm. agilis* ve *Azm. macrocytogenes* türleri de *Azotobacter* türlerinden ayrı bir grup içinde yer almıştır. NJ seç bağla testi sonucu *Azotobacter* izolatları 75 seç bağla değeri ile iki büyük gruba ayrılmıştır (Şekil 4.19). *A. salinestris*, *A. vinelandii*, *A. armeniacus*, ve *A. nigricans* subsp. *nigricans*'ın bulunduğu ilk grup *A. tropicalis*'den ayrı bir dalla ayrılmıştır ve bu kök 98 seç bağla değeriyle desteklenmiştir. *A. tropicalis* Bergeys Manual'de (Kennedy vd 2005) tanımlanmış *Azotobacter* türlerinden biri değildir. Ancak, bu çalışmadan elde edilen *Azotobacter* izolatlarının 16S rRNA gen dizlerinin NCBI'nin gen veri bankasındaki dizilerle BLAST analizleri yapıldığında, *A. tropicalis* bakterisine ait dizilerin, % 97 oranında bu çalışmadaki *A. vinelandii* izolatlarına benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada *A. tropicalis* olarak adlandırılmış bu dizi de izolatların 16S rRNA gen dizlerinin filogenetik ağacına dahil edilmiştir. Bu analize göre 98 seç bağla değeri ile desteklenmiş grubun içerisindeki *A. tropicalis* bakterisinin, diğer tüm *Azotobacter* türlerinden ve izolatlardan farklı olduğu saptanmıştır.

16S rRNA gen dizisinden elde edilen NJ seç bağla ağacı üzerinde *A. salinestris*, *A. vinelandii*, *A. armeniacus* ve *A. nigricans* subsp. *nigricans*'ın bulunduğu politomik grup 64 seç bağla değeri ile desteklenmiştir (Şekil 4.19). Bu analize göre bu grup içerisindeki *Azotobacter* türleri ve *Azotobacter* izolatlarının akrabalık ilişkisi yeterince çözümlenememiştir. Bununla birlikte bu çalışmadan elde edilen izolatlar yüksek seç bağla değerleriyle farklı gruplara ayrılabilmişlerdir. AA11 (grup I) izolatı 16S rRNA geni NJ seç bağla ağacı üzerinde *A. vinelandii* DSM576 suşu ile birlikte gruplanmış ve 100 seç bağla değeri ile desteklenmiştir (Şekil 4.19). Bu bağlamda ARDRA dendrogramı üzerinde AA11 izolatının bulunduğu I. gruba ait izolatların *A. vinelandii* olduğu saptanmıştır. AS3, KA2, BZ3, CV1 ve CV3'ün bulunduğu grup ise *A. salinestris* ve *A. vinelandii* 380 suşuyla birlikte gruplanmıştır ve 99 seç bağla değeri ile desteklenmiştir (Şekil 4.19). Grup II (CV1 ve CV3) ve III'e (AS3, BZ3 ve KA2) ait izolatlar NJ ağaçları üzerinde farklı dallara yerleşerek gruplanmıştır. NJ uzaklık ağacında da bu izolatların *A. salinestris*'e yakın akraba olduğu görülmektedir (Şekil 4.20). Hem NJ seç bağla hem de uzaklık ağaçlarına göre grup II'e ait izolatların, grup III izolatlarına kıyasla *A. salinestris*'e daha yakın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlarla

uyumlu olarak, 16S rRNA geni BLAST analizine göre grup II ve grup III'ü temsil eden izolatların, % 99 *A. salinestris*'e benzer olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu bağlamda grup II ve grup III'e dahil edilen izolatların *A. salinestris* olduğu ve grup III'e ait izolatların farklı bir *A. salinestris* grubu olduğu saptanmıştır.

16S rRNA geni NJ seç bağla ve uzaklık ağaçları üzerinde *A. vinelandii* 380 ve *A. salinestris* suşlarının birlikte gruplandığı görülmüştür (Şekil 4.20). NCBI web sayfasından erişilen gen bankasında, *A. vinelandii* olarak adlandırılmış çok sayıda 16S rRNA gen dizileri, *A. salinestris*'e % 99 benzerlik göstermektedir. Bu suşlar arasından bir tanesi (*A. vinelandii* 380) bu çalışmaya eklenmiştir. Sonuç olarak *A. vinelandii* 380 suşu, *A. salinestris* ile birlikte gruplanmıştır (Şekil 4.19). 16S rRNA genine ait NJ uzaklık ağacında *A. salinestris* ve *A. vinelandii* 380 suşlarının yakın akraba oldukları görülmektedir (Şekil 4.20). Bu bağlamda NCBI'nın web sayfasından erişilen çok sayıda *A. vinelandii* olarak adlandırılmış suşların, *A. salinestris* olduğu önerilebilir.

ARDRA'dan elde edilen dendrogramda IV. grupta yer alan DH1, DH2, DH3, DH4 ve DH5 izolatları *A. armeniacus* ile birbirine uzak gruplanmış (Şekil 4.18) olmasına karşın, 16S rRNA genin baz dizi analizinden elde edilen NJ ağacına göre bu izolatlar 100 seç bağla değeriyle desteklenerek *A. nigricans* subsp. *nigricans* ile gruplanmıştır (Şekil 4.19). Buna göre Manavgat Demirciler merasından izole edilen bu izolatların *A. nigricans* subsp. *nigricans* olduğu belirlenmiştir.

ARDRA'dan elde edilen UPGMA dendrogramında V. gruba ait olan ve *A. chroococcum* olarak önerilen grubu temsil eden izolatlar (AH, BOZ3, CS1, CS2 ve CS3), 16S rRNA gen dizi analizi sonucu elde edilen NJ seç bağla ağacına göre *A. chroococcum* suşlarına birlikte gruplanmış ve 97 seç bağla değeri ile desteklenmiştir (Şekil 4.19). Bu çalışmadan elde edilen izolatlar ve *A. chroococcum* suşları, *A. beijerinckii* suşlarından 85 seç bağla değeri ile desteklenerek farklı bir gruba ayrılmıştır. NCBI web sayfasından erişilen gen veri bankasından temin edilen *A. beijerinckii* 347 suşu *A. chroococcum* suşlarının yer aldığı gruba katılmıştır (Şekil 4.19). Aynı zamanda bu suşun 16S rRNA geninin BLAST analizi sonucunda da % 99 *A. chroococcum* 'un tip

suşuna benzer olduğu görülmüştür. Bu bağlamda *A. beijerinckii* 347 suşunun, *A. chroococcum* olduğu önerilebilir.

ARDRA'dan elde edilen dendrogramda V. grupta yer alan izolatlar *A. beijerinckii* DSM378 referans suşundan ayrı bir dalla ayrılmış ve *A. chroococcum* DSM2286 tip suşu ile gruplanmıştır (Şekil 4.18). Sonuç olarak bu gruptaki toplam 19 izolatın *A. chroococcum* olarak önerilmesi 16S rRNA gen dizisiyle de teyit edilmiştir.

16S rRNA geni NJ seç bağla ağacı üzerinde Akseki Çimi merasından elde edilmiş ve *A. salinestris* olarak belirlenmiş CV1 ve CV3 izolatlarının aynı grupta yer aldığı ve NJ uzaklık ağacına göre birbirine yakın akraba olduğu görülmektedir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Belek mısır (BZ3), Altınova patates (AS3) ve Korkuteli yulaf (KA2) tarlasından izole edilmiş *A. salinestris* olarak belirlenmiş izolatların 94 seç bağla değeriyle desteklenerek aynı monofiletik grupta yer aldığı ve NJ uzaklık ağacında bu izolatların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu bağlamda *A. salinestris* olarak belirlenen bu izolatların arasındaki farklılaşmanın çok yüksek olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte grup III'e ait bu izolatların Akseki Çimi yaylasından izole edilenlerden farklı olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, farklı alanlardan ve bitki rizosferlerinden izole edilmiş ve *A. salinestris* olduğu belirlenen grup III'e ait izolatlar 16S rRNA genine göre farklılaşma göstermemektedir. 16S rRNA geni tür içi farklılaşmayı sınırlı göstermesinden dolayı grup içindeki farklılaşmaları göstermek için farklı DNA parmak izi metotları uygulanması önerilebilir.

Bu çalışmadan elde edilen *A. chroococcum* izolatları 16S rRNA geni dizi analizine göre 97 seç bağla değeri ile iki gruba ayrılmıştır. İlk grup Çimi yaylasından izole edilen CS1, CS2 ve CS3, Aşağıoba merasından izole edilen AH ve Bolu mısır tarlasından izole edilen BOZ3 izolatları 84 seç bağla değeri ile destek alarak aynı gruba dahil olmuştur. Bu gruptaki izolatlar 86 seç bağla değeri ile desteklenmiş iki ayrı gruba daha ayrılmıştır. Buna göre CS3 ile aynı yerden izole edilen CS1 ve CS2 izolatları birbirinden ayrılmıştır. Ancak, farklı alanlardan ve bitki rizosferlerinden elde edilen CS3, AH ve BOZ3 izolatları politomik bir grup oluşturmuştur (Şekil 4.19). Bu bağlamda 16S rRNA gen dizi analizlerine göre *A. chroococcum* olarak tanımlanan

izolatlar arasındaki farklılıklar yeterince belirlenememiştir. Bununla birlikte kereviz rizosferinden izole edilen ve *A. chroococcum* olarak saptanan AA10, AA09 ve AA04 izolatları diğer izolatlardan yüksek bir seç bağla değeriyle (97) ayrılmıştır. Bu bağlamda kereviz rizosferinden izole edilen ve *A. chroococcum* olarak belirlenen izolatların diğerlerinden farklı olduğu önerile bilinir.

Azotobacter referans bakterilerinin ve izolatların 16S rRNA genlerinin PZR ile çoğaltılmasından sonra, PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri (*RsaI*, *HhaI*, *FnuDII* ve *HpaII*) ile kesimi sonucu ARDRA profilleri elde edilmiştir. Aquilanti ve arkadaşları (2004b) tarafından, diğer bakteri cinslerinden (*Pseudomonas*, *Beijerinckii*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* ve *Azomonas*) farklı olarak, *Azotobacter* cinsi üyelerinin ARDRA sonucu *RsaI* profillerinin tek haplotip verdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada da Aquilanti ve arkadaşlarının belirttiği gibi *Azotobacter* referans suşları'nın tek haplotip verdiği gösterilmiştir. Yalnızca *Azomonas* cinsine ait *Azm. agilis* DSM375'in *RsaI* restriksiyon enzim profili *Azotobacter* cinsi ile aynı sonucu vermiştir. Aquilanti ve arkadaşlarının (2004ab) çalışmalarında *Azm. agilis* DSM375 jel profilleri ve haplotip çeşitleri bu çalışmadaki sonuçlarla uyumlu olmasına karşın, çalışmalarının tartışma bölümlerinde *Azm. agilis* yerine *Azm. macrocytogenes*'in *Azotobacter* ile *RsaI* enzim profillerinin benzer olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada toplam 200 izolatın ARDRA analizi yapılmıştır, bunlardan 45 izolatın *RsaI* restriksiyon enzim profili *Azotobacter* referans bakterilerinin *RsaI* profilleri ile aynı bulunmuştur. 200 izolattan *Azotobacter* olmadığı anlaşılan 155 izolat bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Referans suşların ve 45 izolatın 16S rRNA genleri diğer restriksiyon enzimleriyle analiz edildiğinde suşların ve izolatların birbirinden farklılaştığı görülmüştür. Kullanılan restriksiyon enzimleri içerisinde beş farklı haplotip veren *HhaI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri, izolatlar arasında en fazla farklılaşmayı göstermiştir.

Dört farklı restriksiyon enzimi kullanılan ARDRA'dan elde edilen dendrograma göre (Şekil 4.18), *Azm. macrocytogenes*, *Azotobacter*'in tüm gruplarından bağımsız bir dala yerleşmiştir. Aynı cinse ait *Azm. agilis*'in ise aynı dendrogram üzerinde

Azotobacter türlerinden ayrı bir dalla ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.18). Sonuç olarak, *Azm. agilis*'in *RsaI* restriksiyon enzim profili *Azotobacter* üyeleri ile aynı olmasına karşın diğer enzimlerle analiz edildiğinde *Azotobacter*'den uzaklaştığı görülmektedir. ARDRA sonuçlarına göre *Azomonas* ve *Azotobacter* üyeleri birbirlerinden ayrılabilir. *Azotobacter vinelandii* DSM87, *A. beijerinckii* DSM378, *A. chroococcum* DSM2286, *A. armeniacus* DSM2284, *Azm. agilis* DSM375 ve *A. salinestris* DSM11533 suşları ARDRA dendrogramı üzerinde farklı gruplara yerleşmesinden dolayı, ARDRA'da kullanılan restriksiyon enzimlerinin bu türleri ayırmakta yeterli olduğu görülmektedir.

ARDRA yapılan *A. vinelandii* DSM87 referans suşu bu analiz sonucu elde edilen dendrogramda *A. salinestris* DSM11533 referans suşundan bir dalla ayrılmıştır (Şekil 4.18). Bu dendrogram üzerinde, bu çalışmaya ait izolatlardan *A. vinelandii* ve *A. salinestris* olarak belirlenen izolatlar (grup I ve grup II) aynı grup içinde yer almaktadır (Şekil 4.18). Bu bağlamda ARDRA, *A. vinelandii* ve *A. salinestris* türlerine ait izolatları yeterince ayıramamaktadır.

Azotobacteraceae üyelerinin taksonomik ilişkisini belirlemek için izoenzim ve protein profilleri analizleri yapılmıştır. Protein profilleri çalışmasında *Azotobacter* cinsinin heterojen bir grup olduğu ve *A. beijerinckii* türünün gelecek çalışmalarda ayrı bir cins olarak ayrılabilceği önerilmiştir (Jana vd 1992). İzoenzim profilleri çalışmasında ise *Azm. macrocytogenes*'in *Azomonas* ve *Azotobacter* cinslerinden farklı bir cinse ayrılması önerilmiştir (Jana 1994). Ancak, bu bakterilere ait rRNA sistron analizleri *A. beijerinckii*'nin *Azotobacter* cinsinde ve *Azm. macrocytogenes*'in ise *Azomonas* cinsinde kalmasını desteklemektedir (Kennedy vd 2005ab). Sonuç olarak protein profil ve izoenzim çalışmaları *Azotobacteraceae* üyelerinin akrabalık ilişkilerinin belirlenmesine sınırlı bir yaklaşım getirmiştir.

16S rRNA gen dizi analizi bakterilerin taksonomik tanımlanmasında güçlü bir yöntemdir (Stackebrandt vd 2002). Ancak, bakterilerin tanısında belirteç olarak protein kodlayan farklı genlerin (*nod*, *nif*, *rpoB*, *gyrB* gibi) kullanımı da son yıllarda

yaygınlaşmıştır (Yamamoto ve Harayama 1998, Zeze vd 2001, Andronov vd 2003, Adekambi ve Drancourt 2004, Chelo vd 2007, Hannula ve Hannien 2007).

Young ve Park (2007), 16S rRNA, *atpD*, *carA*, *recA* gen dizilerini kullanarak *Azotobacter* ve *Pseudomonas*'ın akrabalık ilişkilerini tartıştıkları çalışmalarında; Jana ve arkadaşlarının (1992) ve Jana (1994) çalışmalarından farklı olarak, *Azotobacter* ve *Azomonas* (*Azm. macrocytogenes*) cinslerinin sinonim olabileceklerini ve *Azomonas* cinsinin *Azotobacter* cinsine dahil olabileceğini önermiştir. Benzer şekilde bu çalışma *Azotobacter* türlerinin özellikle *A. vinelandii*'nin *P. aeruginosa*'ya yüksek oranda benzemesinden dolayı *Azotobacter* cinsinin *Pseudomonas* cinsine dahil edilmesini tartışmıştır. Benzer tartışmayı Reiders ve arkadaşları da (2004) özellikle *A. vinelandii* türünü esas alarak yapmıştır ve *A. vinelandii*'nin *Pseudomonas* cinsine dahil edilebileceğini önermiştir. Young ve Park'ın çalışmalarında, 16S rRNA geni NJ ağacında *Azotobacter* türleri *P. aeruginosa* grubu içinde yer almaktadır (Şekil 2.5) benzer şekilde *atpD*, *carA* ve *recA* gen dizilerinin NJ ağacında *Azotobacter* türlerinin *P. aeruginosa*'ya yakın olduğunu göstermektedir (Şekil 2.6). Bu çalışmadan elde edilmiş izolatların pozisyonları şu anki kabul gören literatüre göre yapılmış olup, *Azotobacter*'e yakın akraba olan *P. aeruginosa*'nın bu çalışmadan elde edilmiş izolatlarla ilişkisinin (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) diğer *Azotobacter* türleri kadar yakın olduğu görülmüştür.

NifH geni, azot bağlayan bakterilerin filogenetik ilişkilerini ya da çeşitliliğini belirlemek için kullanılan ve protein kodlayan genlerden biridir. Mikroorganizmalar arasında nitrojenaz protein dizilerinin yüksek derecede benzer olması, proteini kodlayan genlerin kökene yakın olduğunu ya da prokaryotlar arasında lateral gen transferinin yaygın olduğunu önermektedir (Zehr vd 2003, Raymond vd 2004). Nitrojenaz genleri beş ana gruba (Grup I-V) ayrıştırılmaktadır. Bunlar; Grup I; Mo-Fe nitrojenazlar ve proteobakteri ve siyanobakteri grubunda yaygındır, Grup II; anaerobik Mo-Fe nitrojenazlar *Clostridium*, asetogenik bakteriler ve bazı metanojenler, Grup III; alternatif nitrojenazlar, Mo'den bağımsız *Anf* ve *Vnf* genleri, Grup IV; Metanojen ve bazı anoksijenik fotosentetik bakterilerdeki karakterize edilmemiş *nif* homologları, Grup V; tüm ototroflardaki bakteriyoklorofil ve klorofil biyosentez genleri (Raymond vd 2004). *Azotobacter vinelandii nifH* geni grup I içinde gruplandırılmıştır. Nitrojenaz

genlerine dayanarak yapılan filogenetik ağaçlar genel olarak 16S rRNA geni filogenetik ağaçları ile uyumludur özellikle grup I için bu uyum çok daha güçlüdür (Young 1992, Zehr vd 2003, Raymond vd 2004).

NifH geni, mikroorganizmaların farklı gruplarına dağılmış olmasına karşın, bu çalışmadan elde edilen izolatların *nifH* geninin baz dizileri BLAST analizi yapıldığında bu dizlere karşılık gelen türler *Azotobacter* türleri olmuştur. *Azotobacter* ve *Azomonas* cinslerine ait gen veri bankasından elde edilen *nifH* genlerine ait dizilerle yapılan dizi hizalama analizi sonucunda elde edilen filogenetik ağaca göre *Azotobacter* türleri ve *Azomonas* birbirinden tamamen ayrılmıştır (Şekil 4.23). Cins bazında *nifH* geninin iyi bir belirteç olduğu görünmektedir. Bununla birlikte 265 bp uzunluğundaki bu dizi *Azotobacter* türlerinin ayrışmasında yetersiz olduğu gözlenmiş olmasına karşın özellikle *A. nigricans* subsp. *nigricans* (DH1, DH2, DH3, DH4 ve DH5) olarak belirlenen izolatlar (16S rRNA geni dizi analizine göre), diğer *Azotobacter* türlerinden 80 seç-bağla değeriyle ayrılmıştır. *Azotobacter vinelandii*'e ait iki referans dizi ve AA11-AA12 izolatlarının yer aldığı grupta 82 seç-bağla değeriyle diğer ana gruptan uzaklaşmıştır. Ancak *A. salinestris* ve *A. chroococcum* olarak saptanan suşlar politomik olarak gruplanmış ve izolatların arasındaki yakınlık belirlenememiştir. Bu bağlamda *A. vinelandii* ve *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak belirlenen izolatların *nifH* genleri *A. chroococcum* ve *A. salinestris* olarak tespit edilen izolatların *nifH* genlerinden farklılaştığı görülmektedir.

Son yıllarda azot bağlayan mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemek için *nifH* geni belirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *nifH* genini PZR ile çoğaltmak için çok sayıda primer çifti tasarlanmıştır. Bu primerlerin çoğu evrensel primerlerdir (Widmer vd 1999, Poly vd 2001, Rösch vd 2002) ve bir çok kültürden bağımsız çalışmada azot bağlayan mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemek için kullanılmıştır (Hamelin vd 2002, Zhang vd 2006, Izquierdo ve Nüsslein 2006). *NifH* geninin içerdiği filogenetik bilginin kullanılması için, Bürgmann ve arkadaşları (2004) azot bağlayan mikroorganizmaların alt gruplarını hedefleyen primer çiftleri ve PZR protokolleri geliştirmişlerdir. Ancak bu çalışmada tasarlanan primerlerin topraktaki belirli azot bağlayan mikroorganizmaların doğrudan tanımlanmasında yetersiz kalabileceği

belirtilmiştir. Bürgman ve arkadaşları (2004) tarafından tasarlanan primer çiftlerinden *Azotobacter* spp.'i hedefleyen primer çifti (nifH-g1) bu çalışmada kullanılmıştır. Ancak, bu genin baz dizileri (265 bç) *A. nigricans* subsp. *nigricans* ve *A. vinelandii* olarak belirlenen izolatlar haricinde, *A. chroococcum* ve *A. salinestris* olarak saptanan izolatları ayırmakta yetersiz kalmıştır.

5.3. *Azotobacter* Dağılımı

Toplam beş mera alanından üçünde (Manavgat-Demirciler, Merkez-Aşağıoba ve Akseki-Çimi yaylası) *Azotobacter* izole edilmiştir (Çizelge 4.6). *Azotobacter* genel olarak geniş yayılım gösteren bir cins olmasına karşın alınan her örnekten *Azotobacter* izole edilememiştir. Her alana ait farklı bitki rizosferlerinden en az iki ya da üç örnek alınmasına karşın bunlardan yalnızca bir ya da iki örnekten *Azotobacter* izole edilmiştir. Sonuç olarak *Azotobacter* bulunan bir alanda *Azotobacter*'in homojen olarak toprağa dağılmadığı ileri sürülebilir. *Azotobacter*'in dağılımı ile ilgili çalışmalar yapmış olan Krasilnikov'da bu sonucu desteklemektedir (<http://www.soilhealth.org/01aglibrary>).

Toprakta mikroorganizmaların dağılımı biyotik ya da biyotik olmayan değişkenlerden güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Pek çok sistemde bu değişkenler kısa ya da uzun süreçlerde değişebilmektedir (Bagwell ve Lovell 2000, Piceno vd 1999). Bu nedenle mikroorganizmaların bulunduğu ortamın kimyasal özelliklerinin bilinmesi mikroorganizmaların çeşitliliği ya da dağılımı konusunda bilgi verebilmektedir. *Azotobacter* izole edilen toprakların kimyasal özellikleri ile *Azotobacter* dağılımı arasında ilişki olduğu bilinmektedir (Becking 1992, Kennedy vd 2005). *Azotobacter* populasyonları genel olarak organik maddece ve fosforca zengin ortamlarda bulunmaktadır (Becking 1992). Bu çalışmada 2007 yılında toplanmış 64 toprak örneğinden rasgele seçilen 31 toprak örneğinin kimyasal özellikleri (pH, nem, organik madde, organik karbon, toplam azot, kalsiyum, fosfor, potasyum, demir, bakır, magnezyum, mangan çinko ve bünnye) analiz edilmiştir. *Azotobacter* izole edilmiş topraklarla, edilmeyenler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; *Azotobacter* izole edilmiş toprakların kalsiyum miktarının iki kat fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.6). *Azotobacter* hücrelerinin çoğalmasının kalsiyum ile

desteklendiği önceki yıllarda rapor edilmiştir (Jakobsons vd 1962, Doran vd 1987, Peterson 1992, Wong 1993, Youatt 1993). Doran ve arkadaşları (1987) kalsiyumun *A. vinelandii* hücre duvarının stabilitesini koruduğunu ve şeker alımı için uygun hücre duvarı formasyonu oluşturduğunu önermiştir. Wong (1993) kalsiyum'un *A. vinelandii* hücrelerinin şeker (sükroz) alımını kolaylaştırdığını bildirmiştir. Peterson (1992) ise kalsiyum ve magnezyumun *A. vinelandii* hücrelerinin nitrojenaz aktivitesini artırdığını rapor etmiştir. *Azotobacter* çoğaltmak için kullanılan besi ortamlarında da genellikle kalsiyum, CaCl_2 ya da CaCO_3 şeklinde bulundurulmaktadır (Becking 1992). Bu bağlamda *Azotobacter*'in organik karbonu hücre içine alabilmesi bulunduğu ortamda yeterli kalsiyum miktarına bağlı olabilir. Bu çalışmada *Azotobacter* izole edilmiş ve edilmemiş toprakların organik madde ve organik karbon miktarlarının ortalamalarının istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte kalsiyumun dışında, toprağın diğer özellikleri ile *Azotobacter*'in dağılımı istatistiksel olarak ilişkilendirilememiştir. Sonuç olarak *Azotobacter* dağılımında, organik madde ya da karbonun kullanımını kolaylaştıran kalsiyum miktarının da etkili olduğu önerilebilir.

Mikroorganizmalar özellikle bitki olmayan topraktan çok rizosfer toprağında bulunur. Fotosentezle özümlenen karbonun % 20'si kök salgıları (karbohidrat, vitamin, amino asit gibi bileşikler içermektedir) ile toprağa serbest bırakılmaktadır (Hutsch vd 2002). Bu ortamda azot sınırlı olmasına rağmen, azot bağlayan mikroorganizmaların büyümesi uyarılabilmektedir (Piceno vd 1999, Lovell vd 2000). *Azotobacter*'de diğer azot bağlayan mikroorganizmalar gibi çoğalması karbon kaynağına bağlıdır (Becking 1992). Bu çalışmada örnekler hem rizosfer hem de bitki olmayan topraklardan toplanmıştır. *Azotobacter* izole edilen alanlardan (Akseki-Çimi) yalnızca bir bitkisiz topraktan *Azotobacter* izole edilmiştir. Diğer *Azotobacter* izole edilen toprak örneklerinin tümü farklı bitkilere ait rizosfer toprağıdır. Akseki-Çimi'den alınan bitkisiz toprak örneğinden *Azotobacter* izole edilmesinin nedeni bu alandaki bitki vejetasyonun, örneklerin alındığı zamanda oldukça zengin olmasına bağlanabilir. Sonuç olarak bitki bulundurmeyen toprağa, çevredeki sık bitki alanlarından, besin ve mikroorganizma bulaşmış olabilir.

Azotobacter üyeleri *A. paspali* haricinde bir konağa bağlı değildirler. Genel olarak bitki kökleri yakınında ya da rizosferde yüksek oranda bulunmalarına karşın bitki olmayan toprakta da yaşayabilmektedirler (Becking 1992, Kennedy vd 2005). *Azotobacter*'lerin şimdiye kadar her hangi bir bitki seçimi yaptıkları da bildirilmemiştir. Kole ve arkadaşlarının Kanada'da *Azotobacter* dağılımını araştırdıkları çalışmalarında (1988) *Azotobacter* (*A. chroococcum*) dağılımının toprak bünyesi ve bitkiye bağlı olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada *A. chroococcum*'un yulaf, mısır ve soya fasulyesi rizosferinde en fazla bulunduğu, buğdayda ve daha düşük oranda çayır bitkisi rizosferinde bulunduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada farklı alanlara ait farklı bitki rizosferlerinden örnekler toplanmıştır. Yabani arpa (*Hordeum* sp.) genel olarak yaygın bir bitkidir bu nedenle her yerde görülebilmektedir. Örnek alınan tüm meralarda yabani arpa bulunmaktadır. Bu nedenle her meraya ait yabani arpa rizosferinden en az üç örnek alınmıştır. Ancak yalnızca Merkez-Aşağıoba ve Manavgat-Demirciler merasından alınan örneklerden *Azotobacter* izole edilebilmiştir. Bu sonuca göre her yabani arpa rizosferinde *Azotobacter* görülmeyebilir. Benzer şekilde mısır tarlalarından alınan örneklerde her mısır rizosferinin *Azotobacter* bulundurmadığı görülmüştür. Mısır tarlalarından en az üç farklı mısır rizosferi örneği alınmasına karşın bunlardan yalnızca bir örnekten *Azotobacter* izole edilmiştir. Bu bağlamda arpa ya da mısır rizosferlerindeki *Azotobacter*'in varlığı bitkiden daha çok toprak özelliğinden de kaynaklanıyor olabilir.

Bitki rizosferlerinden izole edilen *Azotobacter* tür çeşitliliği bağlamında bitkilerle *Azotobacter* arasında ilişki kurulabilir. *Azotobacter* izole edilen bitki rizosferlerinden kereviz haricinde yalnızca bir *Azotobacter* türü izole edilmiştir. Mısır, yulaf, patates ve *Vicia villosa* rizosferlerinde *A. salinestrus*'e, buğday rizosferinden ise *A. chroococcum* olarak tanımlanmış izolatlar tespit edilmiştir. Yalnızca kereviz rizosferinden *A. chroococcum*, *A. salinestrus* ve *A. vinelandii* olarak belirlenen izolatlar elde edilmiş olması kereviz rizosferinin yüksek *Azotobacter* çeşitliliğine sahip olduğunu göstermektedir.

Kumar ve arkadaşlarının (2007) buğday ve pamuk bitkisi kök salgılarının *Azotobacter* üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında buğday ve pamuk bitkilerine yönelerek populasyon yoğunluğu artan *Azotobacter* izolatlarının farklı olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada farklı buğday ya da pamuk varyetelerinin dahi bu bitki rizosferlerindeki farklı *Azotobacter* izolatlarını etkilediği bildirilmiştir. Bu bağlamda kereviz ile *Azotobacter* hücreleri arasında pozitif bir ilişki olduğu önerilebilir.

Bu çalışmada *A. salinestris* ve *A. chroococcum* olarak tanımlanan izolatlar, *A. vinelandii* ve *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak belirlenen izolatlardan daha çok sayıda toprak örneğinden izole edilmiştir. Buna göre *A. vinelandii* ve *A. nigricans* subsp. *nigricans* dağılımının sınırlı olduğu görülmektedir. Genel olarak *A. chroococcum*'un yaygın olduğu, *A. vinelandii*'nin ise özellikle tropiklerde yaygın olduğu rapor edilmiştir (Kennedy vd 2005). Bu çalışmada örnek alınan topraklar arasında yalnızca kereviz ve golf çim sahasından *A. vinelandii* olarak tanımlanan izolatlar tespit edilmiştir. *A. salinestris* diğer *Azotobacter* türlerinden farklı olarak daha çok tuzlu habitatlardan izole edilmiştir (Page ve Shivprasad 1991, Wang vd 1993) ve bu türün bazı suşlarının tuza bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Kennedy vd 2005). Bu çalışmada *A. salinestris* olarak tanımlanan izolatların alındığı rizosferler tuzlu habitatlar değildir. Bu bağlamda bu izolatların tuza bağımlı olmayan suşlar olduğu düşünülebilir. *A. nigricans* subsp. *nigricans*'ın dağılımı ile ilgili bilgi sınırlıdır (Kennedy vd 2005). Bu çalışmada *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak belirlenen izolatlar yalnızca Manavgat-Demirciler merasından izole edilmiştir. Bu bağlamda bu türün dağılımını araştırmak için benzer alanların araştırılması önerilebilir.

Azot bağlayan mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemek için *nifH* genini hedefleyen mikroareyler geliştirilmiştir (Zhang vd 2006). Ancak bu uygulamalar genelde belirli mikroorganizmalardan daha çok örneklenen alandaki *nifH* genine sahip mikroorganizmaların hangi *nifH* grubu (Grup I-V gibi) mikroorganizmalar olduğunu ya da cins düzeyinde mikroorganizmaları belirlemeye yöneliktir. *Azotobacter* türlerinin, örneklerden doğrudan tanımlanması ile ilgili bir literatür olmamasına karşın *A. vinelandii* *nifH* geni esas alınarak tasarlanmış *nifH* primerleri kullanılarak kültürden bağımsız *Azotobacter* varlığı saptanabilmektedir (Ueda vd 1995, Lovell vd 2000, Soares

vd 2006). Ancak azot bağlayan mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemeye yönelik bu çalışmalarda kullanılan *nifH* primerleri türlere özgün değildir (Bürgmann vd 2004).

Bu çalışmada *nifH* geni NJ seç bağla ağacı üzerinde *A. vinelandii* olarak tanımlanan izolatların *nifH* geninin, diğer *Azotobacter nifH* genlerinden farklı gruplandığı görülmektedir. Sonuç olarak *A. vinelandii*'e ait *nifH* genlerini esas alarak tasarlanmış primer çiftleri ve PZR protokolleri toprak ya da diğer ekosistemlerden *Azotobacter* çeşitliliğini çalışmak için yetersiz kaldığı önerilebilir. Lovell ve arkadaşlarının (2000) yapmış oldukları çalışmada, *Spartina alterniflora* rizosferinden *Azotobacteraceae* familyasına ait üyeler izole edilmiş olmasına rağmen *Azotobacter*'e ait *nifH* genleri izole edilememiştir. Lovell ve arkadaşları (2000) bu durumu bitkinin rizosferinde *Azotobacter* bulunmasına karşın sayıca az olduğunu ifade ederek açıklamışlardır.

Bununla birlikte bu çalışmanın önerdiği gibi azot bağlayan bakterilerin çeşitliliğini belirlemek için kullanılan *nifH* primerlerinin *Azotobacter* türlerine ait izolatların tümünü yansıtamayacağını önermektedir. Bu bağlamda Soares ve arkadaşlarının (2000) önermiş olduğu açıklamaya ek olarak çalışmalarda kullanılan *nifH* genini hedefleyen primerlerin yetersiz olduğu önerilebilir.

NifH geni esas alınarak geliştirilen mikroarey çalışmaları hem azot bağlayan mikroorganizmaların kantitatif varlığını hem de mikroorganizmaların fonksiyonunu (mRNA düzeyinde) saptamaya yöneliktir (Zhang vd 2006, Moisaner vd 2006). Ancak bu sistemlerin yarı kantitatif olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde mRNA miktarlarının doğrudan mikroorganizmaların azot bağlama aktivitesini göstermediği ifade edilmiştir (Zhang vd 2006). Bürgman ve arkadaşları (2003) topraktan *A. vinelandii* tarafından ifade edilen *nifH* genin belirlenmesi için mRNA izolasyonu ve revers transkripsiyon-PZR protokolü geliştirmişlerdi. Bu çalışmada yalnızca *A. vinelandii*'nin bulunduğu topraktan farklı besin durumlarında (farklı karbon ve azot kaynakları) mRNA düzeyleri belirlenmiş olmasına karşın, mRNA'nın ifade edilmiş olması azot bağlanma aktivitesini doğrudan işaret etmediği görülmüştür. Sonuç olarak *nifH* genini esas alan azot bağlayan mikroorganizmaların tayini yaygın bir uygulamadır, ancak izole edilmiş ve tanımlanmış

azot bağlayan bakterilerin *nifH* gen dizi verilerinin artırılması genin türe özgün tasarlanması ve aynı zamanda azot bağlayan mikroorganizmaların çeşitliliğini yansıtmasını sağlayabilir. Bu çalışmada belirlenen izolatların *nifH* gen dizileri bu çalışmalara katkı sağlayabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada Antalya bölgesinde bulunan farklı çayır-mera vejetasyonlarından (Elmalı-Eymir, İbradı-Eynif, Akseki-Çimi, Manavgat-Demirciler ve Merkez-Aşağıoba) ve tarlalardan (Korkuteli buğday, Belek mısır, Korkuteli yulaf, Altınova kereviz ve Altınova patates) ve Bolu mısır tarlasından farklı *Azotobacter* izolasyon yöntemleri (Brown, soil-past ve Burk besi ortamları) kullanılarak 45 *Azotobacter* izole edilmiş ve tanımlanmıştır. *Azotobacter* izolatları, 16S rRNA geninin dört farklı restriksiyon enzimleri (*RsaI*, *HhaI*, *HpaII* ve *FnuDII*) ile kesilmesini esas alan ARDRA ve 16S rRNA gen dizi analizine göre moleküler olarak karakterize edilmiştir. Bununla birlikte *Azotobacter* izolatlarının *nifH* genlerinde dizi analizi yapılarak *nifH* gen dizisine göre *Azotobacter* izolatları arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır. İzolatların *nifH* genleri *Azotobacter* cinsi *nifH* genlerine yüksek oranda benzemesine karşın *A. nigricans* subsp. *nigricans* ve *A. vinelandii* haricinde *Azotobacter* cinsini tür düzeyinde ayırmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan 265 bç uzunluğundaki *nifH* gen dizisi izolatlar arasındaki ilişkinin belirlenmesi için yetersiz kalmıştır.

Bu çalışmada beş farklı çayır-mera vejetasyonlarından alınan örnekler arasında Elmalı-Eymir ve İbradı-Eynif mera topraklarında *Azotobacter* tespit edilmemiştir. İzole edilmiş 45 izolatın beş'i *A. nigricans* subsp. *nigricans* olarak tanımlanmış ve yalnızca Manavgat-Demirciler merasından izole edilmiştir. *A. vinelandii* olarak saptanan 3 izolat Altınova kereviz tarlasından ve Belek golf çim sahasından izole edilmiştir. Merkez-Aşağıoba merası *Hordeum* sp. rizosferinden, Akseki Çimi yaylası toprağından, Altınova kereviz, Korkuteli buğday ve Bolu mısır tarlalarından toplam 19 izolat *A. chroococcum* olarak saptanmıştır. *A. salinestris* olarak belirlenmiş toplam 18 izolat Akseki Çimi yaylası *Vicea villosa* rizosferinden, Altınova Kereviz, Korkuteli yulaf, Altınova patates, Belek-mısır tarlalarından izole edilmiştir. Bu sonuçlara göre *A. nigricans* subsp. *nigricans* ve *A. vinelandii* türlerine ait izolatların sınırlı yayılış göstermekte olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte özellikle kereviz rizosferinden üç farklı *Azotobacter* türüne ait *A. chroococcum*, *A. salinestris* ve *A. vinelandii* olarak tanımlanan izolatların elde edilmesinden dolayı, kereviz rizosferinin *Azotobacter* çeşitliliği bakımından zengin olduğu belirlenmiştir.

Azotobacter izole edilen toprakların kimyasal özelliklerine göre *Azotobacter* dağılımında kalsiyum miktarının istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Kalsiyumun *Azotobacter* dağılımında birincil öneme sahip olup olmadığı gelecek çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerden örnekler toplanarak ve örnek sayısı artırılarak araştırılması bu alanda çalışanlara büyük katkı sağlayabilir.

Bu çalışmadan elde edilen *Azotobacter* izolatlarının tanımlanmasında ve gruplandırılmasında ARDRA metodunun ve bu çalışmada kullanılan dört farklı enzimin (*RsaI*, *HhaI*, *HpaII*, *FnuDII*) *Azotobacter* referans türlerinin ayırımında faydalı olduğu görülmüştür. Ancak, ARDRA metodu *A. vinelandii* ve *A. salinestris*'e ait izolatları gruplandırmakta yetersiz kalmıştır. Bununla birlikte, 16S rRNA gen dizi analizi *Azotobacter* türlerinin kesin tanısını sağlamıştır. Ancak hem ARDRA hem de 16S rRNA dizi analizi *Azotobacter* izolatları arasındaki farklılaşmayı göstermekte sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada analiz edilen *nifH* geni izolatların arasındaki farklılaşmayı sağlamadığı gibi yalnız *Azotobacter* ve *Azomonas* cinslerini ayırmıştır. Sonuç olarak *Azotobacter* türlerine ait izolatların çeşitliliğini incelemek için farklı moleküler çalışmaların katkısı araştırılabilir.

Bu çalışmada farklı bitki rizosferlerinden örnekler alınmıştır. Bunlar arasında yalnızca kereviz rizosferinde *Azotobacter* çeşitliliğinin yüksek olması gelecek çalışmalarda kereviz ve *Azotobacter* arasındaki, olası bir ilişkinin araştırılması önerilebilir.

Azotobacter tarımsal ve endüstriyel önemi olan bir mikroorganizmadır. Bu çalışmadan elde edilen *Azotobacter*'ler gelecekte bitkilere olan etkisi ve tarımsal uygulamalara katkısının araştırılması için de bir alt yapı oluşturabilir. Benzer şekilde alginat gibi endüstriyel önemi olan moleküllerin bu bakteriler tarafından sentezlenme kapasiteleri de araştırılması önerilebilir.

7. KAYNAKLAR

- ADEKAMBI, T. and DRANCOURT, M. 2004. Dissection of phylogenetic relationship among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2095-2105.
- AHMAD, F., AHMAD, I. and KHAN, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbol. Res.*, 163: 173-181.
- AKAIKE, H. 1974. New look at statistical-model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control Ac*, 19: 716–723.
- ALBAYRAK, S., TÖNGEL, Ö., AYAN, İ. ACAR, Z. 2008. Nitrogen and phosphorous fertilizer improve pastures naturally growing under hazelnut trees. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Plant and Soil Science*, 58: 154-161.
- ALBERT, V.A. 2005. Parsimony, Phylogeny and Genomics. Oxford University press, 229 pp.
- ALEXANDER, M. and WILSON, P.W. 1956. Intracellular distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 71: 252-253.
- ANDERSON, A.J. and DAWES, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54: 450-472.
- ANDRONOV, E.E., TEREFEWORK, Z., ROUMIANTSEVA, M.L., DZYUBENKO, N.I., ONICHTCHOUK, O.P., KURCHAK, O.N., DRESLER-NURMI, A., YOUNG, J.P.W., SIMAROV, B.V. and LINDSTROM, K. 2003. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (2): 1067-1074.
- ARCAK, S. ve GÜDER, N. 2004. Biyolojik gübrelemenin sürdürülebilir ekosistemdeki önemi. Türkiye 3. Ulusal Gübre Kongresi, Tarım-Sanayi- Çevre, kongre kitapçığı, ss. 837-444, Tokat.
- ATALAN, E. 2001. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP) of some *Streptomyces* strains from soil. *Turk. J. Biol.*, 25: 397-404.

- AQUILANTI, L., FAVILLI, F. and CLEMENTI, F. 2004a. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1475-1483.
- AQUILANTI, L., MANNAZZU, I., PAPA, R., CAVALCA, L. and CLEMENTI, F. 2004b. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 57: 197-206.
- BAGWELL, C.E. and LOVELL, C.R. 2000. Persistence of selected *Spartina alterniflora* rhizoplane diazotrophs exposed to natural and manipulated environmental variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4625-4633.
- BALABANLI, C., TÜRK, M. ve YÜKSEL, O. 2005. Erozyon ve çayır-mera ilişkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2: 23-34.
- BALDANI, J.I. and BALDANI, V.L.D. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 77: 549-579
- BARABASZ, W., ALBINSKA, D., JASKOWSKA, M., LIPIEC, J. 2002. Biological effects of mineral nitrogen fertilization on soil microorganisms. *Pol. J. Environ. Stud.*, 11 (3): 193-198.
- BECKING, J.H. 1992. The family *Azotobacteraceae*. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (Editors). The prokaryotes. A hand book on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation identification, applications. Vol: 4, 2nd edition, Springer, pp. 3144-3170, Berlin Heidelberg NewYork.
- BETANCOURT, D.A., LOVELESS, T.M., BROWN, J.W. and BISHOP, P.E. 2008. Characterisation of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases isolated from diverse natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3471-3480.
- BHATIA, R., RUPPEL, S. and NARULA, N. 2008. Diversity studies of *Azotobacter* spp. from cotton-wheat cropping systems of India. *J. Basic. Microbiol.*, 48: 1-9.
- BISHOP, P.E. 1986. A second nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Trends in Biochemical Sciences*, 11: 225-227.

- BISHOP, P.E. and JOERGER R.D. 1990. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.*, 41: 109-125.
- BORMANN, E.J., LEISSNER, M., BEER, B. 1998. Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 84-88.
- BÜRGMANN, H., WIDMER, F., SIGLER, W.V. and ZEYER, J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 240-247.
- BÜRGMANN, H., WIDMER, F., SIGLER, W.V. and ZEYER, J. 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression of *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1928-1935.
- BYROM, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. *Trends. Biotechnol.*, 5: 246-250
- CANNON, F.C. and POSTGATE, J.R. 1976. Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. *Nature* (London), 260: 271-272.
- CANTERA, J.J.L., KAWASAKI, H. and SEKI, T. 2004. The nitrogen fixing gene (*nifH*) of *Rhodopseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer? *Microbiol.*, 150: 2237-2246.
- CEBEL, N. 2004. Mikrobiyal gübreler. Türkiye 3. Ulusal Gübre Kongresi, Tarım-Sanayi - Çevre, kongre kitapçığı, ss. 845-852, Tokat.
- CHELO, I.M., ZE-ZE, L. and TENREIRO, R. 2007. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 276-286.
- CLARRIDGE, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17 (4): 840-862.

- CLEGG, C.D. 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Appl. Soil Ecol.*, 31: 73–82.
- COELHO, M.R.R., VON DER WEID, I., ZAHNER, V. and SELDIN, L. 2003. Characterization of nitrogen fixing *Paenibacillus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of part of genes encoding 16S rRNA and 23S rRNA and multilocus enzyme electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 222: 243-250.
- CORNISH, A.S. and PAGE, W.J. 1998. The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: Their affinity for iron and role in oxygen stress management, *Microbiol.*, 144: 1747-1754.
- CRACRAFT, J. and HELM-BYCHOWSKI, K. 1991. Parsimony and Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: Some Methodological Strategies. In: M.M. Miyamoto and J. Cracraft (Editors), *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*, Oxford University Press, pp.183-220, New York.
- DANCE, I. 2007. Elucidating the coordination chemistry and mechanism of biological nitrogen fixation. *Chem. Asian J.*, 2: 936-946.
- DE ALBUQUERQUE, J.P., DE MOTA, F.F., VON DER WEID, I., SELDIN, L. 2006. Diversity of *Paenibacillus durus* strains isolated from soil and different plant rhizospheres evaluated by ARDRA and gyrB-RFLP analysis. *Eur. J. Soil Biol.*, 42: 200-207.
- DE BRUIJN, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2180-2187.
- DE MATTOS, K.A., DE OLIVEIRA, F.D.B. 1997. Isolation and characterization of *Azotobacter* strains from Brazilian soils. *Revista De Microbiologia*, 28 (4): 252-255.
- DICKERMAN, B., METZGER, J. and LEE, W.T. 2006. Molecular identification of *Aeromonas* and coliform bacteria isolated on Endomedia from Lake Erie waters. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 29–33.

- DILWORTH, M.J. and PARKER, C.A. 1961. Oxygen inhibition of respiration in *Azotobacter*. *Nature* (London), 191: 520-521.
- DIXON, R. 1998. The oxygen-responsive *nifL-nifA* complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. *Arch. Microbiol.*, 169: 371-380.
- DORAN, J., BINGLE, W.H. and PAGE, W.J. 1987. Role of calcium in assembly of the *Azotobacter vinelandii* surface array. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 399-413.
- DRAGET, K.I., SKJAK-BRAEK, G. and SMIDSROD, O. 1997. Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.*, 21: 47-55.
- EADY, R.R. 1996. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.*, 96: 3013-3030.
- ELLIOTT, D.E. and ABBOTT, R.J. 2003. Nitrogen fertilizer use on rainfed pasture in the Mountain Lofty Ranges. 1. Pasture mass, composition and nutritive characteristics. *Aust. J. Exp. Agr.*, 43: 553-577.
- FAO. 2001. Global estimates of gaseous emissions of NH₃, NO and N₂O from agricultural land. Rome, Rapor.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376.
- FELSENSTEIN, J. 1990. PHYLIP Manual, Version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkeley.
- GALLOWAY, J.N., DENTENER, F.J., CAPONE, D.G., BOYER, E.W., HOWARTH, R.W., SEITZINGER, S.P., ASNER, G.P., CLEVELAND, C.C., GREEN, P.A., HOLLAND, E.A., KARL, D.M., MICHAELS, A.F., PORTER, J.H., TOWNSEND, A.R. and SMARTY, C.J. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70: 153-226.
- GIERUS, M., JAHNS, U., WULFES, R., WIERMANN, C. and TAUBE, F. 2005. Forage quality and yield increments of intensive managed grassland in response to combined sulphur-nitrogen fertilization. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B Soil Plant Science*, 55: 264-274.
- GOLEBIEWSKA, J. and PEDZIWIŁK, Z. 1975. Variation in the *Azotobacter* population from several habitats in the botanical garden in Poznan. *Acta. Microbiol. Pol.*, 7 (4): 219-22.

- GONZALEZ-LOPEZ, J., SALMERON, V., MARTINEZ-TOLEDO, M.V., BALLESTEROS, F., RAMOS-CORMENZANA, A. 1986. Production of auxins, Gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. *Soil Biol. Biochem.*, 18: 119–120.
- GORIN, G.T. and SPENCER, J.F.T. 1966. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Chem.*, 44: 993-998.
- GÜLEÇ, H. ve DERİCİ, M.R. 2004. Tarımsal sistemde potansiyel azot kaybı. Türkiye 3. Ulusal Gübre Kongresi, Tarım-Sanayi- Çevre, kongre kitapçığı, ss. 673-684, Tokat.
- GÜLEÇ, H. ve KARAMAN, M.R. 2004. Tarımsal sistemde potansiyel azot kazancı ve azot dengesi. Türkiye 3. Ulusal Gübre Kongresi, Tarım-Sanayi- Çevre, kongre kitapçığı, ss. 663-672, Tokat.
- HALL, B.G. 2005. Phylogenetic trees made easy. Sinauer associates, Publishers Sunderland Massachusetts US, 220 pp.
- HALLEIB, C.M. and LUDDEN, P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.*, 130 (5): 1081-1084.
- HAMELIN, J., FROMIN, N., TARNAWSKI, S., TEYSSIER-CUVELLE, T. and ARAGNO, M. 2002. *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. *Environ. Microbiol.*, 4 (8): 477–481.
- HAUKKA, K., LINDSTRON, K. and YOUNG, P. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 419-426.
- HANNULA, M. and HANNINEN, M.L. 2007. Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 444-449.
- HAYNES, R.J. and WILLIAMS, P.H. 1993. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Plant Adv. Agron.* 49: 119–199.

- HENNECKE, H., KALUZA, K. and THONY, B. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S ribosomal-RNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.*, 142 (4): 342-348.
- HERRIDGE, D.F., PEOPLES, M.B., BODDEY, R.M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311: 1–18
- HEYNDRICKX, M., VAUTERIN, L., VANDAMME, P., KERSTERS, K., DE VOS, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods.*, 26: 247-259.
- HOPKINS, A. and HOLZ, B. 2006. Grassland for agriculture and nature conservation: production, quality and multi-functionality. *Agronomy Research*, 4: 3-20.
- HUTSCH, B.W., AUGUSTIN, J., MERBACH, W. 2002. Plant rhizodeposition - an important source for carbon turnover in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 165: 397-407.
- IRUTHAYARAJ, M.R. 1981. Let *Azotobacter* supply nitrogen to cotton. *Intensive Agriculture*, 19: 23.
- IZQUIERDO, J.A. and NÜSSLEIN, K. 2006. Distribution of Extensive *nifH* Gene Diversity Across Physical Soil Microenvironments. *Microbiol. Ecol.*, 51: 441–452.
- JACKSON, R.M., BROWN, M.E. and BURLINGHAM, S.K. 1964. Similar effect on tomato plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibbrellins. *Nature*, 203: 851-852.
- JAKOBSONS, A., ZELL E.A. and WILSON, P.W. 1962. A reinvestigation of the calcium requirement of *Azotobacter vinelandii* using purified media. *Arch. Microbiol.*, 41: 1-10.
- JANA, S.C. CHAKRABARTTY, P.K. and MISHRA, A.K. 1992. Taxonomic relationship of some members of *Azotobacteraceae* based on their protein profiles. *J. Basic Microbiol.*, 32 (1): 29-33.
- JANA, S.C. 1994. Isoenzyme profiles in *Azotobacteraceae*. *J. Basic Microbiol.*, 34 (1): 31-35.
- JANZEN, H.H., BEAUCHEMIN, K.I., BRUINSMA, Y., CAMPBELL, C.A., DESJARDINS, R.L., ELLERT, B.H. and SIMITH, E.G. 2003. The fate of

- nitrogen in agroecosystems: An illustration using Canadian estimates. *Nutr. Cycling in Agroecosystems*, 67: 85-102.
- KADOURI, D., JURKEVITCH, E. and OKON, Y. 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit. Rev. Microbiol.*, 31: 55-67.
- KANUNGO, P.K., RAMAKRISHNAN, B., RAO, V.R. 1997. Placement effect of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria in flooded rice soils. *Biol. Fert. Soils*, 25: 103-108
- KARAŞAHİN, H. 1995. Yurdumuzda Mera Sorunları. Standart Çevre, ss. 84-87, Ankara.
- KARGI, F. and OZMIHCI, S. 2004. Batch biological treatment of nitrogen deficient synthetic wastewater using *Azotobacter* supplemented activated sludge. *Bioresource Technology*, 94: 113-117
- KENNEDY, C. and ROBSON, R. 1983. Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum* by the *nifA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London), 301: 626-628.
- KENNEDY, C. 2000. The rhizosphere association of the nitrogen fixing bacterial species *Azotobacter paspali* with the tropical grass *Paspalum notatum*: Specificity of colonization and contribution to plant nutrition. Teknik Rapor, (S142, 500) 7/1/95-2/14/97, Tucson, USA.
- KENNEDY, C. and RUDNICK, P. 2005. Genus II. *Azomonas* Winogradsky 1938, 391AL. In N.R. Krieg, J.T., Staley and G.M. Garrity (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology-The Proteobacteria*, 2nd edn, vol. 2, part B, Springer, pp. 379-384, Newyork.
- KENNEDY, C., RUDNICK, P. MACDONALD, M.L. and MELTON, T. 2005. Genus III, *Azotobacter Beijerinck* *Azotobacter Beijerinck* 1901. In N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology-The Proteobacteria*, 2nd edn, vol. 2, part B, Springer, pp. 384-402, Newyork.
- KIRCHMANN, H. and WITTER 1992. Composition of fresh, aerobic and anaerobic farm animal dungs. *Bioresour. Technol.*, 40: 137-142.

- KIZILOĞLU, F.T. ve BİLEN, S. 2004. Toprakta ve yaprakta uygulanan azotlu gübreleme ve *Azotobacter* sp. izolatu ile aşılamının buğday bitkisinin kuru madde miktarı ve toplam azot içeriği üzerine etkisi. Türkiye 3. Ulusal Gübre Kongresi, Tarım-Sanayi- Çevre, kongre kitapçığı, ss. 945-958, Tokat.
- KIZILKAYA, R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J. Environ. Biol.*, 30: 73-82.
- KIZILKAYA, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering*, 33: 150-156.
- KNOWLES, R. 1982. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. In: A.L. Page, R.H. Miller, D.R. Keeney (Editors), *Methods of Soil Analysis Part 2*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- KOLE, M.M., PAGE, W.J. and ALTOSAAR, I. 1988. Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can. J. Microbiol.*, 34: 815-817.
- KRASILNIKOV, N.A. 1949. Guide to the bacteria and actinomycetes. *Academii Nauk SSSR*, Moscow.
- KRASILNIKOV, N.A. 2009. Distribution of microorganisms in soil. <http://www.soilhealth.org/01aglibrary/010112Krasil/010112krasil.ptIV.3.html>.
- KUMAR, V. and NARULA, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, 28 (3): 301-305 .
- KUMAR, R., BHATIA, R., KUKREJA, K., BEHL, K.R., DUDEJA, S.S. and NARULA, N. 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Basic Microbiol.*, 47: 436–439.
- LAKSHMI, P., LEE, S.H. and GAVINI, N. 2002. Genome of *Azotobacter vinelandii*: counting of chromosomes by utilizing copy number of a selectable genetic marker. *Genetica*, 115: 147-158.

- LAWRENCE, J.G. and OCHMAN, H. 1998. Molecular archaeology of *Escherchia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 4: 9413-9417.
- LAYNE, J.S. and JOHNSON, E.J. 1964. Natural factors involved in the induction of cyst formation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.*, 87: 684-689.
- LEDGARD, S.F. 2001. Nitrogen cycling in low input legume with emphasis on legume/grass pastures. *Plant Soil*, 228: 43–59.
- LEE, S.B. and BURRIS, R.H. 1943. Large scale production of *Azotobacter*. *Industr. Ind. Eng. Chem.*, 35: 112-121.
- LOVELL, C.R., PICENO, Y.M., QUATTRO, J.M. and BAGWELL, C.E. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (9): 3814–3822.
- LOVELESS, T. M. and BISHOP, P.E. 1999. Identification of genes unique to Mo-independent nitrogenase systems in diverse diazotrophs. *Can. J. Microbiol.*, 45: 1-6.
- MACDONALD, M. and MELTON, M. 1996. The organization and copy number of the rRNA genes of *Azotobacteracea*, abstr. H-24, p487. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO J.M. and PARKER, J. 2000. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 986 pp.
- MANNA, A.C. and DAS, H.K. 1994. The size of the chromosome of *Azotobacter chroococcum*. *Microbiol.*, 146: 1237–1239.
- MARTINEZ-TOLEDO, M.V., GONZALEZ-LOPEZ, J., DE LA RUBIA, T. and RAMOS-CORMENZANA, A. 1985. Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31: 197–203.
- MARTYNIUK, S. and MARTYNIUK, M. 2003. Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Pol. J. Environ. Stud.*, 12: 371-374.
- MEHROTRA, C.L. and LEHRI, C.K. 1971. Effect of *Azotobacter* inoculation on crop yields. *Journal Indian Society of Soil Science*, 19: 243-248.
- MEZEI, S., POPOVIV, M., KOVA-EV L., MRKOVA-KI, N., NAGL, N., MALEN D.

- 1997/1998. Effect of *Azotobacter* strains sugar beet callus proliferation and nitrogen metabolism enzymes. *Biol. Plantarum*, 40: 277-283.
- MIYAMOTO, M.M. and CRACRAFT, J. 1991. Pylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford University press, 358 pp.
- MOISANDER, P.H., SHIUE, L., STEWARD, G.F., JENKINS, B.D., BEBOUT, B.M., ZEHR, J.P. 2006. Application of a *nifH* oligonucleotide microarray for profiling diversity of N₂-fixing microorganisms in marine microbial mats *Environ. Microbiol.* 8: 1721-1735.
- MORENO, S., GUZMAN, J., NAJERA, R., SOBERON-CHAVEZ, G., ESPIN, G. 1998. Role of the alternative σ factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 180: 2766–2769.
- MRKOVACKI, N. and MILIC, V. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Ann. Microbiol.*, 51: 145- 158.
- NARULA, N., KUMAR, V., BEHL, R.K., DEUBEL, A., GRANSEE, A., MERBACH, W. 2000. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 163: 393-398.
- NARULA, N., REMUS, R., DEUBEL, A., GRANSEE, A., DUDEJA, S.S., BEHL, R. K., MERBACH, W. 2007. Comparison of the effectiveness of wheat roots colonization by *Azotobacter chroococcum* and *Pantoea agglomerans* using serological techniques. *Plant Soil Environ.*, 53 (4): 167-76.
- NEI, M. and LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 5269-5273.
- NIETO, K.F., FRANKENBERGER, W.T. 1989. Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil. Biol. Biochem.*, 21: 967–972.
- NIEWOLAK, S. 1972. Fixation of atmospheric nitrogen by *Azotobacter* species and other heterotrophic oligonitrophilous bacteria in Hawa lakes. *Acta Hydrobiologica*. 14: 287-305.
- OKUYUCU, B.B. ve OKUYUCU, F. 2006. Çayır-Meralarda Organik Tarım Uygulamaları ve Yararları. *Hayvansal Üretim* 47 (1): 54-61.
- OLIVE, D.M. and BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (6): 1661-1669.

- ÖĞÜT, M., AKDAĞ, C., DÜZDEMİR, O. and SAKIN, M.A. 2005. Single and double inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: the effects on dry bean and wheat. *Biol. Fertil. Soils*, 41: 262-272.
- ÖZKAN, C.F. 1986. Topraklara perlit uygulamasının Azotobacterlerin aktivitesi ve biyolojik azot fiksasyonu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bornova, 69 ss.
- PAGE W.J. and SHIVPRASAD, S. 1991. *Azotobacter salinestris* sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41(3): 369-376.
- PAUL, E.A. and CLARK, F.E. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- PENA, C., TRUJILLO-ROLDAN, M.A., GALINDO, E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microbiol. Tech.*, 27 (6): 390-398.
- PETERSON, J.B. 1992. Dependence of oxygen-tolerant nitrogenase activity on divalent of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 168: 752-755.
- PEYRAUD, J.L. and DELABY, L. 2006. Grassland management with emphasis on nitrogen flows. In: A. Elgersma, J. Dijkstra and S. Tamminga (Editors), Fresh Herbage for Dairy Cattle, Chapter 6, Springer, pp. 103-123, Netherlands.
- PIAO, Z., CUI, Z., YIN, B., HU, J., ZHOU, C., XIE, G., SU, B., YIN, S. 2005. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biol. Fert. Soils*, 41: 371-378.
- PICENO, Y.M., NOBLE, P.A. and LOVELL, C.R. 1999. Spatial and temporal assesment od diazotroph assemblage composition in vegetated salt masrh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microbiol. Ecol.*, 38: 157-167.
- PINERO, D., MARTINEZ, E. and SELANDER, R.K. 1988. Genetic diversity and relationship among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2825-2832.

- POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIERE, F. and MONROZIER, L.J. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2255-2262.
- POSADA, D. and KRANDAL, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic*, 14: 817-818.
- RAI-EVIV, V., SARIV, M., SARIV, Z. and BOGDANOVIV, V. 1995. *Azotobacter* movement in maize root. In Proceedings of the 10th International Congress of nitrogen Fixation, St. Petersburg, Russia.
- RAMOS, A., BAREA, J.M. and CALLAO, V. 1972. A phosphate dissolving and nitrogen fixing microorganism and its possible influence on soil fertility. *Agrochimica*, 16: 345-350.
- RAMOS, F., BLANCO, G., GUTIERREZ, J.C., et al. 1993. Identification of an operon involved in the assimilatory nitrate-reducing system of *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.*, 8: 1145-1153.
- RANGARAJ, P., RUTTIMANN-JOHNSON, C., SHAH, V.K., LUDDEN, P.W. 2000. Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors of the *nif*- and *vnf*-encoded nitrogenases. In: E.W. Triplett (Editor). Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, pp. 55-79, Wymondham, UK.
- RAVIKUMAR, S. KATHIRESAN, K., THADEDUS, S., IGNATIAMMAL, T.M., SELVAM, M.B. and SHANTHY, S. 2004. Nitrogen fixing *Azotobacters* from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.*, 312: 5-17.
- RAYMOND, J., SIEFERT, J.L., STAPLES, C.R., et al. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.*, 21: 541-554.
- REES, D.C., TEZCAN, F.A., HAYNES, C.A., WALTON, M.Y., ANDRADE, S., EINSLE, O. and HOWARD, J.B. 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 363: 971-984.
- REIDERS, H. VANDERLEYDEN, J. and De MOT, R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiol.*, 150: 1117-1119.
- REVILLAS, J.J., RODELAS, B., POZO, C., MARTINEZ-TOLEDO, M.V. and GONZALEZ LOPEZ, J. 2000. Production of B-group vitamins by two

- Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic adiazotrophic conditions. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 486–493.
- ROBSON, R.L., CHESSHIRE, J.A., WHEELER, C., JONES, R., WOODLEY, P.R., POSTGATE, J.R. 1984. Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, 130 (7): 1603–1612.
- ROTZ, C.A., TAUBE, F., RUSSELLE, M.P., OENEMA, J. SANDERSON, M.A. and WACHENDORF, M. 2005. Whole-Farm Perspectives of Nutrient Flows in Grassland Agriculture. *Crop Sci.*, 45 (6): 2139-2159.
- ROY, R.N., MISRA, R.V and MONTANEZ, A. 2002. Decreasing reliance on mineral nitrogen – yet more food. *Ambio*, 30 (2): 177-183.
- RÖSCH, C., MERGEL, A. and BOTHE, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3818-3829.
- RUIZ, A., POBLET, M., MAS, A. and GUILLAMON, J.M. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1981-1987.
- RYU, E. 1938. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Jpn. Soc. Vet. Sci.*, 17: 31.
- SAHIN, N. 2005. Isolation and characterization of a diazotropic, oxalate-oxidizing bacterium from sour grass (*Oxalis pes-caprae* L.). *Res. Microbiol.*, 156: 452-456
- SAITOU, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*, 24: 189-204.
- SALANTUR, A., OZTURK, A., AKTEN, S., SAHIN, F. and DONMEZ, F. Effect of inoculation with non-indigenous and indigenous rhizobacteria of Erzurum (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. *Plant and Soil*, 275: 147-156.
- SARIV, Z., MILIV, V., JARAK, M. and GOVEDARICA, M. 1983. Effect of organic residues on microbiological changes and fertility of soil. *Annals of Scientific Work at the Faculty of Agriculture*, 13: 147-165.
- SNEATH, P.H.A. and SOKAL, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.

- SOARES, R.A., ROESCH, L.F.W., ZANATTA, G., DE OLIVEIRA CAMARGO, F.A., PASSAGLIA, L.M.P. 2006. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Appl. Soil Ecol.*, 33: 221–234.
- SOCOLOFSKY, M.D. and WYSS, O. 1961. Cysts of *Azotobacter*. *J. Bacteriol.*, 81: 946-954.
- SOCOLOW, R.H. 1999. Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 6001-6008.
- SOLIMAN, S., SEEDA, M.A., ALY, S.S.M., GADALLA, A.M. 1995. Nitrogen fixation by wheat plants as affected by nitrogen fertilizer levels and non symbiotic bacteria. *Egyptian Journal of Soil Science*, 35 : 401-413.
- SPIERS, A., BUCKLING, A. and RAINEY, P.B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.*, 146: 2345-2350.
- STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G.M., GRIMONT, P.A.D., KAMPFER P., MAIDEN, M.C.J., NESME, X., ROSSELLO-MORA, R., SWINGS, J., TRUPER, H.G., VAUTERIN, L., WARD, A.C. and WHITMEN W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1043–1052.
- STALEY, T.E. and COLWELL. 1973. Application of molecular genetics and numerical taxonomy to the classification of bacteria. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 4: 273- 300.
- STALEY, J.T. 2001. Microbiological perspective of biodiversity. In: J.T. Staley, A.L. Reysenbach (Editors), *Biodiversity of microbial life 'Foundation of Earth's Biosphere'*, pp. 552, Willey-Liss.
- SUDAGIDAN, M., YENIDUNYA, A.F. and GUNES, H. 2005. Identification of *Staphylococci* by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J. Med. Microbiol.*, 54: 823–826.
- SULAK, M. ve AYDIN, İ. 2005. Yem bitkilerinde nitrat birikmesi. *J. Fac. Agric., OMU*, 20 (2): 106-109.
- SWOFFORD, D. L. 2002. *PAUP** Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). v. 4.0 beta. Sunderland, M. A: Sinauer Associates.
- THOMPSON, J.P. and SKERMAN, V.B.D. 1979. *Azotobacteriaceae* : the Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen Fixing Bacteria. London, Academic Press.

- TOKMAK, S. 1995. Kumluca ve Finike yörelerinde tarımda kullanılan azotlu gübrelerin çevre kirliliğine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Antalya, 92 ss.
- TRIPATHY, P.P. and AYYAPPAN, S. 2005. Evaluation of *Azotobacter* and *Azospirillum* as biofertilizer in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotech.*, 21: 1339-1343.
- UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N. and MATSUGUCHI, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.*, 177: 1414–1417
- VARGAS-GARCIA, M.C., LOPEZ, M.J., ELORRIETA, M.A., SUAREZ, F. and MORENO, J. 2003. Properties of polysaccharide produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 388-395.
- WANG, T.H., TCHAN., Y.T., ZEMAN, A.M.M. and KENNEDY, I.R. 1993. Presence of sodium dependent *Azotobacter* in Australia (New-South-Wales). *Soil Biol. Biochem.*, 25 (5): 637-639.
- WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A. and LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697–703.
- WEST, C.P. and A.P. MALLARINO. 1996. Nitrogen transfer from legumes acid to grass. In: R.E. Joost and C.A. Roberts (Editors) cycling in forage systems symposium. Vol. 1., Columbia MO. Potash and Phosphate Institute and Foundation for Agronomic Research, pp. 167–175 Manhattan, KS.
- WIDMER, F., SHAFFER, B.T., PORTEOUS, L.A. and SEIDLER, R.J. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 374-380.
- WOESE, C.R., STACKEBRANDT, E., MACKE, T.J. and FOX, G.E. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 143-151.
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.

- WOLLUM, A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney (Editors), *Methods of Soil Analysis part II*, American Society of Agronomy, pp. 1159. Madison.
- WONG, T.Y. 1993. Effects of Calcium on Sugar Transport in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (1): 89-92.
- YAMAMOTO, S. and HARAYAMA, S. 1995. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 813-819.
- YANNI, Y.G. and EL-FATTAH, F.K.A. 1999. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. *Symbiosis*, 27: 319-331.
- YATES, M.G., DE SOUZA, E.M. and KAHINDIS, J.H. 1997. Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 863-869.
- YOUATT, J. 1993. Calcium and microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.*, 19 (2): 83-97
- YOUNG, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G. Stacey, R.H. Burris and H.J. Evans (Editors), *Biological nitrogen fixation*, Chapman and Hall, pp. 43-86, New York, N.Y.
- YOUNG, J.M. and PARK, D-C. 2007. Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2894-2901.
- ZEHR, J.P., JENKINS, B.D., SHORT, S.M. and STEWARD, G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.*, 5: 539-554.
- ZEZE, A., MUTCH, L.A. and YOUNG, J.P.W. 2001. Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.*, 3 (6): 363-370.
- ZHANG, Y., LI, D., WANG, H., XIAO, Q. and LIU, X. 2006. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260: 134-142.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru ÇELEN 1975 yılında Bolu'da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Bolu'da tamamladı. 1993 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1997 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 1999-2002 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2002 Yılında aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. 1999 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru ÇELEN 1975 yılında Bolu'da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Bolu'da tamamladı. 1993 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1997 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 1999-2002 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2002 Yılında aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. 1999 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.