

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MOR KÜKÜRTSÜZ BAKTERİLERİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ
***ARABIDOPSIS THALIANA* İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEHİYE NUR AKSOY

DENİZLİ, KASIM 2022

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



MOR KÜKÜRTSÜZ BAKTERİLERİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ
***ARABIDOPSIS THALIANA* İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEHİYE NUR AKSOY

DENİZLİ, KASIM 2022

**Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 2021FEBE055 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Behiye Nur AKSOY

ÖZET

**MOR KÜKÜRTSÜZ BAKTERİLERİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ
ARABIDOPSIS THALIANA İLE ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BEHİYE NUR AKSOY
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ CANER VURAL)**

DENİZLİ, KASIM 2022

Bu tez çalışmasında, Winogradsky kolonundan izole edilen mor kükürtsüz bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özelliklerinin belirlenmesi ve izolatların tuz stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh üzerindeki etkileri incelenmiştir. İzolatların azot fiksasyonu, fosfat çözündürme ve indol-3-asetik asit (IAA) üretimi için elde edilen en yüksek değerleri sırasıyla; 4,21 mg/L, 340 mg/L, 2,58 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca, tüm izolatların 5-Aminolevulinik asit (ALA) üretim potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA dizi analizlerine göre tüm izolatların *Rhodobacter* cinsi üyeleriyle %99 benzerlik oranına sahip oldukları saptanmıştır. Tuz stresi altındaki *A. thaliana*'da RD29A, RD29B, LOX2, APX2, SOS1 ve GLYI7 genlerinin ifade düzeyleri incelenmiş ve mor kükürtsüz bakteri ile 150 mM NaCl eklenen bitkide ilgili genlerde sırasıyla 2,174; 0,07; 1,394; 0,611; 0,02; 0,62 kat artış olduğu gözlenmiştir. Mor kükürtsüz bakteri aşılana ve 150 mM tuz eklenen bitkideki yaprak boyutlarında artış olduğu ve yeni yaprakların oluştuğu gözlenmiştir. Deney sonunda, klorofil miktarları kontrol bitkisinde 1,03 mg/g yaş ağırlık, mor kükürtsüz bakteri ve 150 mM tuz ilave edilen bitkide ise 1,18 mg/g yaş ağırlık olarak belirlenmiştir. Her 48 saatte bir topraktan alınan örneklerden dehidrogenaz aktivite ölçümleri yapılmıştır ve süreç içerisinde mor kükürtsüz bakteri içeren toprak için sırasıyla 8,67; 19,18; 20,39; 20,09 µg/g, mor kükürtsüz bakteri ile 150 mM NaCl içeren toprak için ise sırasıyla 16,84; 17,82; 19,94; 17,52 µg/g olarak belirlenmiştir. Real-Time PCR cihazı ile yapılan biyoizleme çalışmalarında, mor kükürtsüz bakteri ve 150 mM NaCl eklenen bitki için toplam bakteri miktarı deney sonunda $2,75 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g, toplam mor kükürtsüz bakteri miktarı ise $6,92 \times 10^5$ kopya DNA/10 g olarak hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Mor kükürtsüz bakteriler, *Arabidopsis thaliana*, tuz stresi, Real-Time PCR, gen ifadesi, biyoizleme

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF PURPLE NON-SULFUR BACTERIA WITH *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER SALT STRESS

MSC THESIS

BEHİYE NUR AKSOY

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. CANER VURAL)

DENİZLİ, NOVEMBER 2022

In this thesis, the determination of plant growth-promoting properties of purple non-sulfur bacteria isolated from the Winogradsky column and the effects of isolates on *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh under salt stress were investigated. The highest values obtained for nitrogen fixation, phosphate solubilization, and indole-3-acetic acid (IAA) production of the isolates are respectively; 4.21 mg/L, 340 mg/L, 2.58 µg/mL. In addition, it was determined that all isolates have 5-Aminolevulinic acid (ALA) production potential. By 16S rRNA sequence analysis, it was determined that all isolates had a 99% similarity rate with members of the Rhodobacter genus. According to 16S rRNA sequence analysis, it was determined that all isolates had a 99% similarity rate with members of the genus Rhodobacter. The expression levels of RD29A, RD29B, LOX2, APX2, SOS1, and GLYI7 genes in *A. thaliana* under salt stress were examined, and it was observed that the related genes were a fold increase of 2.174, 0.07, 1.394, 0.611, 0.02 and 0.62, respectively. An increase in leaf sizes and new leaf formation was observed for the plant which added the purple non-sulfur bacteria. At the end of the experiment, the amount of chlorophyll was determined as 1.03 mg/g wet weight in the control plant, and 1.18 mg/g wet weight for the plant which added the purple non-sulfur bacteria and 150 mM NaCl. Measurements of dehydrogenase activity were done from the samples taken from the soil every 48 hours, and during the process, it was determined as 8.67, 19.18, 20.39 and 20.09 µg/g for the soil containing purple non-sulfur bacteria and 16.84, 17.82, 19.94 and 17.52 µg/g for the soil containing purple non-sulfur bacteria and 150 mM NaCl, respectively. The amount of total bacterial was calculated as 2.75×10^{10} copy DNA/10 g for the plant which added the purple non-sulfur bacteria and 150 mM NaCl, and the total amount of purple non-sulfur bacteria was calculated as 6.92×10^5 copy DNA/10

g with the biomonitoring studies by the Real-Time PCR device at the end of the experiment.

KEYWORDS: Purple non-sulfur bacteria, *Arabidopsis thaliana*, salt stress, Real-Time PCR, gene expression, biomonitoring

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1 Topraktaki abiyotik stres hakkında genel bir bakış.....	3
2.2 <i>A. thaliana</i>	4
2.3 Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler	7
2.4 Bitki büyümesini etkileyen mekanizmalar	8
2.5 Mor Bakteriler	12
2.5.1 Mor Kükürtsüz Bakterilerin Biyoteknolojik Uygulamaları.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1 GEREÇLER	18
3.2 YÖNTEM.....	20
3.2.1 Winogradsky kolonunun oluşturulması	24
3.2.2 Winogradsky kolonunda gelişen mor bakterilerin uygun besiyerinde üretimi ve saflaştırılması	25
3.2.3 İzolatların azot fiksasyonu yeteneklerinin belirlenmesi	26
3.2.4 İzolatların fosfat çözme yeteneklerinin belirlenmesi.....	26
3.2.5 İzolatların 5-Aminolevulinik asit (ALA) üretim potansiyellerinin belirlenmesi.....	27
3.2.6 İzolatların indol-3-asetik asit (IAA) üretim potansiyelinin belirlenmesi..	27
3.2.7 İzolatlardan genomik DNA izolasyonu	28
3.2.8 İzolatların genomik DNA'larının <i>in vitro</i> çoğaltılması	29
3.2.9 Agaroz jel elektroforezi ve PCR ürün kontrolü	30
3.2.10 PCR ürününün temizlenmesi	31
3.2.11 İzolatların DNA'larının dizilenmesi ve filogenetik ağaç oluşturulması.	31
3.2.12 <i>A. thaliana</i> büyütülmesi.....	32
3.2.13 <i>A. thaliana</i> rizosferine bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması	32

3.2.14	Toprakta mikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	33
3.2.15	<i>A. thaliana</i> yapraklarından toplam klorofil miktarının belirlenmesi ve kök uzunluklarının ölçülmesi.....	34
3.2.16	<i>A. thaliana</i> 'dan toplam RNA izolasyonu.....	35
3.2.17	Ters Transkriptaz PCR.....	36
3.2.18	Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile tuz stres genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi.....	36
3.2.19	Bitki rizosferinde bulunan mor kükürtsüz bakterilerin Real-Time PCR ile biyoizlemesi	38
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1	Mor kükürtsüz bakterilerin izolasyonu için Winogradsky kolonunun oluşturulması	41
4.2	Winogradsky kolonunda üreyen bakterilerin saflaştırılması ve morfolojik olarak belirlenmesi	42
4.3	İzolatların azot fiksasyonu kabiliyetlerinin belirlenmesi	44
4.4	İzolatların fosfat çözündürme kabiliyetlerinin belirlenmesi.....	46
4.5	İzolatların 5-Aminolevulinik asit (ALA) üretim potansiyellerinin belirlenmesi.....	48
4.6	İzolatların indol-3-asetikasit (IAA) üretim potansiyelinin belirlenmesi	49
4.7	İzolatların moleküler biyolojik olarak tanılanması.....	52
4.8	<i>A. thaliana</i> bitkisinin büyütülmesi	54
4.9	<i>A. thaliana</i> rizosferine bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması	54
4.10	Topraktaki mikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	55
4.11	<i>A. thaliana</i> 'dan elde edilen toplam klorofil miktarı	57
4.12	<i>A. thaliana</i> kök ve yaprak ölçümü.....	60
4.13	<i>A. thaliana</i> 'da tuz stres genlerinin ifade düzeylerinin araştırılması	68
4.14	Bitki rizosferinde mor kükürtsüz bakterilerin biyoizlemesi	71
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	76
6.	KAYNAKÇA.....	78
7.	ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.: <i>A. thaliana</i> Columbia (Col)'nın yaşam döngüsü.....	5
Şekil 2.: <i>A. thaliana</i> ve ortak atadan gelen türlerin bir alt kümesi	6
Şekil 3.: Azot fiksasyonu sırasında bakteri hücresi ve bitki arasındaki etkileşimin şematik gösterimi	9
Şekil 4.: İndol-3-asetik asit, triptofan ve asetoin biyosentezinde yer alan bakteriyel metabolik yollar	10
Şekil 5.: Etilen stresi altındaki bitkilerde bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin etkisini gösteren şema.....	11
Şekil 6.: Mor kükürtsüz bakterin fotoheterotrofi ve fotoototrofi yolları	14
Şekil 7.: Mor kükürtsüz bakterilerin metabolik yolları.....	17
Şekil 8.: Oluşturulan Winogradsky kolonunun birinci gün görseli	41
Şekil 9.: Winogradsky kolonunun 42. gün görseli.....	42
Şekil 10.: Nutrient agar besiyerinde üreyen izolatlar	43
Şekil 11.: İzolatların ışık mikroskobu altındaki 100x görüntüsü.....	43
Şekil 12.: İzolatların GA besiyerindeki görüntüleri.....	48
Şekil 13.: İzolatların Erhlich reaktifi eklendikten sonraki görüntüleri.....	49
Şekil 14.: IAA üretim potansiyeli için oluşturulan standart eğri grafiği	49
Şekil 15.: IAA üretim potansiyeli sonuçlarının grafiği	50
Şekil 16.: İzolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	53
Şekil 17.: Çalışmamıza ait 16S rRNA sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaç	53
Şekil 18.: <i>A. thaliana</i> bitkisi (A) bitkilerin bir haftalık görüntüsü (B) bitkilerin 39. gün görüntüsü.....	54
Şekil 19.: <i>A. thaliana</i> bitkisinin farklı parametrelerdeki görselleri	55
Şekil 20.: Trifenil formazan standartı	56
Şekil 21.: Sadece mor kükürtsüz bakterileri inoküle edilen bitki toprağındaki mikrobiyal aktiviteyi gösteren grafik	57
Şekil 22.: Kontrol bitkisinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bıyık grafiği.....	61
Şekil 23.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bıyık grafiği..	62
Şekil 24.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için kutu bıyık grafiği	63
Şekil 25.: 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bıyık grafiği	63
Şekil 26.: Bitkinin kök ölçüm sonuçları.....	65
Şekil 27.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkinin gen ifade düzeyleri	68
Şekil 28.: 150 mM NaCl ilave edilen bitkideki gen ifade düzeyleri	69
Şekil 29.: Mor kükürtsüz bakterilerin inoküle edilen bitkideki gen ifade düzeyleri	69
Şekil 30.: İzolatlar için oluşturulan standart eğri grafiği	72
Şekil 31.: Toplam bakteri için oluşturulan standart eğri grafiği.....	73
Şekil 32.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen viyoldeki mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri miktarlarının grafiği	74

Şekil 33.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen viyoldeki mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri miktarlarının grafiği 74

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.: Mor kükürtsüz bakterilerin sınıflandırılması	13
Tablo 2.: ATCC PMSY 2657 besiyeri içeriği	20
Tablo 3.: Rhodospirillaceae besiyeri içeriği	21
Tablo 4.: AT besiyeri içeriği.....	21
Tablo 5.: Azotsuz besiyeri içeriği	22
Tablo 6.: Pikoskavaya'nın besiyeri	22
Tablo 7.: Glutamat-asetat besiyeri içeriği	23
Tablo 8.: Winogradsky besiyeri içeriği	23
Tablo 9.: Hoagland çözeltisi içeriği.....	24
Tablo 10.: Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri.....	29
Tablo 11.: PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları.....	29
Tablo 12.: PCR protokolü.....	30
Tablo 13.: OneScript® Plus cDNA Synthesis kiti bileşen içeriği.....	36
Tablo 14.: <i>A. thaliana</i> 'nın erken tuz stresi genlerinin ifade düzeyi için kullanılan primerler.....	37
Tablo 15.: Real time PCR için bileşen içerikleri ve miktarları	38
Tablo 16.: Mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri için kullanılan primeler.....	39
Tablo 17.: İzolatların azot fiksasyonu ölçüm sonuçları	44
Tablo 18.: İzolatların fosfat çözündürme yetenekleri ölçüm sonuçları.....	46
Tablo 19.: IAA üretim potansiyeli sonuçları	50
Tablo 20.: Mikrobiyal aktivite sonuçları	56
Tablo 21.: Kontrol bitkisinin yaprak ölçüm sonuçları (cm).....	60
Tablo 22.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçüm sonuçları (cm)	61
Tablo 23.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitki için yaprak ölçüm sonuçları (cm)	62
Tablo 24.: 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları (cm)	63

ÖNSÖZ

Yüksek lisans serüvenimin başladığı ilk günden itibaren çıktığım yolda ne kadar zorlansam da pes etmemem gerektiğini hatırlatan, hata yaptığım her adımda doğrusunu nasıl yapacağımı büyük bir sabırla öğreten, bilgi ve tecrübeleriyle tezimin her aşamasına ışık tutan, sabrın ve azmin başarının anahtarı olduğunu anlamamı sağlayan çok kıymetli ve değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Caner VURAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

A. *thaliana* ile ilgili çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a ve Doç. Dr. Barış UZİLDAY'a teşekkür ediyorum. Laboratuvar çalışmalarında alt yapı desteklerinden dolayı Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a, Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a, Prof. Dr. Gürkan SEMİZ'e, Dr. Pelin ALİCANOĞLU KOYUNCUOĞLU'na ve Arş. Gör. Alperen ERGÜN'e teşekkür ediyorum. Tez çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Hamza ETTADİLİ, Dr. Tuğçe Yağmur ORHAN ve Magsud NURMAHAMMADOV, Beyza CAVE ve Doğukan MUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, zorlandığım zamanlarda manevi desteği ile her zaman yanımda olan çok değerli hocam Dr. Cansu VURAL'a teşekkür ediyorum.

Çıktığım bu yolda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, fikirlerine her zaman değer verdiğim, lisans eğitimimden itibaren en iyi ders arkadaşım olan babam Fikret AKSOY'a, başarısızlık ve ümitsizliğe kapıldığım her an sesiyle bana umut olan, varlığını her an yanımda hissettiğim, en büyük destekçim annem Ayşenur AKSOY'a, üzgün olduğum her an konuşması ile beni tekrar mutlu eden, bu hayattaki en iyi sırdaşım ve destekçim ablam Sümeyra DEMİRCİOĞLU'na ve çocukluk arkadaşım, yanında en çok mutlu olduğum kardeşim Halil AKSOY'a sonsuz teşekkür ediyorum.

1. GİRİŞ

Toprak çok sayıda mikroorganizma içeren zengin ve dinamik bir ekosistemdir (Ahmed ve diğ. 2018). Toprakta hızla artan tuz konsantrasyonu, 230 milyon hektarlık ekili araziye ve sulanan arazinin %20'sini etkilediği tahmin edilmektedir (<https://www.fao.org>). Tuzluluk, sodyum (Na^+), bikarbonat (HCO_3^-), magnezyum (Mg^{+2}), sülfat (SO_4^{-2}), potasyum (K^+), klorür (Cl^-), kalsiyum (Ca^{+2}), karbonat (CO_3^{-2}) gibi suda çözünebilir farklı tuz iyonlarının toprakta aşırı birikmesi ile oluşur. Toprakta 200 mM sodyum klorür (NaCl) varlığında, tuza dayanıklı (şeker pancarı vb.) ve orta derecede toleranslı ürünlerde tahmini verim düşüşü sırasıyla %20 ve %60 olmakla birlikte, tuza duyarlı bitkilerin canlılığını yitirme ihtimali ise çok yüksektir (Smoleń ve diğ. 2020). Topraktaki artan tuzluluk hasat edilen ürünlerin veriminde düşüşlere yol açabilmektedir. Bu durum, gelecekte gıda üretimi için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

Rizosfer, bitkilerle etkileşime giren ve bitki-mikroorganizma arayüzünde farklı sinyalleşme süreçlerini ve ürün alışverişini destekleyen zengin bir mikroorganizma nişidir. Mikroorganizmalar ve bitkiler arasındaki iletişim hem bitki hem de mikrobiyal topluluklar için önemli olan nötr, sinerjik veya olumsuz sonuçlara yol açan çeşitli mekanizmaları içerebilir. Rizosfer mikroorganizmaları arasında; bitki büyümesini teşvik eden bakteriler, patojenik mikroorganizmaları baskılayabildikleri ve bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere tepkilerini değiştirerek bitki büyümesini teşvik edebildikleri için, bu mikroorganizma grubu doğal bir ekosistemde olduğu kadar tarımda da kilit bir konuma sahiptir (Majeed ve diğ. 2018). Abiyotik stresler, toprak mikrobiyal çeşitliliğini, fizyokimyasal özelliklerini etkileyen ve bunların sonucunda verim kaybına neden olan olumsuz çevresel koşullardır. Tarımsal verimliliği artırmayı amaçlayan bilinçsiz tarım uygulamaları ve sanayileşme nedeniyle ekilebilir alanların bozulması gibi faaliyetler, bitkilerde abiyotik streslerdeki ani artışın ana nedenleri arasında yer almaktadır (Goswami ve Deka, 2020). Bitkiler ve bitki büyümesini teşvik eden bakteriler arasında belirtilen olumlu etkiler göz önüne alındığında; bu organizmaların çevresel değişikliklere nasıl tepki verdiğini anlamak, bitkilerin stres toleranslarını artırmalarına yardımcı olacak mikrobiyal stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir adımdır. Yeni bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin keşfedilmesi ve tarım yapılan arazilere hedefli mikroorganizma aşılama bu stratejiler arasında değerlendirilebilir (Hartman ve Tringe, 2019).

Mor kükürtsüz bakteriler, bitki büyümesi teşvik etme özelliği olan yüksek değerli bileşikler üretme ve biriktirme kabiliyeti nedeniyle son yıllarda çalışmalarda ilgi gören fototrofik bir mikroorganizma grubundadır. Mor kükürtsüz bakteriler ışığı kullanarak enerji üretebilen, çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilen ve birçok ortama uyum sağlayıp büyüeyebilen fakültatif anaerobik bakterilerdir. Ayrıca, Mor kükürtsüz bakterilerin azot (N₂) fiksasyonu, fosfat çözündürme ve bitki büyümesini teşvik eden indol-3-asetik asit (IAA) ve 5-aminolevulinik asit (ALA) üretimi gibi çeşitli metabolik yollar ile bitkinin büyümesini teşvik eden çeşitli özellikleri olduğu bilinmektedir (Hayashi ve diğ. 2022).

Bu tez çalışmasının amacı, çeşitli gölet ve toprak örneklerinden izole edilen mor kükürtsüz bakterilerin izolasyonunu ve moleküler biyolojik düzeyde tanımlanmasını, mor kükürtsüz bakterilerin ürettiği ve bitki büyümesine yardımcı olduğu bilinen çeşitli moleküllerin belirlenmesinde bazı biyokimyasal testlerin uygulanmasını, tuz stresi altındaki *A. thaliana*'nın gen ifade düzeylerinin incelenmesini ve *A. thaliana* rizosferinde bulunan mor kükürtsüz bakterilerin süreç içerisindeki varlığının moleküler biyolojik olarak izlenmesi çalışmalarını kapsamaktadır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Topraktaki abiyotik stres hakkında genel bir bakış

Toprak tuzluluğu, tüm tarımsal bitkiler için en önemli abiyotik stres kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Yıllar içerisinde gittikçe artan bir sorun haline gelen bu durum, özellikle kurak ve yarı kurak bölgeler için en ciddi sorunlardan biri olarak değerlendirilmektedir (Tamam ve diğ. 2022). Tuz stresi altındaki bitkide zayıf büyümesi, azalan besin hareketi, hormonal dengesizlik, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, iyonik toksisite ve ozmotik stres gibi etmenler görülmektedir. Ayrıca tuzluluk toprağın fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek topraktaki mevcut mikrobiyal çeşitliliği azaltır ve böylece toprak sağlığını olumsuz yönde etkiler (Kumar ve diğ. 2020). Toprak tuzluluğu, dünya çapında 800 milyon hektardan fazla araziyi (toplam ekilebilir arazinin %6'sı) etkileyen bir sorundur. FAO (Gıda ve Tarım Örgütü)'nün analizine göre, tuzluluktan kaynaklanan tahmini arazi kaybı, 2050 yılına kadar dünya çapındaki toplam ekilebilir arazinin %50'si olacaktır (Sarker ve diğ. 2022). Tuzluluk genel olarak birincil ve ikincil olarak sınıflandırılır. Birincil tuzlulukta bozunma, yağmur ve kuvvetli rüzgar gibi karada ve suda uzun süre tuzun kalmasında rol oynayan doğal süreçlerden oluşurken; ikincil tuzluluk, ormanların azalması, arazi temizleme çalışmaları ve aşırı sulama gibi antropojenik (insan kaynaklı) faaliyetlerin etkisi olarak nitelendirilebilir. Tuzlu toprak ve su, çeşitli tuzların (Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} ve HCO^-) bir araya gelmesi ile oluşur (Arif ve diğ. 2020). Bitkiler, tuz stresi ile başa çıkmak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar. Bunlar;

- Vakuollerde seçici birikim veya sodyum iyonlarının salınımı,
- Sodyum iyonlarının kökteki emilimin modülasyonu ve daha sonra bu iyonların yapraklara taşınması,
- Bitki hücresel seviyesinde sodyum iyonlarının bölümlere ayrılması,
- Trehaloz ve prolin gibi çeşitli bitkiye uyumlu çözünenlerin sentezi,
- Bitki hücre zarlarının modifikasyonu,
- Süperoksit dismutaz ve peroksidaz dahil olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin sentezi,

- Oksin, sitokinin ve etilen dahil olmak üzere bazı bitki hormon seviyelerinin değiştirilmesi (Gamalero ve Glick, 2022).

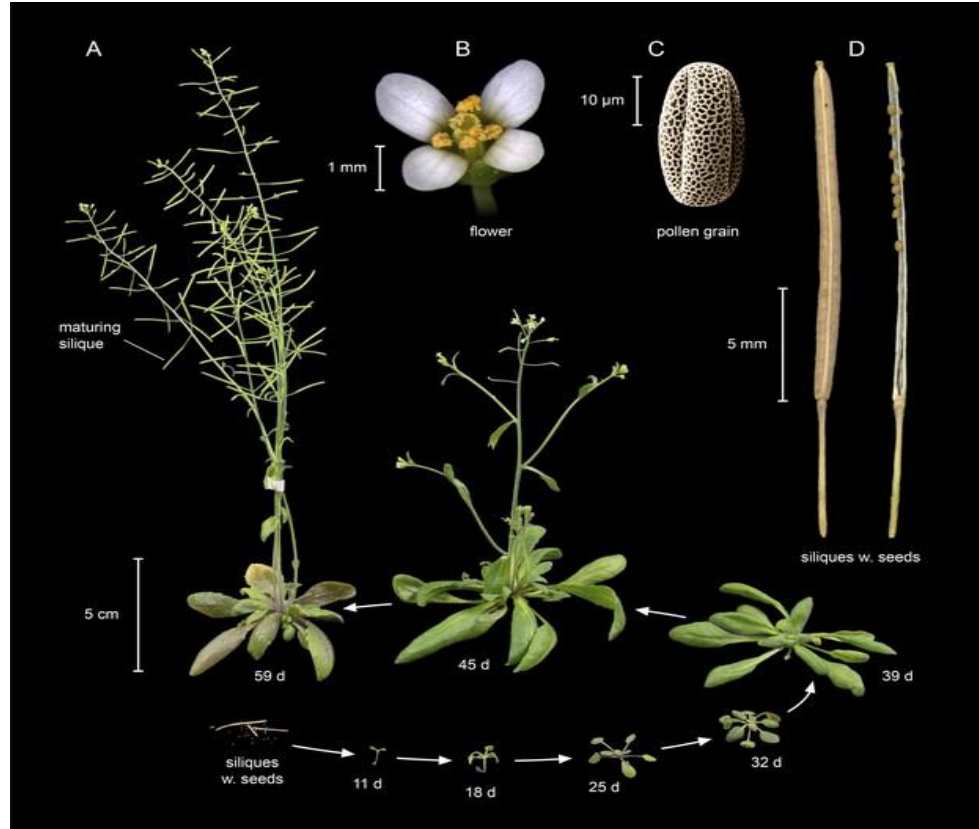
Kök ve yapraklarda farklı morfo-anatomik değişiklikler ile toprak üstü yapısının (kloroplast, mitokondri ve peroksizom) boyut ve sayısındaki değişiklikler bitkinin tuza adaptasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, bitki absisik asit (ABA), oksinler, sitokininler, salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), poliaminler, gibberellinler ve brassinosteroidler (BR) gibi endojen fitohormonların seviyesini arttırarak tuza karşı yanıt oluşturmaktadır (Arif ve diğ. 2020).

Toprağın biyolojik özellikleri, çeşitli sebeplerle oluşan çevresel bozulmalarda tarım ekosistemlerinin işlevsel istikrarını değerlendirmek için en temel bileşenlerden biri olarak değerlendirilir. Toprak mikrobiyomu, toprak içeriğinde bulunan organik maddelerin doğal olarak ayrışmasını ve besin erişilebilirliğini düzenleyerek toprak sağlığının sürdürülmesinde hayati bir rol oynar. Bitkiler rizosferlerinde çeşitli mikroorganizmaları barındırır. Rizosferde bulunan mikroorganizmalar bitkiyi stres koşullarına karşı koruma potansiyeli sunarak bitkinin stresten uzaklaşmasını, olumsuz koşullara toleransı ve direncini arttırmada fayda sağlamaktadır (Egamberdieva ve diğ. 2022).

2.2 *A. thaliana*

Brassicaceae familyasına ait, *A. thaliana* küçük, tek yıllık rozet görünümünde bir bitkidir (Şekil 1) (Krämer, 2015). *A. thaliana*, yakın akraba türlerinde görülen çapraz geçiş üreme sistemine karşın kendi kendine döllenme (otogami) yoluyla üreme göstermesinin bitkiye önemli bir avantaj sağladığı düşünülmektedir (Şekil 2) (Hohmann ve diğ. 2014; Koch ve Matschinger, 2007). *A. thaliana* 6-8 hafta kadar kısa olabilen hızlı bir yaşam döngüsüne sahiptir. Öte yandan, yakın akrabalarının çoğu iki yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler olarak bilinirler. *A. thaliana*, yakın akraba olan diğer türlere göre daha küçük yapıda bir bitki olmasına rağmen, bitkinin değişen çevresel şartlar altında bile yaşam döngüsü ve üreme stratejileri önemli derece kararlılık göstermektedir. *A. thaliana*'nın yaprakları, daha kompakt bir rozet oluşturacak şekilde konumlanmıştır ve çiçek durumu, yakın akrabası *A. halleri* (L.) O'Kane ve Al-Shehbaz'den daha dik ve uzundur (Krämer, 2015). Bu morfolojik farklılıkların, *A.*

thaliana'nın farklı ortamlara adaptasyonunda avantaj sağladığı düşünülmektedir (Kooke ve diğ. 2016). *A. thaliana* yakın akraba olan türler ile karşılaştırıldığında, siliqua adı verilen meyve tipinin bol miktarda ve küçük boyutlarda tohumlara sahip olduğu ve çiçeklenmesinin de eş zamanlı olarak koordine edildiği görülmektedir. *A. thaliana* tohumları, *A. halleri* ve *A. lyrata* (L.) O'Kane ve Al-Shehbaz'nın tohumlarına kıyasla daha uzun ömürlü ve tohum canlılığının da daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu açıklanan özelliklerden dolayı, *A. thaliana* birçok genetik tabanlı çalışmaya rol model olma özelliği göstermektedir (Krämer, 2015).



Şekil 1.: *A. thaliana* Columbia (Col-0)'nın yaşam döngüsü (Krämer, 2015): (A) tohumdan (sol altta) fideye (11 gün), vejetatif büyümeye (39 gün) ve üreme gelişimine (45 gün) kadar geçen sürelerdeki bitki gelişim evreleri. (B) Çiçek (C) bir polen tanesinin taramalı elektron mikrofrafisi ve (D) olgun siliklerin *A. thaliana* meyvesi (tohum kabukları; sol: kapalı; sağ: açık)

A. thaliana'nın büyümesi için sıcaklık aralığı 16-25°C olmasına rağmen ortamda yeterli miktarda su bulunması halinde bu rakam 34°C'ye kadar yükselebilir. Ancak böylesi bir durum oluştuğunda ise bitkinin büyüme ve üreme verimliliği daha düşük olmaktadır (Goodrich, 2002). Literatür bilgileri incelendiğinde *A. thaliana*'nın

hızlı ve sağlıklı gelişimi için ideal sıcaklık aralığının 22-23°C olduğu görülmektedir (Feraru ve diğ. 2019). *A. thaliana* bitkisi için düşük sıcaklık değerleri çiçeklenmeyi geciktirirken, yüksek sıcaklık değerleri daha az yaprak ve hızlı çiçeklenmeye neden olmaktadır. Bitkinin optimum ışık yoğunluğu yaklaşık 120-150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sn}^{-1}$, fotoperiyodu ise 8-24 saat aralığındadır. Uzun günler (>12 saat) üreme döngüsünü hızlandırır. Kısa günler ise (<12 saat) vejetatif dokuların büyümesini kolaylaştırır. Geç çiçeklenen birçok ekotipte, uzun günlerde bile çiçeklenmeyi hızlandırmak için genç fidelerin birkaç hafta boyunca 4°C'lik ek bir vernalizasyon işlemi gerekmektedir. *A. thaliana* için nem aralığı %25-75 arasında olmalıdır. Çok yüksek neme (>%90) maruz kalmış bitkilerde kısırlık durumunun olduğu da bildirilmiştir (Goodrich, 2002).



Şekil 2.: *A. thaliana* ve ortak atadan gelen türlerin bir alt kümesi: Soldan sağa: *A. thaliana* (Col), *A. halleri*, *A. lyrata* ve *A. croatica* (Krämer, 2015).

Bitkiler, sitoplazmalarında sodyum iyonunun (Na^+) normalden fazla birikimini önlemek için birtakım stratejilere sahiptirler. Bu stratejiler; Na^+ akışının en aza indirilmesi, Na^+ 'nın hücre içi bölümlere ayrılması, plazma zarındaki Na^+/H^+ (AtNHX1) antiporterleri aracılığıyla Na^+ akışının minimuma indirilmesi ve Na^+ 'nın floem yoluyla hücre dışına geri gönderilmesi gibi bir dizi mekanizmaya sahiptir. Bitkilerin tuz stresine vermiş oldukları fizyolojik tepkilerin altında gen ifadesindeki değişiklikler yatmaktadır (Kant ve diğ. 2006). Klor (Cl^-) iyonunun tuz stresi altındaki bitkilerde dışarıdan alınması, hücre içinde tutulması ve/veya hücre dışına gönderilmesi çok net olarak tanımlanabilmiş mekanizma değildir. Aynı durum Na^+ taşınımı içinde geçerlidir. Normal koşullar altında, Cl^- aktif olarak bir ΔpH güdümlü Cl^-/nH^+ simportu tarafından alınır (Lorenzen ve diğ. 2004). Tuz stresinin *A. thaliana* genomunun

yaklaşık %13'ünün transkripsiyonel seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Bu genler, birçok stres kaynaklı oluşan biyolojik tepkimelerde görev alan proteinlerin yanı sıra, çok sayıda işlevi bilinmeyen proteinleri de kodlamaktadır. Bu noktada, transkripsiyon faktörleri ve kinazlar gibi süreçten etkilenen genlerin tuz stresine karşı oluşturulan düzenleyici mekanizmalarda görev alma ihtimalinin olduğu düşünülmektedir (Kant ve diğ. 2006).

2.3 Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler

Toprak ekosisteminin bir bileşeni olarak toprak mikroorganizmaları; toprak verimliliğinin düzenlenmesi, besin döngüsü ve bitki çeşitliliğinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler, toprakta serbest yaşayan bakteriler ile kök rizosferinde kolonize olan rizobakterileri ifade eder. Doğal olarak oluşan bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin sürdürülebilir tarımda kullanımı, toprak ve ürün verimliliği üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle son on yılda önem kazanmıştır (Ramakrishna ve diğ. 2019).

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler; bitki büyümesini artırmanın yanı sıra, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslerle başa çıkmasına yardımcı olmaktadır. Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin ana grupları Proteobacteria ve Firmicutes şubeleri üyelerinden oluşur. Firmicutes şubesinde *Bacillus* sp. bitki büyümesini teşvik edici aktiviteye sahip baskın bakteriler olarak bilinir. Proteobacteria şubesinde, Gammaproteobacteria sınıfı *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Psychrobacter*, *Enterobacter* ve *Rahnella* cinslerini içerir. Ayrıca iki serbest yaşayan bitki büyümesini teşvik eden bakteri olarak, *Burkholderia* sp. ve Betaproteobacteria'ya ait *Achromobacter xylosoxidans* tanımlanmıştır (Ramakrishna ve diğ. 2019). Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler, 1-aminosiklopropan-1 karboksilat (ACC) deaminaz, indol-3-asetik asit (IAA), antioksidanlar, hücre dışı polimerik madde (EPS) ve uçucu organik bileşikler (VOC) gibi farklı bileşikler üretirler (Kumar ve diğ. 2020).

Tarımsal uygulamaya yardımcı olan ticarileştirilmiş bitki büyümesini teşvik eden bakteri suşları arasında *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus fimus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus*

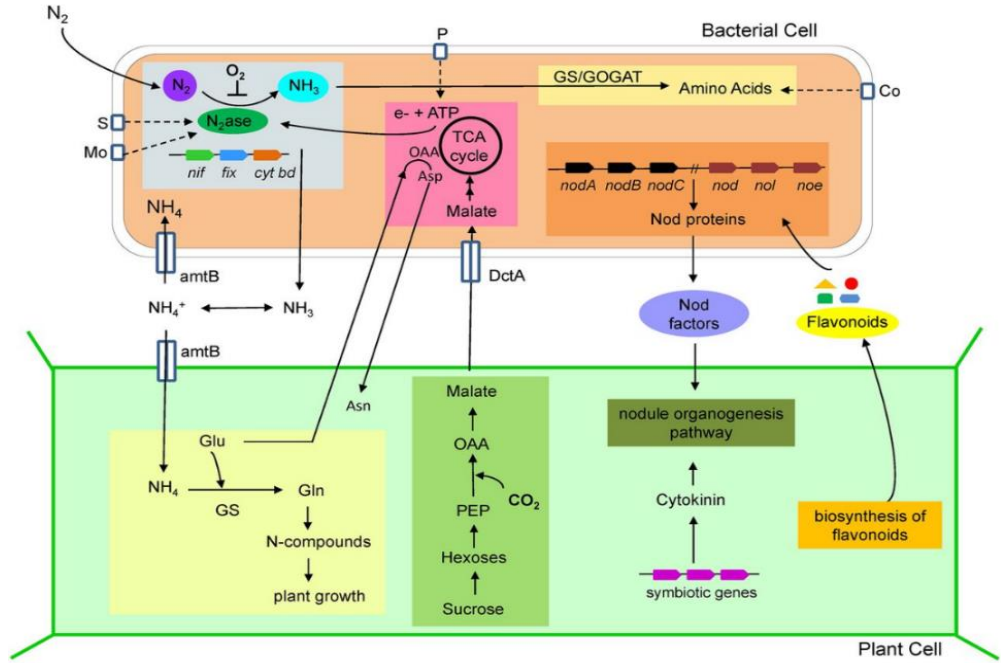
spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Delftia acidovorans*, *Paenobacillus macerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces* spp., *Streptomyces lydicus* ve çeşitli *Rhizobia* spp. olarak sıralanabilir (Glick, 2012).

2.4 Bitki büyümesini etkileyen mekanizmalar

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler bitki büyümesinin uyarılması, ürün veriminin artırılması ve ayrıca kimyasal gübrelerin maliyetini düşürmesi nedeniyle araştırmalarda büyük ilgi görmüştür. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler bitki sağlığını teşvik eden rizobakteriler veya nodül teşvik eden rizobakteriler olarak da adlandırılabilir. Bitkilerle olan ilişkilerine göre bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler: simbiyotik bakteriler ve serbest yaşayan rizobakteriler olarak iki gruba ayrılabilir. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin bitkilerin büyümesini uyardığı bir dizi mekanizma vardır. Bitki büyümesini hızlandırıcılar ve biyolojik kontrol ajanları olarak genel olarak doğrudan ve dolaylı mekanizmalar olarak sınıflandırılırlar. Doğrudan mekanizmalar, bitki büyümesini teşvik etmek için gerekli olan en önemli adımdır. Azot fiksasyonu, fitohormon üretimi, fosfat çözünürlüğü ve artan demir mevcudiyetini gibi bitki büyümesine olumlu bir şekilde etki gösteren süreçler doğrudan mekanizmalar içerisinde yer alır (Ullah ve Bano, 2015).

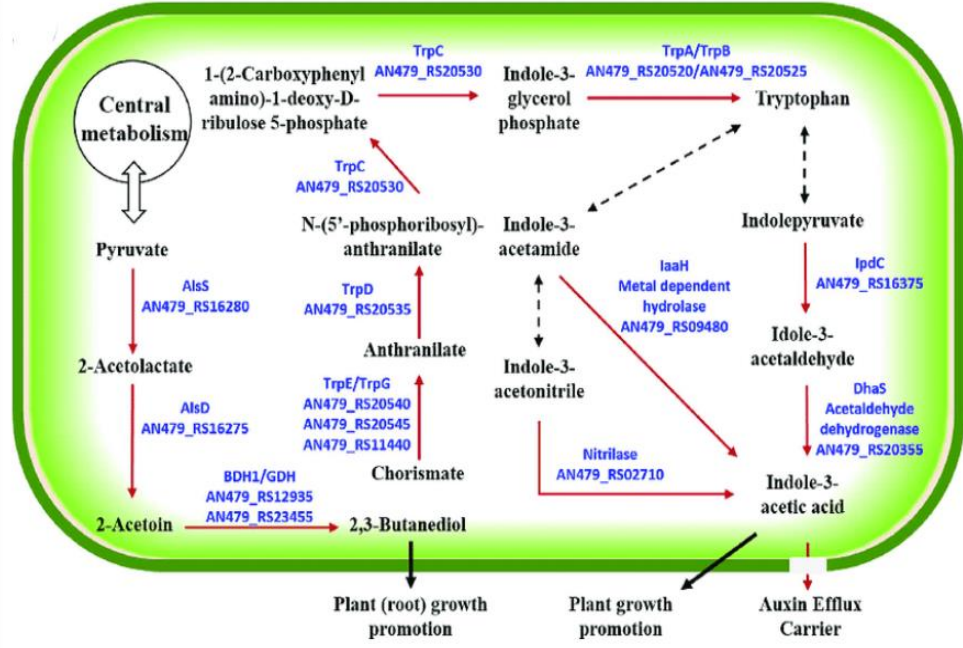
Azot proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer temel biyomoleküllerin ayrılmaz bir parçasını oluşturmasının yanı sıra, bitki büyümesi ve üretkenliği için gerekli olan en temel elementtir. Biyolojik azot fiksasyonu (Şekil 3), mikroorganizmalar tarafından nitrojenaz olarak adlandırılan karmaşık bir enzim sistemi kullanılarak azotun amonyağa dönüştürülmesi işlemidir. *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Beijerinckia* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Flavobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Mycobacterium* sp. ve *Serratia* sp. gibi bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler moleküler azotu simbiyotik ve simbiyotik olmayan veya birleştirici işlemler yoluyla bağladığı bilinen bakteriyel cinslerdir. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin biyogübre olarak

kullanım alanlarını genişletmek; kimyasal gübreye olan ihtiyacın azalmasına ve böylece toprak verimliliğinin artmasına neden olabilir. Bu nedenle sürdürülebilir tarım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasında çevre kirliliğinin ve doğanın bozulmasının azaltılmasında biyogübreleme büyük önem taşımaktadır (Kumar ve diğ. 2015).



Şekil 3.: Azot fiksasyonu sırasında bakteri hücresi ve bitki arasındaki etkileşimin şematik gösterimi (Mus ve diğ. 2016)

Doğrudan mekanizmaların içinde yer alan bir diğer önemli mekanizma, oksin üretimidir. Patten ve Glick (1996), rizosferdeki mikroorganizmaların yaklaşık %80'inin oksin sentezleyebildiğini ve ikincil bir metabolit olarak serbest bırakabildiğini bildirmiştir. En çok bilinen oksin, indol-3-asetik asittir (IAA) (Şekil 4). IAA/Auxin baskın olarak sürgün uçlarında sentezlenir, sürgün vasküler kambiyumu yoluyla kök apikal meristeme taşınır ve kökün apikal meristemine hücre bölünmesinin çok az olduğu veya hiç olmadığı ve hareketsiz merkez (quiescent centre) olarak adlandırılan bölgede birikir. Çoğu oksin/IAA, bitkinin genotipine bağlı olarak değişen düşük konsantrasyonlarda bitki kökünde (eksüdatlarında) bulunan amino asit olan triptofandan sentezlenir. IAA üretimi, indol piruvik asit (IPyA) yolu, indol asetamid (IAM) yolu ve indol asetaldoksim (IAOx)/indolasetonitril (IAN) üç farklı biyosentetik yolla sentezlenir (Olanrewaju ve diğ. 2017).

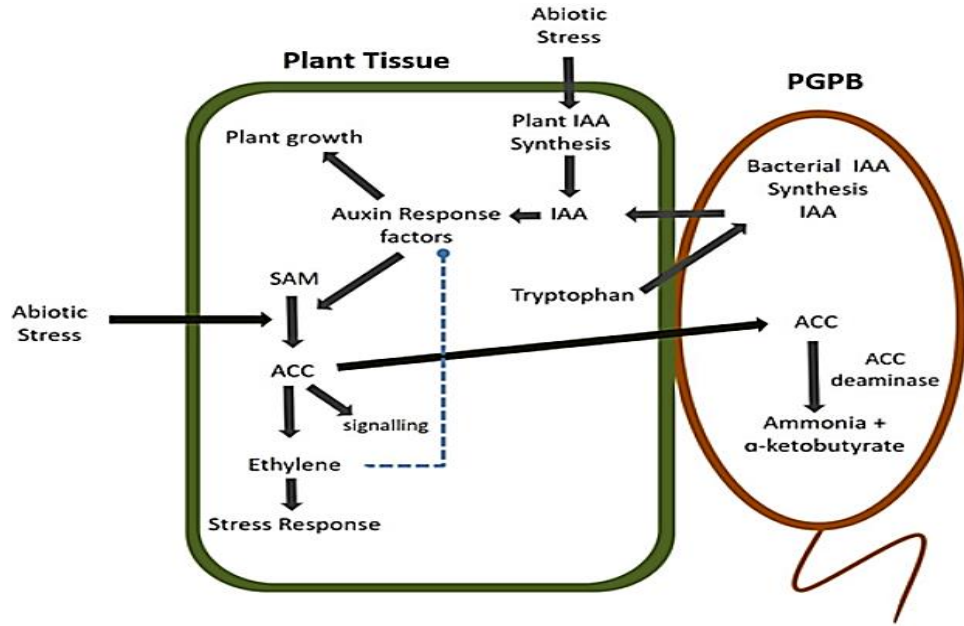


Şekil 4.: İndol-3-asetik asit, triptofan ve asetoin biyosentezinde yer alan bakteriyel metabolik yollar (Khan ve diğ. 2017)

Etilen, SAM sentetaz tarafından S adenosil-1-metionine (SAM) dönüştürülen metioninden türetilir ve SAM daha sonra ACC sentetaz tarafından 1-aminosiklopropan-1-karboksilik aside (ACC) dönüştürülür. ACC, ACC oksidaz tarafından etilene dönüştürülür. ACC deaminaz (ACCD) aktivitesi, tohum çimlenmesi, yaşlanma, stres sinyali ve kök uzaması gibi birçok gelişim ve fizyolojik sürecin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilir. Ürün verimliliğini sürdürmek için etilen stresinin azaltılması gerekir. Bu amaçla, bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin etilen stresini azaltmak için ACCD aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bakterilerin inokulum olarak kullanıldığında büyümeyi teşvik edici etkileri; topraktaki yaşam süreçlerine, aşılındıkları ürünle uyumlu olmalarına, topraktaki yerli mikrobiyom ile etkileşimlerine ve abiyotik stres altındaki dayanıklılıklarına bağlıdır (Etesami ve diğ. 2020).

Toprakta fosforun varlığı yeterli miktarda olmasına rağmen, bitkilerde fosfor miktarı çok düşüktür. Bunun nedeni, bitkilerin fosforu yalnızca monobazik ($H_2PO_4^{2-}$) ve dibazik (HPO_4^{-2}) formunda kullanmasıdır. Fosforun, farklı metal oksitlerin çözünmeyen komplekslerine hızlı bir şekilde dönüşmesi ekilebilir toprakların büyük bir kısmında mevcut fosfat eksikliğinin olduğu bildirilmiştir. Fosfatlı gübreler, tarım topraklarında çoğunlukla kullanılmaktadır. Ancak, bu kimyasal gübrelerin sürekli

kullanımı *in vivo* olarak toprağa ve çevreye zararlıdır. Bu nedenle, bitki büyümesini teşvik edici özelliklere sahip biyogübrelerin üretimi son yıllarda sıklıkla çalışılan konulardır. İnorganik fosfatı çeşitli ürünlerin veya bitkilerin kullanımına uygun forma dönüştürmek için; *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Achromobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. ve *Serratia* sp. cins üyeleri kullanılır (Prasad ve diğ., 2019; Etesami ve diğ., 2020).



Şekil 5.: Etilen stresi altındaki bitkilerde bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin etkisini gösteren şema (Naing ve diğ., 2021)

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler bitkiyi tuz stresinden korumak için doğal bir kaynaktır. Bu bakteriler fitohormon üretimini teşvik ederek, besinleri çözerek ve diğer homeostatik destekleri sağlayarak tuz stresini engeller. Bitki büyümesini eden bakteriler, bitki köklerinde kolonize olurlar ve kendilerini korumak için biyofilm oluşturarak mikrokoloniler oluştururlar. Artan toprak tuzluluğu ile biyofilm oluşumu da artar. Tuzlu topraklarda yetişen bitkiler için bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin; kök ve sürgün gelişimine, besin alımına, suyun ve elektrolitlerin gereken seviyede tutulmasına, klorofil içeriğine ve hastalıklara karşı direnci arttırmaya olumlu yönde etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bu faydalı ilişki göz önüne alındığında, tuz stresinin azaltılmasıyla ilgili olarak rizosferik mikrobiyal çeşitlilik alanına ilgi artmaktadır (Dutta ve diğ., 2022).

2.5 Mor Bakteriler

Proteobacteria, tüm kültürlenmiş bakterilerin %45'inden fazlasını oluşturan en büyük şubedir. Proteobacteria şubesi; Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria ve Epsilonproteobacteria olmak üzere beş sınıfa ayrılmıştır. Sadece Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria sınıfı fotosentetik bakterileri içermektedir (Gupta, 2013). Mor bakteriler, Proteobacteria şubesinde bulunan gram-negatif, anoksijenik fotosentez ile ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştüren fotosentetik bakterilerdir. Ayrıca, fotosentetik pigmentler (bakteriyoklorofil ve karotenoid) ve tek karbon kaynağı olarak CO₂ ile ototrofik olarak büyüyebilirler (Madigan ve Jung, 2009).

Fotosentetik mor bakteriler, mor kükürt bakterileri (Chromatiaceae) ve mor kükürtsüz bakteriler (Rhodospirillaceae) olarak alt gruplara ayrılır. Bu bakteriler, kükürt toleransları ve kükürtü kullanabilmeleri gibi fizyolojik temellere dayanarak ayırt edilmektedir (Hansen ve Van Gemerden, 1972). Karşılaştırmalı 16S rRNA dizilimine dayanan mor bakterilerin filogenetik analizleri, mor kükürt bakterilerinin Gammaproteobacteria sınıfında; mor kükürtsüz bakterilerin ise Alphaproteobacteria veya Betaproteobacteria olduğunu göstermiştir (Tablo 1). Mor kükürt bakterileri, hem hücre içinde kükürt (S₀) depolayan hem de hücre dışında kükürt üreten türleri içermektedir. Mor kükürt bakterilerinin pek çok türü yüksek tuz ve/veya pH'da büyüyebilmektedir (Madigan ve Jung, 2009).

Mor kükürtsüz bakteriler, en eski fotosentetik organizma gruplarından biridir. Genellikle kırmızı veya mor renklidirler (Imhoff ve diğ. 2005). Fotosentetik bakteriler oksijenik ve anoksijenik bakteriler olmak üzere iki grupta incelenebilir. Oksijenik bakteriler siyanobakterilerden oluşurken; oksijensiz bakteriler Rhodospirillaceae (mor kükürtsüz bakteriler), Chromatiaceae (mor kükürt bakterileri), Chlorobiaceae (yeşil kükürt bakterileri) ve Chloroflexaceae (kayan filamentli yeşil kükürtsüz bakteriler) ailelerinden oluşur. Mor kükürtsüz bakteriler, Rhodospirillaceae familyasına aittir ve *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* ve *Rhodomicrobium* cinslerine ait türleri içerir. Yeryüzündeki sürekli değişen koşullar mor kükürtsüz bakterilerde fotoototrofi, fotoheterotrofi gibi özel metabolik yollar geliştirmiştir. Bu metabolik yollar organizmanın farklı koşullara uyum sağlamasına yardımcı olur (Lu ve diğ. 2021).

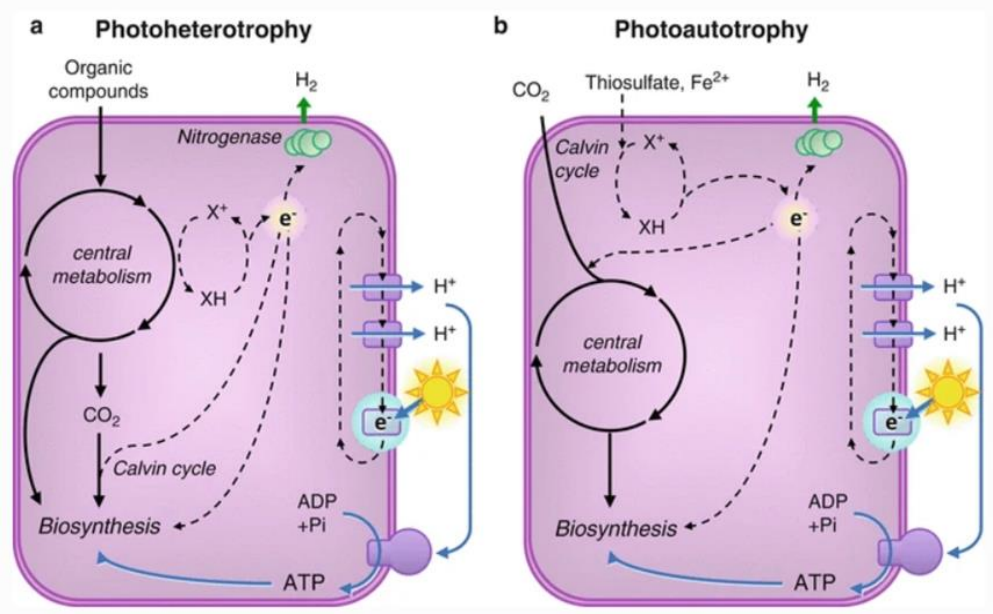
Mor kükürtsüz bakterilerin ana metabolik yolları arasında; Calvin-Benson döngüsü, Glioksilik asit döngüsü, Embden-Meyerhof-Parnas yolizi ve Trikarboksilik asit döngüsü (Şekil 6) bulunur. Özellikle, Glioksilik asit döngüsü, uçucu yağ asitlerinin bozulmasında, yüksek organik yükü tolere etmede ve kirleticileri parçalama konusunda organizmaya önemli ölçüde avantaj ve yetenek sağlayan mor kükürtsüz bakterilere özgü bir metabolik yoldur (Kumar ve diğ. 2015).

Tablo 1.: Mor kükürtsüz bakterilerin sınıflandırılması (Imhoff ve Madigan, 2005)

Taksonomi/filogeni	Tür	Morfoloji
Alfaproteobacteria	<i>Rhodobaca</i> sp.	Yuvarlak, kısa çubuk
	<i>Rhodobacter</i> sp.	Çubuk
	<i>Rhodovulum</i> sp.	Çubuk, yuvarlak
	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	Tomurcuklanan çubuk
	<i>Rhodoblastus</i> sp.	Tomurcuklanan çubuk
	<i>Blastochloris</i> sp.	Çubuk
	<i>Rhodoplanes</i> sp.	Çubuk
	<i>Rhodocista</i> sp.	Yuvarlak
	<i>Rhodospira</i> sp.	Sarmal
	<i>Rhodovibrio</i> sp.	Virgül
	<i>Rhodothallasium</i> sp.	Sarmal
	<i>Rhodospirillum</i> sp.	Sarmal
	<i>Phaeospirillum</i> sp.	Sarmal
	<i>Rhodopila</i> sp.	Yuvarlak
	<i>Roseospira</i> sp.	Sarmal
	<i>Roseospirillum</i> sp.	Sarmal
Betaproteobacteria	<i>Rhodocyclus</i> sp.	Dalgali virgül
	<i>Rhodoferax</i> sp.	Çubuk, virgül
	<i>Rubrivivax</i> sp.	Çubuk, dalgali çubuk

Mor kükürtsüz bakteriler yaygın olarak fotosentetik koşullar altında yetiştirilir. Fotosistem II'ye benzeyen tek bir fotosistem kullanırlar, ancak suyu oksitleyemez ve bu nedenle O₂ üretemezler. Mor kükürtsüz bakteriler fotosentetik büyüme sırasında hem karbon hem de elektron kaynağı olarak organik bileşikleri (fotoheterotrofi) kullanırlar. Alternatif olarak, mor kükürtsüz bakteriler elektron kaynağı olarak inorganik elektron vericileri (örneğin H₂, tiyosülfat veya Fe⁺²) ve karbon kaynağı olarak CO₂'i (fotoototrofi bir yaşam tarzı) kullanabilirler. Elektron vericiden alınan elektronlar, ışık varlığında fotosistem tarafından enerjiye dönüştürülür ve hidrojen iyonu (H⁺) pompalayan elektron transfer zinciri aracılığıyla kanalize edilir. Ortaya çıkan proton hareket kuvveti, ATP sentaz yoluyla ATP üretmek veya diğer enerji gerektiren işlemler için kullanılabilir. Elektronlar, ters

elektron transferi yoluyla biyosentez için NADPH üretmek üzere NADP⁺'ya bağlanabilir. Alternatif olarak, elektronlara tekrar tekrar enerji verilebilir ve elektron transfer zinciri boyunca tekrarlayabilir. Bu döngü, döngüsel fotofosforilasyon adı verilen süreçte proton hareket kuvvetinin ve ATP havuzlarının sürekli korunmasına olanak sağlar. Döngüsel fotofosforilasyon, birkaç elektronun çevrimi, hücre bakımı ve onarımı için kullanılabilir enerji üretebildiğinden, yetersiz koşullar altında bakteriye özellikle avantaj sağlar (Doğan ve Koku, 2022).



Şekil 6.: Mor kükürtsüz bakterin fotoheterotrofi ve fotoototrofi yolları (McKinlay, 2014)

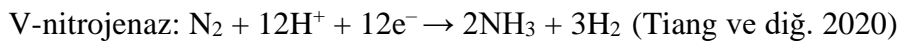
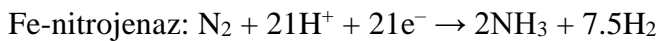
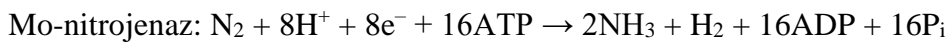
2.5.1 Mor Kükürtsüz Bakterilerin Biyoteknolojik Uygulamaları

Bakteriler, deterjan, tekstil ve ilaç endüstrilerinde kullanılan belirli plastikler ve enzimler de dahil olmak üzere çeşitli ürünlerin üretiminde rol oynamaktadır. Bakteri ve diğer mikroorganizmaları kullanarak kimyasalların üretimi, ekonomik sürdürülebilirliklerinin yanında aynı zamanda çevre dostudur. Modern biyoteknoloji; hücre birleştirme, biyoinformatik, genetik mühendisliği, yapı temelli moleküler tasarım ve hibridoma teknolojisinin kullanımından oluşmaktadır. Hint tropikal suları, tuz bataklıkları, endüstriyel atıklar, deniz suyu, kanalizasyonlar, atık sular, sıcak su kaynakları, çeltik tarlaları, okyanus suları, su ürünleri yetiştiriciliği gibi çeşitli ortamlarında heterotrofik bakterilerle birlikte fotosentetik bakterilerin varlığı rapor edilmiştir. Fotosentetik bakteriler; su ve atık su arıtımında, çeşitli kimyasalların

biyoremediyasyonunda, hayvan yemi ve su ürünleri takviyeleri olarak, biyolojik hidrojen üretiminde, koenzim Q üretiminde ve bitki büyümesi için biyo-gübreler olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Merugu ve diğ. 2012).

Mor kükürtsüz bakteriler, oksijensiz fotosentetik bakteriler kategorisinde yer almaktadır. *Rhodopseudomonas* sp. ve *Rhodobacter* sp. türleri oksijensiz fotosentez araştırmalarında model organizmalar olarak kullanılmaktadır (Madigan ve Jung, 2009). Mor kükürtsüz bakteriler, bazı türleri dışında azot fiksasyonu yeteneğine sahiptir. *Rhodobacter capsulatus* ve *Rhodobacter sphaeroides*, sadece azot gazı varlığında hızlı bir şekilde büyüyebilir. *Rhodobacter* türleri, sınırlı miktarda fikse edilmiş azot ile anoksijenik koşullarda gelişme avantajına sahiptir. Mor kükürtsüz bakteriler, azot fiksasyon işlemi sırasında yan ürün olarak hidrojen (H₂) gazı üretir. Azot fiksasyonu ve hidrojen üretim prosesleri, fotofermentatif bakterilerin nitrojenaz enzimi tarafından katalize edilir. İndirgenmiş ferredoksin içindeki elektronlar, azot moleküllerini (N₂) nitrojenaz enzimi ve ATP yardımıyla amonyağa (NH₃) indirgemek için kullanılır (Tiang ve diğ. 2020).

Nitrojenaz, kofaktörler olarak demir (Fe) ve Molibden (Mo) içeren ve 250 kDa moleküler ağırlığa sahip bir dinitrojenazdan ve yaklaşık 70 kDa'lık bir dinitrojenaz redüktazdan oluşan iki proteinli kompleks bir bileşiktir. Molibden-nitrojenaz, nitrojeni (N₂) amonyağa (NH₃) dönüştürmek için en yaygın ve en etkili nitrojenazdır, ancak kofaktör olarak Fe veya vanadyum (V) içeren diğer iki izozim tanımlanmıştır. *Rhodopseudomonas palustris*, bu üç enzimi kodlayan genlere sahip bilinen tek mor bakteridir. Bu alternatif nitrojenazlar, N₂'yi azaltmada daha az etkili olmasına rağmen azotu bağlama koşullarında H₂'nin üretilmesinde daha etkilidir. Bu durum ise yalnızca Mo eksikliği ve Fe veya V varlığı durumunda gerçekleşir (Zannoni ve De Philippis, 2014).

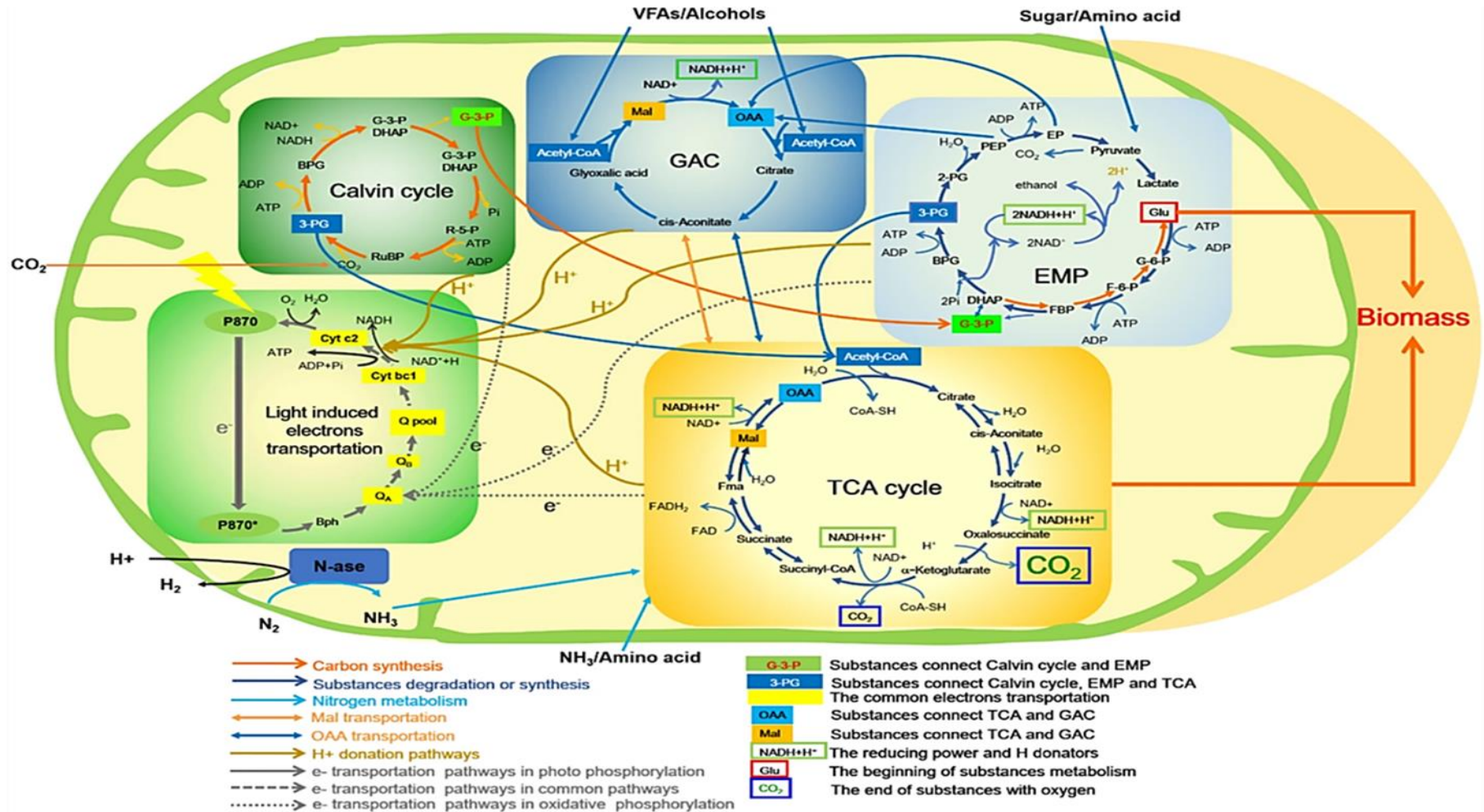


Nitrojenaz enziminin ana işlevi moleküler azotu amonyağa dönüştürmek ve yan ürün olarak moleküler hidrojen vermektir. Ancak, bu enzim moleküler azot (N₂) yokluğunda da çalışabilir ve tek ürün olarak hidrojen verebilir (Zannoni ve De Philippis, 2014). Literatürde *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*,

Rhodobacter spheroides ve *Rhodobacter capsulatus* gibi türlerin çoğunlukla biyohidrojen üretimi için kullanıldığı bildirilmiştir (Basak ve diğ. 2014).

5-aminolevulinik asit (ALA), hayvanlarda, bitkilerde, alglerde ve bakterilerde hemoglobin, klorofil ve B12 vitamini sentezi için kullanılan bir metabolittir. *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas faecalis* ve *Rhodovulum* sp., genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalarla elde edilebileceklere eşit konsantrasyonlarda ALA üretebilir. *R. sphaeroides* ise ALA üretimi için endüstriyel düzeyde kullanılmaktadır (Montiel-Corona ve Buitrón, 2021).

Karotenoidler ve bakterioklorinler, mor kükürtsüz bakterilerin fotosentetik metabolizmasında üretilen temel pigmentlerdir. Mor kükürtsüz bakteriler, karotenoid ve bakteriyoklorofil sentezleme özelliklerinden dolayı pigmentli bakteriler olmakla birlikte; kahverengi, kırmızımsı-kahverengi, kırmızı ve pembe olmak üzere geniş bir renk yelpazesine sahiptir. Bu bakteri grubu tarafından üretilen karotenoid özellikli renk pigmentlerinin UV- görünür bölge spektrofotometre absorpsiyonları 450 ile 550 nm arasındadır. Pembe veya kırmızı pigment; likopen, rodopsin (463, 490, 524 nm) ve spirolloksantin (486, 515, 552 nm) varlığından dolayı oluşmaktadır. Karotenler sınıfına ait rodopsin varlığında bakteri kırmızımsı kahverengi pigment üretir. Okenone (521 nm) varlığında mor-kırmızı pigment oluşur. Sferoiden (450, 482, 514 nm) varlığında yeşil veya kahverengimsi bir kırmızı pigment üretilir, indirgen mikroçevre koşulları altında yeşilimsi-kırmızı pigment oluşur (Asif ve diğ. 2021). Bu bakteriler tarafından üretilen bakteriyoklorofil pigmentinin UV- görünür bölge spektrofotometre absorpsiyonları 800 ile 850 nm arasındadır (Papagiannakis ve diğ. 2002). Karotenoidlerin işlevi, oksijen varlığında reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyen bakterioklorinler tarafından üretilen aşırı uyarma enerjisini dağıtmaktır. Bakteri kaynaklı pigmentler genellikle hayvan yemi olarak, kozmetik sanayide, ilaç sektöründe, gıdaların renklendirilmesinde ve biyomalzemelerin içeriğinde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel kaynaklı karotenoidlere kıyasla ekonomik sürdürülebilirlikleri nedeniyle bakteriyel kaynaklı karotenoid üretimi artmıştır (Montiel-Corona ve Buitrón, 2021).



Şekil 7.: Mor kükürtsüz bakterilerin metabolik yolları (Lu ve diğ. 2021)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

Hassas terazi (Denver Instrument, SI-234): Besiyerleri, reaktifler, çözeltiler için gerekli kimyasalların ölçümünde kullanılmıştır.

Vorteks (Dragon Lab, MX-F): DNA izolasyonu, PCR ve jel saflaştırma, biyokimyasal testler gibi karıştırma işlemlerinde kullanılmıştır.

Mikrosantrifüj (Wisd, CF-10): DNA izolasyonu, bakterilerin pelletlerinin toplanmasında kullanılmıştır.

Otoklav (Nüve, OT40L): Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve diğer laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonunda kullanılmıştır.

İnkübatör (Nüve, EN 400): Işık kaynağı ile birlikte bakterilerin inkübasyonu için kullanılmıştır.

Soğutmalı inkübatör (Nüve, ES 120): Bakterilerin büyütülmesi için kullanılmıştır.

UV-Vis spektrofotometre (SHIMADZU, UV-1201V): Optik yoğunluk belirlenmesinde kullanılmıştır.

PH metre (WTW InoLab, PH720): Besiyerleri, reaktifler, çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında kullanılmıştır.

Mikro hacim spektrofotometre (Epoch, BioTek): DNA/RNA miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır.

Real Time PCR (Applied Biosystems,™ StepOnePlus™): Bakterilerin izlenmesi ve gen ifade çalışmalarında kullanılmıştır.

Mikroskop (Olympus, CX21): Bakterilerin Gram reaksiyonu ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Gradient thermal cyler PCR (Optimus 96G, QLS): Bakterileri DNA'larının çoğaltılması ve bitki cDNA dönüşümü çalışmalarında kullanılmıştır.

Jel elektroforez tankı sistemi (Major Science, ME7-10): PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve bant doğrulanması için kullanılmıştır.

Elektroforez güç kaynağı (Major Science MP-30V): Agaroz jel elektroforezi çalışmalarda kullanılmıştır.

Jel görüntüleme sistemi (gelLITE, Cleaver Scientific): Agaroz jel görüntülenmesinde kullanılmıştır.

Mikropipet seti (Weightlab Instruments, Türkiye): Mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik çalışmalarda sıvı aktarım işlemlerinde kullanılmıştır.

Test kabini (Nüve TK 120): Bitkilerin büyütülmesinde kullanılmıştır.

Fotometre (Spectroquant® Nova 60A, Merck): Azot ve fosfat miktarlarının ölçülmesinde kullanılmıştır.

3.2 YÖNTEM

Bu çalışmada bakterilerin zenginleştirilmesi ve büyütülmesi için, ATCC PMSY 2657 (Tablo 2), Rhodospirillaceae (Tablo 3), AT (Tablo 4), azotsuz (Tablo 5), Pikovskaya (Tablo 5), Glutamat-asetat (GA) (Tablo 7), Winogradsky (Tablo 8) besiyerleri kullanılmıştır. ATCC PMSY 2657, Rhodospirillaceae ve AT besiyerleri için tek bir karbon kaynağı kullanılmıştır. Besiyerleri için tablolarda verilen kimyasallar hassas terazi yardımı ile tartılıp borosilikat 1 L'lik cam şişelerin içerisine aktarılmıştır. Hazırlanan üç besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakikalık sterilizasyon işleminden sonra, soğutulan besiyerlerinin üzerine steril 0,22 µm por çaplı membran filtre ile 1M sodyum asetat (2,7 g/10 mL) stok çözeltisinden 10 mL eklenmiştir.

Tablo 2.: ATCC PMSY 2657 besiyeri içeriği

	Kimyasallar	Miktar
Makro element çözeltisi	K ₂ HPO ₄ (0,5M) NaHPO ₄ (0,5M) (NH ₄)SO ₄ (%10) Konsantre Baz Na-Tiyosülfat (0,1M) Maya özütü Distile su	25 mL 25 mL 10 mL 1 mL 1 mL 3 g 928 mL
Konsantre baz çözeltisi	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O CaCl ₂ .2H ₂ O Nitriltriasetik asit MgSO ₄ (susuz) FeSO ₄ .7H ₂ O Distile su	0,0185 g 6,7 g 20 g 28,9 g 198 g 1000 mL
Hutner'in metal çözeltisi	EDTA ZnSO ₄ .7H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O MnSO ₄ .H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O Distile su	2,50 g 10,95 g 5,00 g 1,54 g 0,39 g 0,25 g 0,18 g 800 mL

Tablo 3.: Rhodospirillaceae besiyeri içeriği

	Kimyasallar	Miktar
Makro element çözeltisi	Maya özütü	0,3 g
	(NH ₄)-asetat	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
	NaCl	0,4 g
	NH ₄ Cl	0,4 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g
	L-sisteinümklorit	0,3 g
	Na ₂ -süksinat	1 g
	Resazurin (%0,1) Vitamin B12 çözeltisi (10 mg/100mL)	0,5 mL 0,04 mL
	İz element çözeltisi SL-6	1 mL
	Fe (III) sitrat çözeltisi (%0,1)	5 mL
	Distile su	1000 mL
	İz element çözeltisi SL-6	MnCl ₂ .4H ₂ O
CuCl ₂ .2H ₂ O		0,01 g
NiCl ₂ .6H ₂ O		0,02 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0,03 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O		0,1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,2 g
H ₃ BO ₃		0,3 g
Distile su		1000 mL

Tablo 4.: AT besiyeri içeriği

	Kimyasallar	Miktar
Makro element çözeltisi	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g
	Na ₂ SO ₄	0,7 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	NH ₄ Cl	1 g
	NaHCO ₃	3 g
	İz element çözeltisi	1 mL
	Vitamin çözeltisi	1 mL
	Distile su	1000 mL
İz element çözeltisi SLA	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,01 g
	Na ₂ MoO ₄	0,03 g
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,07 g
	H ₃ BO ₃	0,1 g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25 g
	ZnCl ₂	0,5 g
	FeCl ₂ .4H ₂ O	1,8 g
	Distile su	1000 mL
Vitamin çözeltisi	Biotin	0,01 g
	pidoksolium hidroklorit	0,01 g
	Ca-pentatenat	0,01 g
	p-aminobenzoikasit	0,02 g
	Tiamin diklorit	0,03 g
	Vitamin B12	0,005 g
	Distile su	100 mL

Çalışmada bakterilerin azot fiksasyonu yeteneklerinin belirlenmesi için azotsuz besiyeri (Yang ve Ting, 1978) kullanılmıştır. Azotsuz besiyeri için Tablo 5’te verilen kimyasallar hassas terazi ile tartıldıktan sonra cam beher içerisinde dökülmüştür ve bir litre su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyerinden 15 mL’lik falkon tüpleri içerisine 7,5 mL aktarılmıştır. Hazırlanan içerik otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Tablo 5.: Azotsuz besiyeri içeriği

Kimyasallar	Miktar
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,001 g
FeCl ₂ .4H ₂ O	0,003 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
Distile su	1000 mL

Çalışmada bakterilerin fosfat çözüldürme yeteneklerinin belirlenmesi için Pikoskavaya’nın sıvı besiyeri kullanılmıştır (Wang ve diğ. 2017). Pikoskavaya’nın besiyeri için Tablo 6’da verilen kimyasallar cam erlen içerisinde karıştırıldıktan sonra içeriğin tamamen çözünebilmesi için kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Hazırlanan içerik otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Tablo 6.: Pikoskavaya’nın besiyeri

Kimyasallar	Miktar
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
KCl	0,2 g
Maya özütü	0,5 g
NH ₄ SO ₄	0,5 g
CaSO ₄	5 g
Dekstroz	10 g
MnSO ₄	0,0001 g
FeSO ₄	0,0001 g
Distile su	1000 mL

Bakterilerin 5-aminolevülinik asit üretim potansiyeli için GA besiyeri (Torpee ve diğ. 2021) kullanılmıştır. GA besiyeri için Tablo 7’de verilen kimyasallar kullanılarak hazırlanan besiyeri 15 mL’lik falkon tüplerine 7,5 mL olacak şekilde aktarıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Tablo 7.: Glutamat-asetat besiyeri içeriği

Kimyasallar	Miktar
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
C ₅ H ₈ NNaO ₄	2 g
Glukoz	10 g
Distile su	1000 mL

Bakterilerin indol-3-asetik asit (IAA) üretimi potansiyeli için Winogradsky besiyeri (Rahman ve diğ. 2010) kullanılmıştır. Winogradsky besiyeri için Tablo 8’da verilen kimyasallar 50 mL besiyeri için tartılmıştır. Besiyeri içeriğine 100 mg/L L-triptofan (TRP) eklenmiştir. Tüm kimyasallar karıştırıldıktan sonra, içerik 15 mL’lik falkon tüplerine 7,5 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Tablo 8.: Winogradsky besiyeri içeriği

	Kimyasallar	Miktar
Makro element çözeltisi	Maya özütü	0,05 g
	CaCO ₃	0,1 g
	Sükroz	15 g
	Konsantre tuz çözeltisi	5 mL
	Distile su	1000 mL
Konsantre tuz çözeltisi	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
	MnSO ₄ .4H ₂ O	1 g
	Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	1 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	25 g
	NaCl	25 g
	KH ₂ PO ₄	50 g
	Distile su	1000 mL

A. thaliana bitkisinin sulanması için Hoagland çözeltisi (Kaur ve diğ. 2016) hazırlanmıştır. Hoagland çözeltisi için Tablo 9’da verilen kimyasallar (iz element ve Fe-EDTA stok çözeltisi haricinde) tartıldıktan sonra 1L’lik borosilikat cam şişe içerisine aktarılmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklav cihazında sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkan çözelti soğutulduktan sonra, 1 mL iz element çözeltisi ve Fe-EDTA stok çözeltisi steril filtreden geçirilerek ana çözeltiliye eklenmiştir.

Tablo 9.: Hoagland çözeltisi içeriği

	Kimyasallar	Miktar
Makro element çözeltisi	İz element	1 mL
	FeEDTA	1 mL
	KH ₂ PO ₄	2 mL
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mL
	KNO ₃	5 mL
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	7 mL
	Distile su	1000 mL
İz element çözeltisi	NaMoO ₄	0,025 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 g
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8 g
	H ₃ BO ₃	2,8 g
	Distile su	1000 mL
	FeEDTA stok çözeltisi	FeSO ₄ .7H ₂ O
Na ₂ EDTA		10,4 g
KOH		56,1 g
Distile su		1000 mL

3.2.1 Winogradsky kolonunun oluşturulması

Mor kükürtsüz bakteri izolasyonu için Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi havuz sedimenti, Pamukkale Üniversitesi Gölbağçe havuz sedimenti ve bahçe toprağı, Pamukkale Üniversitesi Botanik Bahçesi havuz sedimenti olmak üzere dört farklı yerden aseptik koşullar altında örnekler toplanmıştır. Laboratuvara getirilen örneklerden öncelikle taş ve diğer materyaller ayıklanmıştır. 100 g çamur içerisine, organik tuzlar olarak 1'er g CaSO₄ ve CaCO₃, organik besin kaynağı olarak 400 µL egg-yolk, karbon kaynağı olarak küçük parçalara ayrılmış gazete kağıdı ve kutu parçaları eklenmiştir (Sridharan ve diğ. 2021). Eklenen tüm materyaller, temiz bir leğen içerisinde homojen bir dağılım olana kadar karıştırılmıştır. Filtre havalandırma kapaklı 75 cm²'lik steril polistiren hücre kültürü şişesi içerisine, hazırlanan çamur örneğinden ¼ oranında eklenmiştir. Şişe içerisinde kalan kısmın 2/3'ü materyal eklenmemiş çamur örneği eklenmiştir. Steril filtre havalandırma kapaklı polistiren hücre kültürünün en üst kısmına göl suyu doldurulmuştur. Hava alacak şekilde kapatılan şişeler güneş ışığı altında 5-6 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Oluşturulan Winogradsky kolonu belirli aralıklarla kontrol edilmiştir.

3.2.2 Winogradsky kolonunda gelişen mor bakterilerin uygun besiyerinde üretilmesi ve saflaştırılması

Mor kükürtsüz bakteriler için zenginleştirme ortamları olan ATCC PMSY 2657, Rhodospirillaceae ve AT besiyerleri olmak üzere farklı besiyeri kullanılmıştır. Bunun için, inkübasyon sonunda Winogradsky kolonu filtre havalandırma kapaklı polistiren hücre kültürü şişesi steril bir maket bıçağı yardımıyla açıldıktan sonra, Winogradsky kolonunda gelişen mor bakterilerin bulunduğu çamur zonları steril bir spatül yardımı ile toplanarak alınmıştır. Alınan çamur örnekleri homojen şekilde karıştırıldıktan sonra, önceden hazırlanmış 10 mL'lik tüpler içerisindeki sıvı besiyerlerine aynı miktarda aktararak 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) anaerobik koşulda 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca bakterilerin gelişimleri besiyerindeki renk oluşturmalarına göre izlenmiştir. Süre içerisinde pembe, kırmızı veya bordo renk açısından en iyi üremenin gözlemlendiği ATCC PMSY 2657 besiyeri mor kükürtsüz bakteriler için en uygun ortam olarak seçilmiştir. Seçilen besiyerinde pigment üretimi başladığında ATCC PMSY 2657 besiyerinin içerisine 150 mM NaCl eklenerek 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tuz varlığında üreyen bakterileri saflaştırmak amacıyla 150 mM NaCl eklenen ATCC PMSY 2657 agar besiyerine çizgi ekimi yapılmıştır. Petrilere ekilen bakteriler 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

ATCC PMSY 2657 agar petrilere pigment ve morfolojik olarak ayrılan bakteriler, steril Nutrient Agar besiyeri petrilere çizgi ekimi yapılarak aynı şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem bakterilerin saf olduklarına emin olana kadar gerçekleştirilmiştir. Saflığından emin olunan bakterilerin morfolojik yapısının ve hücre duvarı Gram reaksiyonlarının belirlenmesi için Gram boyama yöntemi kullanılmıştır. Kristal viyole boyasından hassas terazi vasıtasıyla 5 g tartıldıktan sonra 50 mL distile su içerisinde iyice çözdürülmüştür. Boya iyice karıştırıldıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Bazik fuksin boyasından hassas terazi vasıtasıyla 1 g tartıldıktan sonra 50 mL distile su içerisinde iyice çözdürülmüştür. Boya iyice karıştırıldıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.3 İzolatların azot fiksasyonu yeteneklerinin belirlenmesi

Azot fiksasyonu çalışmalarında azotsuz sıvı besiyeri kullanılmıştır (Tablo 5). Taze kültürler PBS ile homojen hale getirildikten sonra mikrosantrifüj yardımı ile 5000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Daha sonra süpernatant dökülerek tekrar PBS çözeltisi eklendikten sonra aynı işlem tekrar edilerek hücreler iki defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonu UV-Vis spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak 0,5 optik yoğunluğa (OD) ayarlanmıştır. Bu sayede her bir bakteri için hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Her bir bakteri süspansiyonundan 100'er µL alınarak, içerisinde 10 mL azotsuz sıvı besiyeri bulunan kapaklı cam tüplere aktarılmıştır daha sonra, tüpler 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda azotsuz sıvı besiyerinde üreyen bakteriler mikrosantrifüj yardımıyla 8000 rpm'de 15 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Bakterilerin ürettiği inorganik azot içeriği ve miktarlarının belirlenmesi için Spectroquant® amonyum kiti (Merck, Almanya) ile fotometrik yöntem kullanılmıştır (Sakpirom ve diğ. 2017). Test için, süpernatanttan 5 mL alınarak steril cam tüp içerisine aktarılmıştır. Örnek üzerine 0,6 mL NH₄-1 çözeltisi eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Kit içerisinde yer alan NH₄-2 şişesindeki mavi kaşık ile bir ölçek toz halindeki kimyasal karışım içerisine eklenmiştir. Toz tamamen çözünene kadar hızlıca karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Cam tüp içerisine NH₄-3 reaktifinden 4 damla damlatıldıktan sonra karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım yarı mikro kuvars küvete aktarılarak fotometre vasıtasıyla NH₄-N ve NH₄⁺ değerleri ölçülmüştür.

3.2.4 İzolatların fosfat çözme yeteneklerinin belirlenmesi

Fosfat çözme yeteneği için Pikovskaya'nın besiyeri kullanılmıştır. İzolatların taze kültürleri iki defa PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra 540 nm dalga boyunda 0,5 OD olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Optik yoğunluğu ayarlanmış bakteri süspansiyonlarından 100 µL alınarak, 10 mL Pikovskaya'nın sıvı besiyerine aktarılmıştır. Bakteriler 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde üreyen bakteriler 20 dakika boyunca 8000

rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant besiyerinde çözünmüş halde bulunan fosfat bileşiklerini belirlemek için kullanılmıştır. Çözünmüş inorganik fosfatı belirlemek için, Spectroquant® Fosfat test kiti (Merck, Almanya) kullanılmıştır (Nookongbut ve diğ. 2019). Test için süpernatanttan 5 mL alınarak steril cam tüp içerisine aktarılmıştır. PO₄-1 reaktifinden test tüpü içerisine 5 damla damlatılmıştır ve karıştırılmıştır. PO₄-2 reaktifi içerisnde bulunan kaşık ile bir ölçek toz cam tüp içerisine eklenmiştir. Toz tamamen çözülene kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım yarı mikro kuvars küvete aktarılarak fotometre vasıtasıyla fotometrede PO₄-P, PO₄³⁻, P₂O₅ değerleri ölçülmüştür.

3.2.5 İzolatların 5-Aminolevulinik asit (ALA) üretim potansiyellerinin belirlenmesi

ALA üretim potansiyeli için Glutamat-Asetat (GA) besiyeri kullanılmıştır. Bu çalışmada 18 mL GA besiyeri içeren vida kapaklı falkon tüpünün içerisine 2 mL sıvı besiyerinden alınan bakteri inokulumu eklenmiştir. Bakteriler 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından bakteriler, 15 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra 1 mL süpernatant, 2 mL 1M sodyum asetat tamponu (pH 4,7), ve 50 mL asetilaseton ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 15 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra, karışımları içeren test tüpleri hemen soğutulmuştur. Test tüplerinin içerisine taze halde hazırlanmış 3,5 mL modifiye Ehrlich reaktifi (p-dimetilaminobenzaldehit (DMAB) 1,25 g, 50 mL %95'lik etanol, 50 mL hidroklorik asit (HCl)) eklenmiştir. Test tüplerinde pembe-kırmızı renk değişimine bağlı olarak ALA üretim potansiyeli kaydedilmiştir (Nunkaew ve diğ. 2015).

3.2.6 İzolatların indol-3-asetik asit (IAA) üretim potansiyelinin belirlenmesi

İzolatların IAA üretim potansiyelinin belirlenmesi için Winogradsky'nin besiyeri (Tablo 8) içerisine 100 mg triptofan eklenerek modifiye besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan 10'ar mL steril besiyerleri üzerine her bir bakteri

kültürlerinden 2'şer mL eklenmiştir. Bakteriler 30°C'de ışık altında (tungsten lambası 350 lux) 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besiyeri içerikleri 10,000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlardan 1'er mL alınarak, üzerlerine taze hazırlanmış 3 mL Salkowski reaktifi (0,5 M FeCl₃ 0,8 g/mL, 10 mL %35'lik HClO₄) eklenerek çalkalanmıştır. Elde edilen karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortama bırakılmıştır (Rahman ve diğ. 2010). IAA üretim potansiyelinin değerlendirilmesi için standart eğri oluşturulmuştur

3.2.7 İzolatlardan genomik DNA izolasyonu

İzolatların moleküler biyolojik olarak tanılanması için genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonu için ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılmıştır. Bu amaçla; işlemlere başlamadan önce kit protokolünden uygun görüldüğü şekilde optimum performans için, Genomik Lizis tamponuna %0,5'lik beta-merkaptolanol (v/v) eklenmiştir. Yaklaşık olarak 50 mg yaş ağırlığa sahip bakteriyel hücreler (yaklaşık 10⁹ bakteri hücresi) 200'er µL PBS tamponu (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L) ile yeniden süspansiyon edilerek BashingBead™ Lizis tüplerine aktarılmıştır. Ardından tüpler üzerine 750'şer µL Lizis çözeltisi eklenmiştir. Sızıntıyı önlemek için tüp kapağı sıkıca kapatılmıştır. BashingBead™ Lizis tüpleri vorteks yardımıyla maksimum hızda en az 5 dakika boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 400'er µL alınarak, toplama tüpüne yerleştirilmiş Zymo – Spin IV spin filtrelerine aktarılmış ve 8000 rpm'de 1 dakika boyunca çöktürülmüştür. Toplama tüplerinde biriken filtratlar üzerine 1200'er µL Fungal/bakteriyel bağlanma tamponu ilave edilmiştir. Bu aşamadan elde edilen karışımlardan 800'er µL alınarak yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş Zymo – Spin IIC kolonlarına aktarılmıştır. Daha sonra tüpler 11000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Daha sonra bir önceki basamaktaki işlemler tekrarlanmıştır. 200 µL DNA yıkama-öncesi tamponu yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş Zymo – Spin IIC kolonlarına aktarılmış ve 11000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. 500 µL Fungal/bakteriyel DNA yıkama tamponu Zymo – Spin IIC kolonlarına aktarılmış ve yine 11000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Zymo – Spin IIC kolonları 1,5 mL'lik temiz mikrosantrifüj tüplerine

yerleştirildikten sonra, 30'ar μL DNA toplama tamponu doğrudan kolonlar içerisine ilave edilmiştir. Daha sonra tampon 11000 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüjlenerek elde edilen DNA'lar çöktürülmüştür. Elde edilen genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçümleri mikro-hacim spektrofotometre cihazı vasıtasıyla yapılmıştır. Cihazın saflık ve miktar kontrolü Take3 Mikro hacimli plakaya 1 μL DNA eklenerek yapılmıştır. DNA'ların miktar ve saflık analizleri 260/280 nm dalga boyu ölçümleriyle yapılmıştır.

3.2.8 İzolatların genomik DNA'larının *in vitro* çoğaltılması

İzole edilen genomik DNA'ların *in vitro* koşullarda sentetik olarak çoğaltılması için konvansiyonel PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) cihazı kullanılmıştır. İzolatların moleküler biyolojik tanımlanmasında bakteriler için korunmuş bölge olan 16S rRNA kodlayan DNA bölgesini hedef alan 27F – 1491R evrensel primer seti kullanılmıştır (Tablo 10). DNA'ların çoğaltılmasında Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x) kiti (GRiSP, Portekiz) kullanılmıştır. PCR bileşenleri ve reaksiyon basamakları uygulanırken kullanılan kitin içeriği Tablo 11'de belirtilmiştir.

Tablo 10.: Konvansiyonel PCR'da kullanılan primer setleri (Frank ve diğerleri, 2008)

Primerler	Oligonükleotitler (5'-3')
27-F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
1492-R	AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA

Tablo 11.: PCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve bileşenlerin miktarları

Bileşen	Miktar
Xpert Fast Hotstart Mastermix	12,5 μL
Forward primer (5 pmol/ μL)	2 μL
Reverse primer (5 pmol/ μL)	2 μL
Kalıp DNA	0,25 - 10 μL
Ultra saf su	25 μL 'ye tamamlanır

Çalışmaya başlamadan önce, konvansiyonel PCR için kullanılan kite bağlı kalınarak PCR cihazında protokol oluşturulmuştur (Tablo 12). PCR için reaksiyon karışımı işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüpleri konvansiyonel PCR cihazının kuyucuklarına yerleştirilerek PCR protokolü uygulanmıştır.

Tablo 12.: PCR protokolü

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk denütarasyon	1	3 dakika	95°C
Denütarasyon (Ayrılma)	40	15 saniye	95°C
Annealing (Bağlanma)		15 saniye	55°C
Elongasyon (Uzama)		20 saniye	72°C
Son Uzama	1	3 dakika	72°C
Soğutma	-	Sınırsız	4°C

3.2.9 Agaroz jel elektroforezi ve PCR ürün kontrolü

DNA'ların agaroz jel elektroforez işlemi ile doğrulanması için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel, 1 g agaroz (BIOMAX) tartılarak temiz bir erlen içerisine konulduktan sonra üzerine 100 mL 1x Tris Asetik Asit (TAE) tamponu eklenmiştir. Daha sonra, agarozun TAE tamponu içerisinde homojen şekilde erimesi için mikrodalga fırında (600 Watt) polimer tamamen eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Elektroforez tankında kullanılan tepsiye uygun bir tarak yerleştirildikten sonra, hazırlanan agaroz hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Dökülen jelin oda sıcaklığında donması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra tepsi kenarındaki silikonlar dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve tank içerisine yerleştirilmiştir. Ardından, daha önceden hazırlanan 1x TAE tamponu agaroz jel yüzeyinin üzerini kaplayacak şekilde ilave edildikten sonra tarak dikkatli bir şekilde jelden alınmıştır.

Konvansiyonel PCR ile elde edilen PCR ürünleri için, jeldeki her bir kuyucuğa 3 µL DNA, 1 µL yükleme boyası karıştırılarak yüklenmiştir. DNA'nın boyutlandırmasını yapabilmek amacıyla belirteç olarak 10 kb'lık DNA Ladder (GRISP universal ladder, Portekiz) kullanılmıştır. DNA ladder'dan alınan 4 µL, 1 µL yükleme boyası ile karıştırılarak jelin başındaki ve sonundaki kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağına bağlanan elektroforez tankına 90V güç uygulanarak, agaroz jele yüklenen örnekler 45 dakika boyunca karanlıkta yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jel görüntüleme sistemine dikkatli bir şekilde taşınmıştır. Jel görüntüleme sisteminde elektroforez işlemi süresince yürümüş olan DNA ladder ve karşılık gelen PCR ürün bantları karşılaştırılarak doğrulama yapılmıştır.

3.2.10 PCR ürününün temizlenmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra doğruluğu tespit edilen PCR ürünleri uygun bir kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Agaroz jelden PCR ürünlerinin saflaştırılması için EcoPURE PCR/Gel Purification kiti (EcoTech Biotechnology, Türkiye) kullanılmıştır. Bu aşamada; her 50 µL PCR ürününe 250 µL EcoPURE bağlanma tamponu eklenmiştir. PCR ürün hacmi 50 µL'den az olduğu için, toplam hacim steril ultra saf su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışımın üzerine 100 µL izopropanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Bir toplama tüpüne yerleştirilen EcoPURE kolonu içerisine karışım aktarılmıştır. Karışım maksimum hızda 30 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Kolona biriken sıvı atılmıştır ve EcoPURE kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. EcoPURE kolonuna 700 µL EcoPURE yıkama tamponu eklenmiştir. Maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüjlenmiştir. Kolona biriken sıvı atılmıştır. Kalan yıkama tamponunu tamamen çöktürmek için boş EcoPURE kolonu maksimum hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. EcoPURE kolonu steril bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. EcoPURE kolonunun merkezine 30 µL EcoPURE elüsyon tamponu eklendikten sonra kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler maksimum hızda 30 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda EcoPURE kolonu atılan tüpler bulunan temizlenmiş PCR ürünleri -20°C'de saklanmıştır.

3.2.11 İzolatların DNA'larının dizilenmesi ve filogenetik ağaç oluşturulması

Yukarıda bahsedilen tüm işlemlerin sonunda temizlenerek elde edilen PCR ürünleri hizmet alımı (BMLabosis, Türkiye) ile Sanger dizileme yapılmıştır. Dizilenen izolat DNA'ları Finch TV (Geospiza) ve DNA Dragon yazılımı (Version 1.6.0, SequentiX-Digital DNA Processing, Germany) programları kullanılarak temizlenmiştir. Temizlenerek elde edilen DNA dizileri, Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) web sitesinde BLAST programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak % dizi benzerlik açısından değerlendirilerek bakterilerin tür tayinleri yapılmıştır. Daha sonra Mega 11 programı

(Tamura ve diğ. 2021) kullanılarak Neighbor Joining metoduyla 1000 Bootstrap tekrar yapılarak izolatlarla ait filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.2.12 *A. thaliana* büyütülmesi

Tuz stresi çalışmasında genom dizilimi aydınlatılmış model bitki olan *A. thaliana*'nın yaban tipi (Columbia-0) kullanılmıştır. Bitkiler Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Laboratuvar'ından temin edilmiştir. Bitki büyütülmesinde; *A. thaliana* bitki tohumları toprağa ekilmeden önce sterilizasyon ve vernilizasyon işlemi uygulanmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyon işlemi, izolasyon odasında gerekli hava ve yüzey sterilizasyonları yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Dış kaynaklı mikrobiyal bulaş riskini engellemek için *A. thaliana* tohumları kullanılmadan önce %70 etanolde 1 dakika bekletilmiştir. İşlem sonrasında tohumlar steril distile suda 5 kez yıkanmıştır. Ardından %4 NaOCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde 10 dakika tutulduktan sonra, steril distile suda 5 kez daha yıkanarak steril edilmiştir. Tohumlar çimlenmenin senkronizasyonu için vernilizasyon amaçlı 4°C'de 72 saat bekletilmiştir. Vernilizasyon işlemi tamamlanan *A. thaliana* tohumları her viyole 4 tohum olacak şekilde toprak yüzeyine ekilmiştir. İki gün çimlenmenin ardından bitkiler birkaç hafta süreyle büyümeye bırakılmıştır. Daha sonra, her viyolde eşit büyüyen tek bir bitki kalacak şekilde viyollerdeki bitkiler azaltılmıştır. Büyüme toprağı olarak torf:vermikülit:perlit (7:2:1) kullanılmıştır. Bitkiler, *A. thaliana* için standart koşullar altında ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık, 22°C sıcaklık ve %60 bağıl nem) büyütülmüştür. Süreç içerisinde bitkiler üç günde bir steril deiyonize suyla, haftada bir kere steril ½ kuvvet Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır.

3.2.13 *A. thaliana* rizosferine bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması

Uygun koşullar altında laboratuvara getirilen bitkiler 10 gün süreyle standart koşullar altında test kabininde büyütülmeye devam edilmiştir. Bitki yaşam döngüsünün 39. gününde (Şekil 1) tuz ilavesi ve mor kükürtsüz bakteri inokülasyonu yapılarak süreç içerisinde topraktan örneklemeler yapılmıştır. Bu aşamada; 1- kontrol bitkisi, 2- sadece NaCl eklenen bitki, 3- sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen

bitki ve 4- hem NaCl eklenen hem de mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitki olmak üzere 4 farklı parametre ile çalışılmıştır. Bitkilerin sulama sonrası içeriklerinin karışmaması için viyollerin altlarına steril petri kabı yerleştirilmiştir. Bitkiler bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması test kabini içerisinde standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bitki çalışmasında her parametre ikişer örnek ile yapılmıştır. Sadece bakteri inoküle edilen bitki ile NaCl ve mor kükürtsüz bakteri içeren viyoller için taze bakteri kültürlerinden alınarak UV-Vis spektrofotometre vasıtasıyla 540 nm dalga boyunda 0,5 OD'ye ayarlanmıştır. Optik yoğunluğu ayarlanan bakterilerden steril enjektör ile 1 mL çekilerek bitkinin kök kısmına doğru inoküle edilmiştir. Bu işlemde 1 mL bakteri süspansiyonu bitkinin kök kısmına eşit şekilde dağıtılmaya çalışılmıştır. Sadece NaCl ve mor kükürtsüz bakteri+NaCl içeren viyoller için tuz konsantrasyonu iki günde bir artırılmıştır. Yöntemde bitkiler başlangıçta 50 mM NaCl, 48. saatte 100 mM NaCl ve 96. saatte 150 mM NaCl içeren Hoagland çözeltisi ile tüm toprak ıslanana kadar viyol tabanından sulanmıştır. Bitkinin köküne ve yapraklarına zarar vermeden iki günde bir steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne toprak örnekleri DNA izolasyonu için 0,25 g mikrobiyal aktivite çalışması için 1 g alınmıştır. Bitkilerin her gün yaprak sayısı ve boyutu ölçülerek kaydedilmiştir. 120. saat sonunda sadece tuz parametresi uygulanan viyolde gözlemlenen yapraklardaki pigment azalması ve sararmasına bağlı olarak deney sonlandırılmıştır.

3.2.14 Toprakta mikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Deney setlerinde sadece mor kükürtsüz bakteri ve mor kükürtsüz bakteri+NaCl inoküle edilen topraktaki mikroorganizmaların metabolik aktivitesinin belirlenebilmesi için dehidrogenaz aktivitesi (DHA) analizi yapılmıştır (Casida, 1977). Topraktaki dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesi için 2,3,5 Trifenil tetrazolyum klorür (TTC) indirgenme yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde, her ölçüm içinde 1 g toprak test tüpüne alınmıştır. Ardından test tüpünün içerisine 0,1 g kalsiyum karbonat (CaCO₃) ve 1 mL %1'lik 2,3,5 TTC sulu çözeltisi eklendikten sonra tüpün kapağı kapatılarak çalkalanmıştır. Daha sonra tüpler 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler 1 dakika vortekslenmiştir. Ardından test tüpü 5000 rpm'de santrifüj cihazı ile çöktürülmüştür. Süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir tüp içerisine alındıktan sonra, süzöntü hacmi aseton eklenerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Sonuçlar

UV-VIS spektrofotometre vasıtasıyla 546 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

Dehidrogenaz aktivitesi için trifenil formazan standart eğrisi oluşturulmuştur. 1,3,5 trifenil formazan standart eğrisi için, 0, 5, 10, 20, 30 ve 40 µg'lık konsantrasyonlar kullanılmıştır. 1,3,5 trifenil formazan kimyasalından ana stok hazırlığı için 0,025 gram tartılarak 50 mL aseton ile tamamen çözdürülmüştür. Hazırlanan stoktan sırasıyla, 0,5 mL, 1 mL, 2 mL ve 4 mL alınarak 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Her bir falkon tüpü içerisine 8,3 mL Tris-HCl çözeltisi eklemiştir. Falkon tüpleri içerisine son hacim 50 mL olacak şekilde aseton eklenmiştir. 1,3,5 trifenil formazan standart eğrisi için hazırlanan solüsyonların absorbans değerleri 546 nm'de UV-Vis spektrofotometre cihazında ölçülmüştür (Alef ve Nannipieri, 1995).

3.2.15 *A. thaliana* yapraklarından toplam klorofil miktarının belirlenmesi ve kök uzunluklarının ölçülmesi

Çalışmaya dahil edilen her dört grup bitkisi için klorofil ekstraksiyonu (Loubser ve Hills, 2020) yapılmıştır. Bu amaçla, otoklavda steril edildikten sonra soğutulmuş bir porselen havan ve sıvı nitrojen kullanılarak her çalışma grubundan bitkinin tüm yaprakları ince bir toz haline getirilmiştir. Daha sonra, bir mikrosantrifüj tüpüne toz halindeki her bir örnekten yaklaşık 50 mg aktararak, örneklerin üzerine 1 mL Dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Bu karışım tamamen karışana kadar vortekslendikten sonra 11000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Pellet, 1 mL DMSO ile iki kez yeniden muamele edilmiştir ve süpernatant sıvıları birer falkon tüpünde birleştirilmiştir. Numunelerin absorbansı, DMSO körüne karşı 645 nm ve 663 nm'de ölçülmüştür.

A. thaliana bitkisinin kök uzunluğunun ölçülebilmesi için, tuz stres genlerinin ifade düzeylerini belirlemek amacıyla analizi yapılacak olan bitkiler topraktan nazikçe alınmıştır. Devamındaki bitki kökleri distile su ile yıkandıktan sonra bir cetvel yardımıyla dikkatli bir şekilde ölçülmüştür.

3.2.16 *A. thaliana*'dan toplam RNA izolasyonu

Gen ifade çalışmaları için kullanılacak olan bitkiler topraktan nazikçe çıkarılmıştır. Steril distile su ile köklerinde kalan topraklar nazik bir şekilde yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Steril ve soğutulmuş bir porselen havan ve sıvı azot bitki dokularını parçalamak için kullanılmıştır. Havan içerisine alınan bitkinin üzerine dewar sıvı azot taşıma kabı yardımıyla yavaş yavaş sıvı azot dökülürken, aynı anda bitki materyali dikkatli bir şekilde ezilmiştir. Bu işlem bitki toz haline gelene kadar tekrarlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce çalışma ortamı steril edilmiştir. Toplam RNA izolasyonu için Rapid Plant RNA izolasyon kiti (BIO BASIC, Kanada) kullanılmıştır. 50 mg ezilen tüm bitki örnekleri 1,5 mL RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne steril bir spatül yardımı ile aktarılmıştır. RNaz içermeyen steril pipet uçları kullanılarak 600 µL Rlyzis-P tamponu eklendikten hemen sonra ters-yüz edilerek karıştırılmıştır. Hücrelerin tamamen parçalandığından emin olmak için 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikrosantrifüj tüpü içerisine 60 µL PK tamponu ekledikten sonra birkaç kez ters-yüz edilerek karıştırılmıştır. Devamında mikrosantrifüj tüpleri -20°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpleri 12,000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Yeni bir RNaz içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpleri içerisinde süpernatant kısmı aktarılmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine 1/3 hacimde RNaz içermeyen saf etanol (%96) eklendikten sonra 30 saniye vortekslenmiştir. Devamında mikrosantrifüj tüpleri 20°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpü 4°C'de 5 dakika 13000 rpm'de santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısmı peletten dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Tüplere 1 mL RNaz içermeyen %75'lik etanol çözeltisi eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpü 10 kez nazikçe ters yüz edilerek iyice karıştırıldıktan sonra 1 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır ve bu adım bir kez tekrarlanmıştır. Pellet, mikrosantrifüj tüpü kapağı açık kalacak şekilde oda sıcaklığında 2-5 dakika süreyle hava yardımıyla kurutulmuştur. RNA peletini çözmek için mikrosantrifüj tüpü 30 µl RNaz içermeyen steril ultra saf su eklenmiştir. Elde edilen RNA'ların miktar ölçümü ve saflık kontrolleri mikro-hacim spektrofotometre cihazı vasıtası ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirilmiş izole edilen RNA örnekleri -80°C'de saklanmıştır.

3.2.17 Ters Transkriptaz PCR

Bu işlem için OneScript® Plus cDNA Synthesis kiti (Applied Biological Materials (abm) Inc., Kanada) kullanılmıştır. Kit içeriğinde kullanılan bileşenler (5x) RT tamponu, dNTP, primerler, toplam RNA ya da poly(A) + mRNA, OneScript® Plus RTaz, nükleaz içermeyen su) sulu buz üzerinde iyice çözdürülmüştür ve çalışma sulu buz ile doldurulmuş steril bir kap içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon başına kullanılan bileşenler ve miktarı Tablo 13'te gösterilmiştir. Çalışma boyunca kit protokolüne bağlı kalınmıştır. Bileşenler belirtilen miktarlarda steril mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırılmıştır. Elde edilen karışımda gerekli reaksiyonların gerçekleşebilmesi için konvansiyonel PCR kullanılarak 55°C'de 15 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe etmiştir. İşlem bittikten sonra mikrosantrifüj tüpleri buz üzerinde soğutulmuştur. Örnekler -20 C'de saklanmıştır.

Tablo 13.: OneScript® Plus cDNA Synthesis kiti bileşen içeriği

Bileşen	Miktar
5x RT tamponu	4 µL
dNTP	1 µL
Primerler	1 µL
Toplam RNA ya da poly(A) + mRNA	Değişken (1 ng - 2 µg/reaks.)
OneScript® Plus RTase	1 µL
Nükleaz içermeyen su	20 µL'ye tamamlanır

Elde edilen cDNA'ların miktar ölçümü ve saflık kontrolleri mikro-hacim spektrofotometre cihazı vasıtasıyla 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.18 Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile tuz stres genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi

Dört bitkiden elde edilen cDNA'lar çalışmada kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Kullanılan gen bölgeleri; absisik asit sinyalleşmesinde rol oynayan RD29A ve RD29B genleri, ROS temizlenmesinde APX2 geni (Askorbat Peroksidaz 2) ve detoksifikasyon için GLYI7 geni (Glyoxalase I7), jasmonik asit biyosentezi ile ilgili LOX2 geni (Lipoxygenase 2) ve iyon homeostazıyla ilgili gen ifadesi için SOS1 (Salt Overly Sensitive 1) geni kullanılmıştır. *A. thaliana* için erken tuz stresi genlerinin

ifadesi düzeyleri için özel primerler kullanılmıştır. Primerler Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14.: *A. thaliana*'nın erken tuz stresi genlerinin ifade düzeyi için kullanılan primerler

Primerler	Dizi (5'- 3')	Baz uzunluğu (baz çifti)	Referans
ACTIN2	TCCCTCAGCACATTCCAGCAGAT AACGATTCCCTGGACCTGCCTCATC	69	(Bu ve diğ. 2009)
RD29A	ATCACTTGGCTCCACTGTTGTTC ACAAAACACACATAAACATCCAAA GT	98	(Bu ve diğ. 2009)
RD29B	GGAGTGAAGGAGACGCAACAAG GGAATCCGAAAACCCCATAGTC	486	(Pinedo ve diğ. 2015)
LOX2	ATCAACGCTCGTGCACGCCA CCGCGGGTAAGCCTTCCTGG	142	(Pinedo ve diğ. 2015)
APX2	TGGTCGGATGGGACTCAAT AAGAGCCTTGTCGGTTGGT	196	(Chu ve diğ. 2019)
GLYI7	CTACGATCGAGCCAGCGTTC CCATGTCCAAACAACCACGC	225	(Pinedo ve diğ. 2015)
SOS1	CGTGAAGCAATCAAGCGGAAATT AAATTGGGTAGTGGATCCATTAAT ATCAGA	118	(Kant ve diğ. 2006)

Bu çalışmada gen ifade düzeylerinin belirlenmesi için Real-Time PCR cihazında çalışılmak üzere RealQ Plus 2x Master Mix Green High ROX™ (Ampliçon, Danimarka) kiti kullanılmıştır. Kit için Tablo 15'te verilen protokol uygulanmıştır. Kalıp cDNA'lar haricindeki tüm kit bileşenleri steril bir mikrosantifüj tüpü içerisine aktarıldıktan sonra nazikçe karıştırılarak 96 well plate içerisindeki kuyucuklara eşit hacimlerde aktarılmıştır. İlgili kuyucuklara kalıp cDNA'lar eklendikten sonra sızdırmaz film ile plate üzeri kapatılmıştır. Çalışma üçlü tekrarlar halinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma için oluşturulan PCR basamakları iki gruba ayrılmıştır. *Actin2*, *RD29A*, *LOX2*, *APX2* için oluşturulan protokol için; başlangıç denatürasyon adımı, 1 döngü olacak şekilde 95°C'de 10 dakika, amplifikasyon adımı toplam 45 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C'de 15 saniye, bağlanma 58°C'de 15 saniye, uzama 72°C'de 20 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi, 65°C'den 95°C'ye 0,3°C/15 saniye artışlarla gerçekleştirilmiştir. *RD29B*, *GLYI7*, *SOS1* için touchdown PCR protokolü uygulanmıştır. Başlangıç denatürasyon adımı, 1 döngü olacak şekilde; 95°C'de 10 dakika; amplifikasyon adımı, toplam 45 döngü olacak şekilde denatürasyon 95°C'de 15 saniye, bağlanma 60°C'den 43°C'ye 15

saniye, uzama 72°C’de 20 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi, 65°C’den 95’ye 0,3°C/ 15 saniye artışlarla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 15.: Real time PCR için bileşen içerikleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
RealQ Plus Master Mix 2x	12,5 µL
Primer F (10 µM)	0,5 µL (0,25 – 2 µL)
Primer R (10 µM)	0,5 µL (0,25 – 2 µL)
Kalıp DNA	Değişken
Ultra saf H ₂ O	25 µL’ye tamamlanır

3.2.19 Bitki rizosferinde bulunan mor kükürtsüz bakterilerin Real-Time PCR ile biyoizlemesi

Morfolojik ve moleküler biyolojik karakterizasyonu yapılan mor kükürtsüz bakteri izolatlarının bitki tuz stres çalışmalarının sürdürüldüğü topraktaki varlığı ve miktar analizleri yapılmıştır. Mor kükürtsüz bakterilere ilave olarak topraktaki toplam bakteri miktarları da belirlenmiştir. Bunun için belirlenen gen bölgeleri ile ilgili rizosferden alınan örneklerden biyoizleme işlemi Real-Time PCR ile yapılmıştır.

Bu çalışma için, bitki rizosferinden alınan toprak örneklerinden DNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonları için ZR Soil Microbe DNA Kit™ (Zymo Research, ABD) kullanılmıştır. Kit için protokol şu şekildedir; optimum performans için, Genomik Lizis Tamponuna %0,5’lik beta-merkaptotanol eklenmiştir. ZR BashingBead™ Lizis tüplerine her bir toprak numunesinden 250 mg olacak şekilde eklendikten sonra, tüpler üzerine 750’şer µL BashingBead™ tamponu eklenmiştir. Sızıntı olmayacak şekilde her bir tüp maksimum hızda 5 dakika karıştırılmıştır. ZR BashingBead™ Lizis tüpleri bir mikrosantrifüjde 11000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. 400 µL’ye kadar süpernatantı toplama tüpleri içindeki Zymo-Spin™ III-F filtrelerine aktarılmıştır ve 1 dakika boyunca 9000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Toplama tüplerindeki filtrata 1200 µL Genomik Lizis tamponu eklenmiştir. Karışımın 800 µL’sini yeni toplama tüpleri içindeki Zymo-Spin™ IICR kolonlarına aktarılmıştır ve 1 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Toplama tüplerindeki sıvı atılmıştır ve bir önceki adım tekrarlanmıştır. Yeni toplama tüpleri içindeki Zymo-Spin™ IICR kolonlarına 200 µL DNA ön yıkama tamponu eklenmiştir ve 1 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Zymo-Spin™ IICR

kolonlarına 500 µL gDNA yıkama tamponu eklenmiştir ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Zymo Spin™ IICR kolonları 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve doğrudan kolonların matrisine 30 µL DNA elüsyon tamponu eklenmiştir. DNA'yı koloni matrisinden almak için 11000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. DNA 1,5 mL mikrosantrifüj tüpleri içinde hazırlanmış Zymo-Spin™ III-HRC filtrelerine aktarılmıştır ve 3 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir. DNA'lar -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen RNA'ların miktar ölçümü ve saflık kontrolleri mikro-hacim spektrofotometre cihazı vasıtasıyla 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

NaCl+mor kükürtsüz bakteri ve sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitki rizosferindeki mor kükürtsüz bakteriler ile toplam bakterilerin miktar tayinleri için Real-Time PCR cihazı ile kantitasyon yöntemi çalışılmıştır. Tablo 15'te gösterilen PCR bileşenleri (kalıp DNA haricinde) steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Bu çalışmada mor kükürtsüz bakteriler için pufM557-pufMWAW (Lai ve diğ. 2017; Yutin ve diğ. 2005) ve toplam bakteriler için 338F-518R (Einen ve diğ. 2008) primerleri kullanılmıştır. Hazırlanan karışım 96 well plate (NEST, Çin) kuyucuklarına eşit miktarlarda dağıtılmıştır. Kalıp DNA'lardan 5 µL ilgili kuyucuklara aktarıldıktan sonra sızdırmaz film (Axygen, ABD) ile kuyucukların üstü kapatılmıştır. Çalışma üçlü tekrarlar halinde gerçekleştirilmiştir. Mor kükürtsüz bakterilere özgü primerler için PCR protokolü; başlangıç denatürasyon adımı 95°C'de 10 dakikada 1 döngüdür. Toplam 45 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C'de 15 sn, bağlanma 58°C'de 15 saniye, uzama 72°C'de 20 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi, 65°C'den 95°C'ye 0,3°C/15 saniye artışlarla gerçekleştirilmiştir. Toplam bakteriler için PCR protokolü başlangıç denatürasyon adımı 95°C'de 10 dakikada 1 döngüdür. Toplam 45 döngü olacak şekilde; denatürasyon 95°C'de 15 saniye, bağlanma 60°C'de 15 saniye, uzama 72°C'de 20 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi, 65°C'den 95°C'ye 0,3°C/15 saniye artışlarla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 16.: Mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri için kullanılan primeler

Primerler	Dizi (5'-3')	Baz uzunluğu (baz çifti)
pufM557	CGCACCTGGACTGGAC	280
pufMWAW	AYNGCRAACCACCANGCCCA	
338 F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	180
518 R	ATTACCGCGGCTGCTGG	

Standart eğri oluşturmak için, önceden elde edilen PCR ürünlerinden temizlenerek hazırlanan izolat ve toplam bakterilere ait oligonükleotitlerin kopya sayıları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$DNA \text{ kopya sayısı} = \frac{ng \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{baz çifti} \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

Formülde, ng: mikro-hacim spektrofotometre cihazında ölçülen DNA miktarı, $6,022 \times 10^{23}$: avogadro sabiti, baz çifti: kalıp DNA'nın uzunluğu, 1×10^9 : gram dönüşüm katsayısı, 660: 1 baz çifti iplikli DNA'nın ortalama kütleini ifade etmektedir. Bu formüle göre; mor kükürtsüz bakterilerin izolasyonunda anlatıldığı gibi Winogradsky kolonundan toplanan kırmızı-bordo renkte üreyen kısımlardan örnekleme yapılmıştır. Ardından örnekler için DNA izolasyon işlemi uygulanmıştır. Bakteriler için Tablo 16'da belirtilen primerler kullanılarak Real-Time PCR cihazında çoğaltılmıştır. Temizleme ve saflaştırma işleminden sonra PCR ürünüdeki DNA kopya sayısı $1,03 \times 10^{11}$ kopya DNA/ μ L olarak hesaplanmıştır. Standart eğri oluşturmak için hesaplanan DNA örneği bir seri seyreltme ile 10^{11} - 10^1 aralığında seyreltilmiştir.

Toplam bakteri için DNA kopya sayısı $4,56 \times 10^{10}$ olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde, toplam bakteri için standart eğri oluşturmada hesaplanan DNA örneği bir seri seyreltme ile 10^{10} - 10^1 aralığında seyreltilmiştir. Seyreltilen DNA'lar Tablo 16'da belirtilen primer setleri kullanılarak ayrı ayrı Real-Time PCR cihazında çalışılmıştır.

Standart oluşturmak için yapılan PCR çalışmaları ile elde edilen değerlere göre Real-Time PCR için verim hesaplamaları yapılmıştır PCR verim hesaplamasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$PCR \text{ verimi (E)} = ([10^{(-1/\text{eğim})}] - 1) \times 100$$

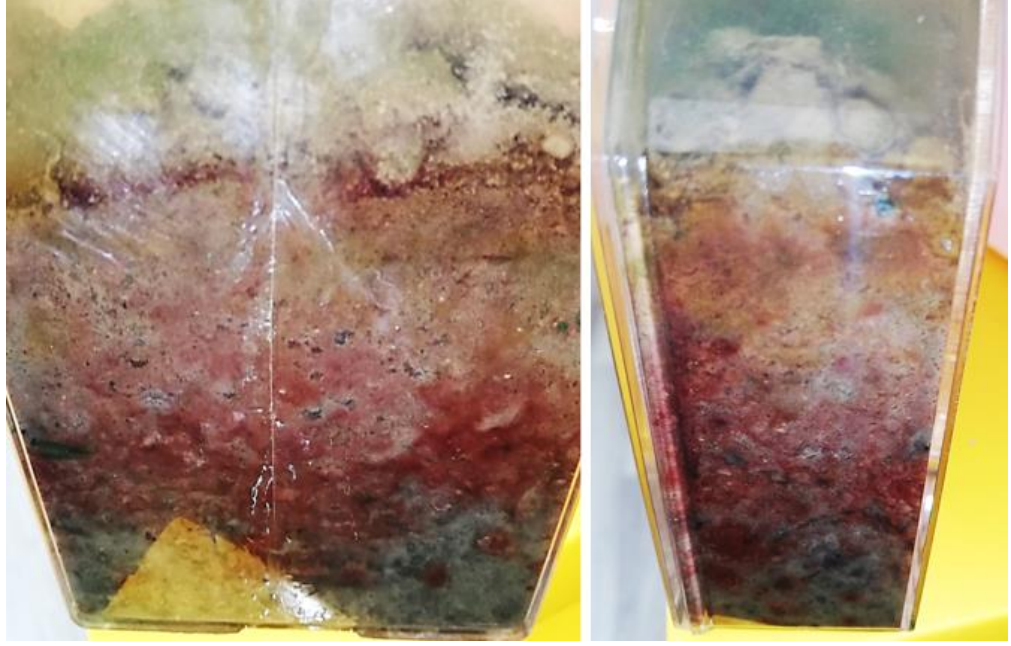
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mor kükürtsüz bakterilerin izolasyonu için Winogradsky kolonunun oluşturulması

Çalışmada kullanılan mor kükürtsüz bakterilerin izolasyonu için oluşturulan Winogradsky kolonunun başlangıç (Şekil 8) ve 6 haftalık süreç sonundaki (Şekil 9) kolondaki mor bakteri oluşumları gözlenmiştir.



Şekil 8.: Oluşturulan Winogradsky kolonunun birinci gün görseli

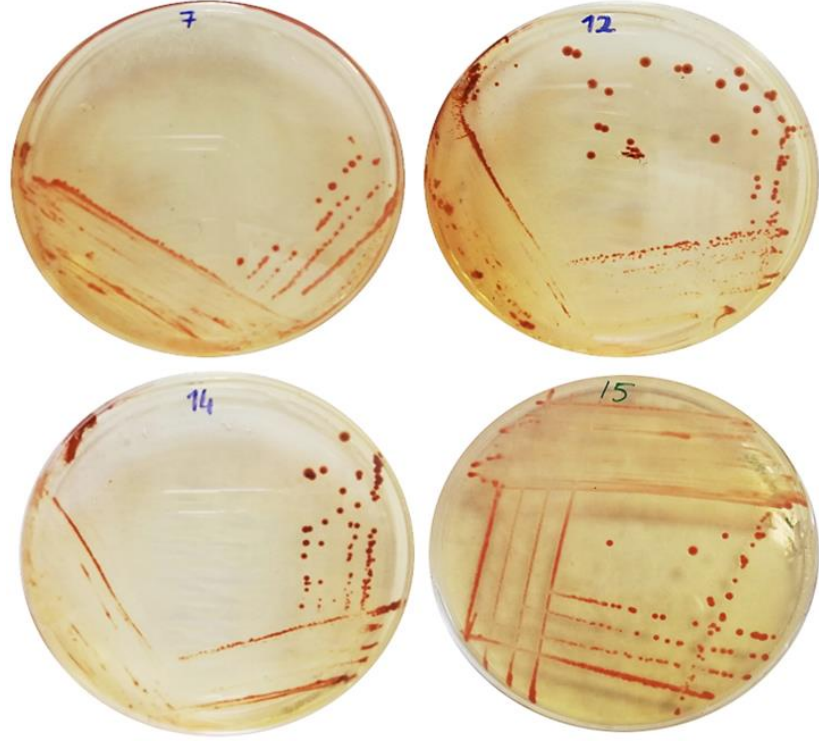


Şekil 9.: Winogradsky kolonunun 42. gün görseli

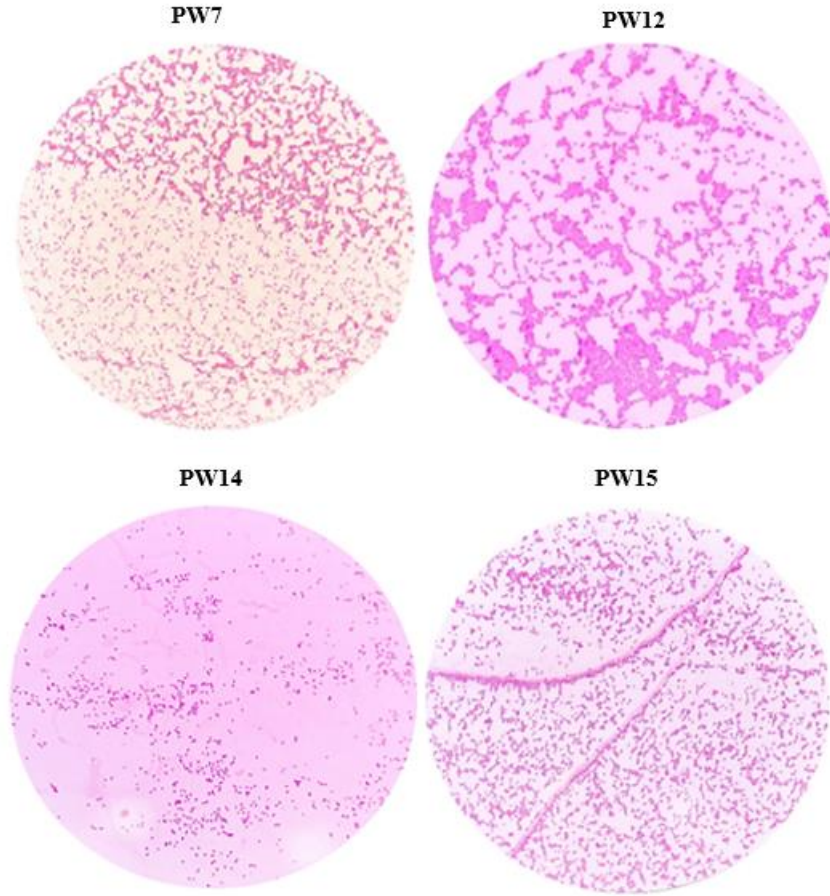
4.2 Winogradsky kolonunda üreyen bakterilerin saflaştırılması ve morfolojik olarak belirlenmesi

Sıvı besiyerlerinde üreyen bakteriler, saflaştırmak amacı ile Nutrient agar besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Bu işlem sonrasında farklı koloni morfolojisi ve renk değişimine göre bakterilerden tek koloni alınarak aynı işlem tekrarlanarak saflaştırılan izolatların petri görüntüleri Şekil 10’da gösterilmiştir.

Bakterilerin morfolojik yapısının ve hücre duvarı Gram reaksiyonlarının belirlenmesi açısından gram boyama yöntemi ile boyanan izolatların ışık mikroskobu altındaki gram reaksiyonları ve morfolojik görüntüleri 100x büyütme incelenmiştir (Şekil 11). Elde edilen izolatlara PW7, PW12, PW14 ve PW15 kodları verilmiştir.



Şekil 10.: Nutrient agar besiyerinde üreyen izolatlar



Şekil 11.: İzolatların ışık mikroskobu altındaki 100x görüntüsü

4.3 İzolatların azot fiksasyonu kabiliyetlerinin belirlenmesi

Koloni morfolojisi ve Gram boyama reaksiyonlarına göre seçilen izolatlar için yapılan azot fiksasyonu deney sonuçlarına göre; ışık altında inkübe edilen izolatlarla ait azot fiksasyonu için fotometrede ölçülen değerler Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17.: İzolatların azot fiksasyonu ölçüm sonuçları

İzolat	NH ₄ -N (mg/L)	NH ₄ ⁻ (mg/L)	Toplam azot (mg/L)
PW7	3,26	4,21	7,47
PW12	3,26	4,19	7,45
PW14	2,50	3,22	5,72
PW15	2,43	3,12	5,55

Bakterilerin azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenmesinde birçok farklı metod ile belirlenmiş literatür verileri bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri, izole edilen 11 adet diazotrofun azot fiksasyon yetenekleri için mikro-Kjeldahl yöntemi kullanılarak ölçüm sonuçları kaydedilmiştir. İzole edilen bakteriler arasında maksimum değer %10,60 ile *Azospirillum* sp. OM4 suşu iken minimum değer %1,20 ile *Azospirillum* sp. CON1 suşu için rapor edilmiştir (Richard ve diğ. 2018). Başka bir çalışmada yine aynı şekilde on adet endofitik bakteri için azot fiksasyon yetenekleri için mikro-Kjeldahl yöntemi kullanılarak ölçüm sonuçları kaydedilmiştir. Çalışmanın sonucunda en yüksek değer *Curtobacterium* sp. A02 olarak adlandırılan suş için 13,38 mg/L değerinde ölçülmüştür (Zhang ve diğ. 2022). Azot fiksasyonu için kullanılan başka bir metotta, topraktan izole edilen endofitik bakterilerin çeşitli abiyotik stres koşullarındaki *Capsicum annuum* bitkisi üzerindeki etkilerinin incelenmiştir. Bakteri suşlarının azot fiksasyon yeteneklerinin tespiti için azot içermeyen bromotimol mavi malat (NFb) besiyeri kullanılmıştır. Yeşilden maviye doğru gözlemlenen renk değişimi, azot fiksasyon yeteneğinin varlığını göstermiştir. Çalışmanın sonucunda izole edilen 11 endofitik bakteri türünün tümünde azot fiksasyon yeteneğinin olduğu rapor edilmiştir (Ray ve diğ. 2016). Aynı metod ile yapılan başka bir çalışmada topraktan izole edilen bakterilerin ağır metal varlığında *Medicago sativa* bitkisindeki etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda izole edilen bakteriler için azot içermeyen bromotimol mavi malat (NFb) besiyeri kullanılmıştır. Maviden yeşile doğru değişen

renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Deney sonucunda NT15, NT19, NT20 ve NT27 olarak adlandırılan izolatlar için azot fiksasyon yeteneklerinin var olduğu rapor edilmiştir (Tirry ve diğ. 2021). Buğday bitkisinin kök kısmından alınan topraktan izole edilen 13 suş (N1-N13) için azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenmesinde Ashby agarlı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinde inkübasyon süresi tamamlanan tüm izolatların azotsuz besiyerinde üredikleri rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2020).

Benzer şekilde literatürde mor kükürtsüz bakterilerin azot fiksasyonu yeteneğinin incelendiği bazı çalışmalar da mevcuttur. Aside dirençli mor kükürtsüz bakteriler izole edilerek biyokontrol ve biyogübre olarak kullanıma uygunlukları üzerine yapılan bir çalışmada, izole edilen 28 mor kükürtsüz bakteriler izolatu için azot miktarları en düşük $0,93 \pm 0,21$ mg/L ve en yüksek $3,23 \pm 0,21$ mg/L değerleri ölçülmüştür (Nookongbut ve diğ. 2019). Başka bir çalışmada ise, pirinç tarlalarından izole edilen mor kükürtsüz bakterilerin bitki büyümesi üzerine etkisinin araştırılmıştır. Bakteriler tarafından üretilen azot miktarlarının en düşük $0,90 \pm 0,08$ ve en yüksek $3,20 \pm 0,33$ mg/L olarak ölçüldüğü belirtilmiştir (Sakpirom ve diğ. 2017). Rhodospirillaceae ailesi için azot fiksasyon yeteneklerinin belirlendiği çalışmada, *Rhodobacter capsulata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodopseudomonas blastica*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodoblastus acidophila*, *Rhodovulum sulfidophila*, *Rhodopila globiformis*, *Rhodopseudomonas sulfoviridis* çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. Çalışmanın sonucunda izole edilen tüm türlerin azot fiksasyon yeteneklerinin var olduğu rapor edilmiştir (M. Madigan ve diğ. 1984). Mor kükürtsüz bakterilerin azot fiksasyon yeteneklerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, izole edilen 4 suş için mikroaerobik koşullarda ışık altında ve aerobik koşulda karanlıkta inkübe edilen bakteriler için Nessler reaktifi ile azot fiksasyon yetenekleri belirlenmiştir. Bulunan sonuçlara göre izole edilen mor kükürtsüz bakteri türlerinin azot fiksasyon yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir (Nookongbut ve diğ. 2020).

Tabloda gösterilen veriler ışığında, İzolatlar için en düşük değerin PW15'e ait olduğu ve 2,43 mg/L değerinde ölçüldüğü görülmektedir. Buna karşı olarak en yüksek değer 4,21 mg/L değerinde ölçülen PW7'ye ait olduğu belirlenmiştir. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bulunan sonuçların tez çalışma şartlarına göre

izolatların diğ er çalışmadaki sonuçlara göre daha fazla miktarda üretim yapabildikleri düşünölmüştür.

4.4 İzolatların fosfat çözümdürme kabiliyetlerinin belirlenmesi

Koloni morfolojisi ve Gram boyama reaksiyonlarına göre seçilen ve ışık altında inkübe edilen izolatlar ile yapılan fosfat çözümdürme deneyi sonuçları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18.: İzolatların fosfat çözümdürme yetenekleri ölçüm sonuçları

İzolat	PO ₄ -P (mg/L)	PO ₄ ⁻³ (mg/L)	P ₂ O ₅ (mg/L)	Toplam fosfat (mg/L)
PW7	92,10	282	211	585,1
PW12	76,90	236	176	488,9
PW14	45,60	140	105	290,6
PW15	80,70	248	185	513,7

Literatürde farklı bakterilerin fosfat çözümdürme yeteneklerinin belirlendiğı yayımlar mevcuttur. Örneğ in, *Bacillus licheniformis* QA1 ve *Enterobacter asburiae* QF11 izolatlarının fosfat çözümdürme kapasitelerinin araştırıldığı başka bir çalışmada *B. licheniformis* QA1 için $346 \pm 8,71$ mg/L ve *E. asburiae* QF11 için ise $220 \pm 8,71$ mg/L değerleri ölçölmüştür (Mahdi ve diğ. 2020). Endofitik bakterilerin *A. serpyllifolium* bitkisine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bakterilerin fosfat çözümdürme yetenekleri incelenmiştir. Bu çalışmada Pikoskavaya’nın besiyeri kullanılarak A3R3, A3S4, A2R6 ve A3S6 olarak adlandırılan izolatlar için fosfat çözümdürme yetenekleri sırasıyla $138,2 \pm 21,4$ mg/L, 0, 0, $83,5 \pm 11,1$ mg/L ölçölmüştür (Ma ve diğ. 2011). *A. esculentus* bitkisinin yaprağından izole edilen BHU12 ve BHU16 izolatları ile *Andrographis paniculata* yaprağından izole edilen BHUM7 izolatu için fosfat çözümdürme deneyi yapılmıştır. Çalışma için NBRIP besiyeri kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, BHU16 izolatu için 30,58 µg/mL, BHUM7 izolatu için 25,88 µg/mL, BHU16 izolatu için 23,53 µg/mL değerleri ölçölmüştür (Ray ve diğ. 2016). Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin antifungal özelliklerinin belirlendiğı bir çalışmada izole edilen bakteriler için fosfat çözümdürme

yetenekleri belirlenmiştir. Çalışma sonunda 12 adet izolata ait ölçüm değerleri, *P. fluorescence* LB1 izolatu için $50,17 \pm 2,32$ µg/mL, *Pseudomonas putida* MS6 izolatu için $70,21 \pm 7,1$ µg/mL, *Pseudomonas aeuroginosa* FB1 izolatu için $50,84 \pm 2,50$ µg/mL, *P. aeuroginosa* FB2 izolatu için $60,59 \pm 4,86$ µg/mL, *P. aeuroginosa* FB3 izolatu için $40,57 \pm 2,76$ µg/mL, *P. aeuroginosa* FB5 izolatu için $50,58 \pm 5,11$ µg/mL, *Pseudomonas stutzeri* RMB6 izolatu için $40,95 \pm 3,51$ µg/mL, *B. subtilis* NS1 izolatu için $50,34 \pm 5,05$ µg/mL, *B. subtilis* NS2 izolatu için $40,66 \pm 6,85$ µg/mL, *B. subtilis* NS4 izolatu için $45,27 \pm 3,67$ µg/mL, *B. subtilis* NS6 izolatu için $40,48 \pm 1,0$ µg/mL, *B. subtilis* RMB5 izolatu için $45,67 \pm 4,09$ µg/mL olarak hesaplanmıştır (Ali ve diğ. 2020). *Brevundimonas* spp. TN37, *Brevundimonas* spp. TN39, *Brevundimonas* spp. TN40, *Brevundimonas* spp. TN44 izolatları için fosfat çözünmesine ilişkin kantitatif analiz yapılmıştır. Bunun için, Pikovskaya'nın sıvı besiyerinde üreyen bakteriler için fosfo-molibdat mavi renk yöntemiyle spektrofotometre yardımıyla çözülmüş fosfat miktarı belirlenmiştir. TN40 dışındaki tüm bakteri izolatu, büyüme ortamı içinde fosforu çözme yeteneği göstermiştir. TN37 izolatu için $306,25$ µg/mL değeri ölçülmüştür. TN39 ve TN44 izolatları için sırasıyla; $249,37$ µg/mL ve $272,50$ µg/mL değerleri ölçülmüştür (Naqqash ve diğ. 2020). *Salsola stocksii* ve *Atriplex amnicola* bitkilerinin rizosferinden ve rizosfer dışı bölgelerinden alınan örnekler halofilik besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda saflaştırılan bakteriler için fosfat çözündürme yetenekleri belirlenmiştir. Bu deney için fosfo-molibdat mavi renk yöntemiyle kolorimetrik olarak ölçüm sonuçları incelenmiştir. Deney sonunda izole edilen bakteriler için *Bacillus* sp. HL1HP11 ve HL3RS14 izolatları en yüksek fosfat çözündürme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Mukhtar ve diğ. 2020).

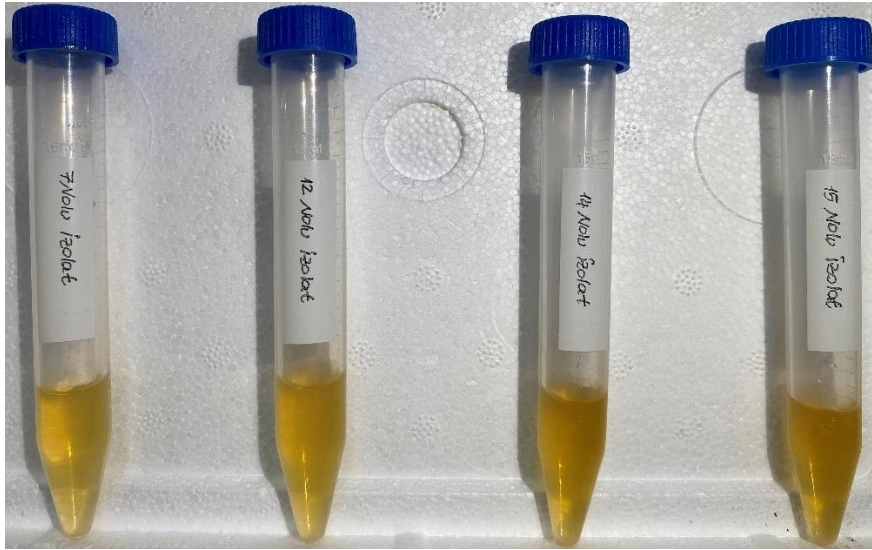
Literatürde mor kükürtsüz bakterilerin fosfat çözündürme yetenekleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Asit sülfatlı topraktan izole edilen mor kükürtsüz bakteriler için fosfat çözündürme kabiliyetleri ölçülmüştür. Aerobik ve karanlık koşullar altında inkübe edilen bakteriler için en düşük $6,9 \pm 0,94$ mg/L ve en yüksek $14,7 \pm 2,66$ mg/L değerleri ölçülmüştür. Mikroaerobik ve ışık varlığında inkübe edilen bakteriler için en düşük $9,7 \pm 0,95$ mg/L ve en yüksek $14,6 \pm 0,83$ mg/L değerleri ölçülmüştür (Khuong ve diğ. 2020). Aside dirençli mor kükürtsüz bakterileri izole ederek biyokontrol ve biyogübre olarak kullanıma uygunlukları üzerine yapılan bir çalışmada 12 mor kükürtsüz bakteri izolatu için fosfat çözündürme kabiliyetleri aerobik karanlık koşullar altında en düşük $61 \pm 3,0$ mg/L ve en yüksek $438,67 \pm 4,16$

mg/L değerleri ölçülmüştür. Mikroaerobik ve ışık varlığında en düşük $96 \pm 14,1$ mg/L ve en yüksek $511,67 \pm 4,16$ mg/L değerleri ölçülmüştür (Nookongbut ve diğ. 2019).

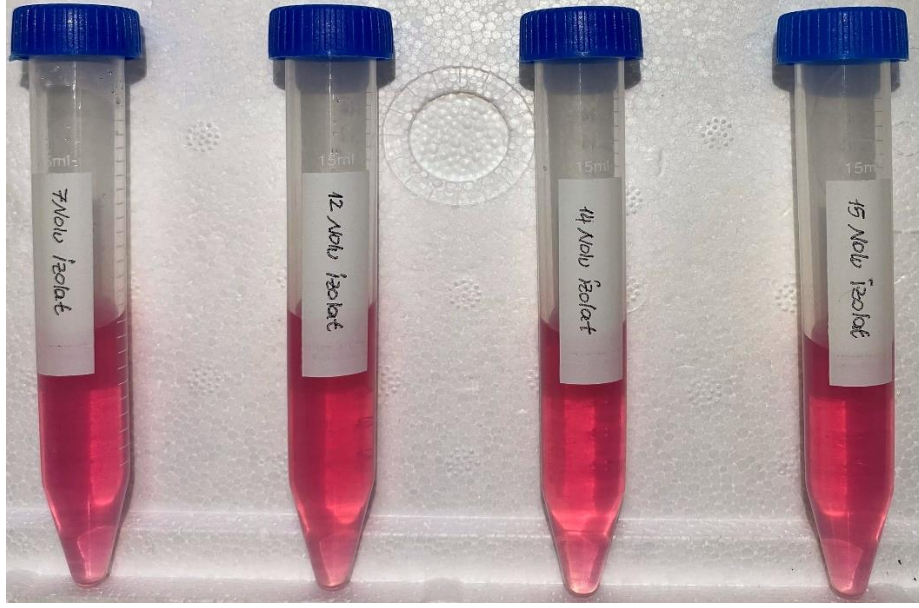
Çalışmada, en düşük değer PW14'e (45,60 mg/mL) ve en yüksek değerin ise PW7'ye (282 mg/L) ait olduğu görülmüştür. Tez çalışma şartlarına göre, elde edilen izolatların inorganik fosfat çözündürme kapasitelerinin diğer literatür çalışmalarına kıyasla daha fazla olduğu söylenebilir.

4.5 İzolatların 5-Aminolevulinik asit (ALA) üretim potansiyellerinin belirlenmesi

ALA üretim potansiyeli için GA besiyerinde üreyen izolatlar Erlich reaktifi eklendikten sonra besiyerindeki renk değişime bağlı olarak sonuçlar alınmıştır. ALA üretim potansiyeli sonuçları şekil 12'de gösterilmiştir.



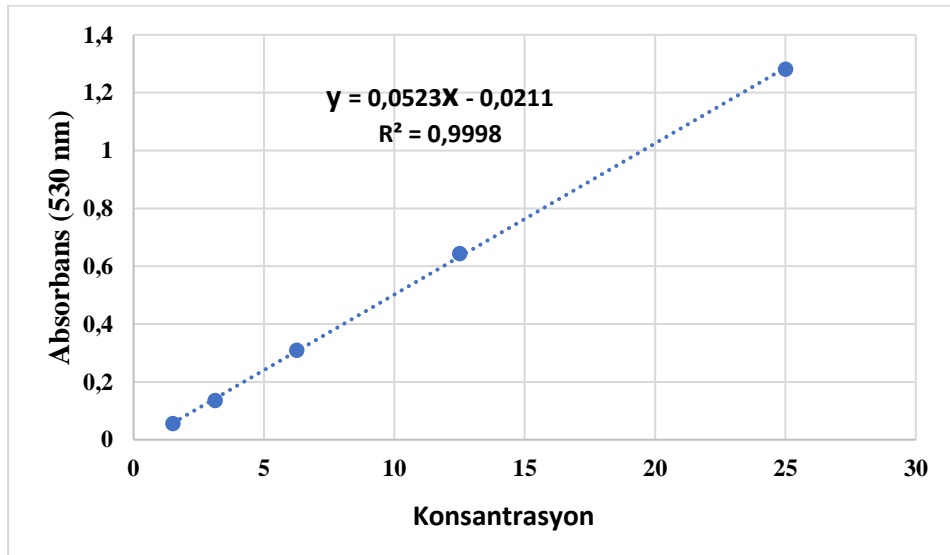
şekil 12.: İzolatların GA besiyerindeki görüntüleri



Şekil 13.: İzolatların Erlich reaktifi eklendikten sonraki görüntüleri

4.6 İzolatların indol-3-asetikasit (IAA) üretim potansiyelinin belirlenmesi

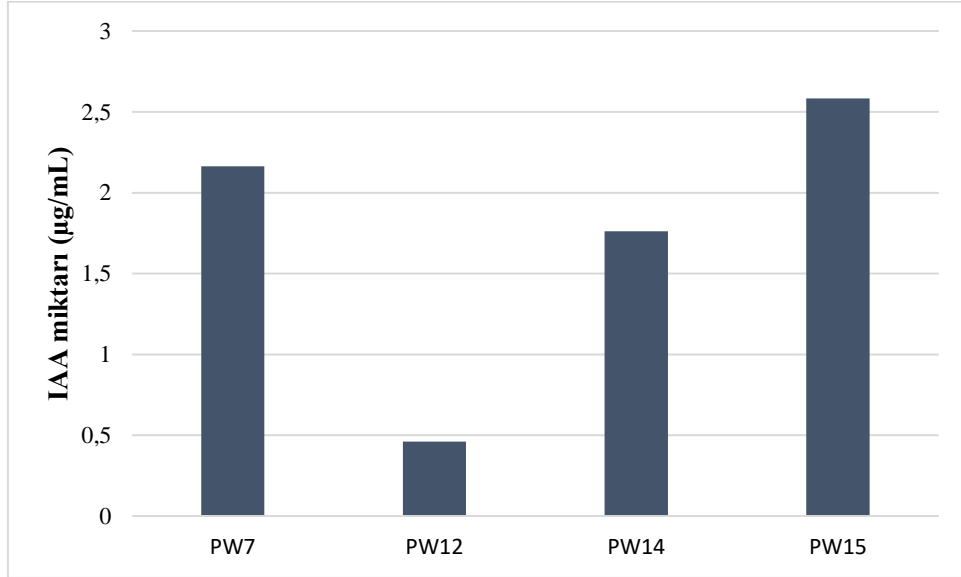
IAA üretim potansiyelini belirlemek amacıyla Winogradsky besiyerinde üreyen izolatlar için renk değişimine bağlı sonuçlar kaydedilmiştir. IAA üretim potansiyelinin sonuçları Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 14.: IAA üretim potansiyeli için oluşturulan standart eğri grafiği

Tablo 19. IAA üretim potansiyeli sonuçları

İZOLAT	Üretien IAA miktarı (µg/mL)
PW7	2,16
PW12	0,46
PW14	1,76
PW15	2,58



Şekil 15.: IAA üretim potansiyeli sonuçlarının grafiği

Farklı toprak kaynaklarından izole edilen beş farklı *Azospirillum* suşu ile yapılan bir çalışmada, en yüksek değer 23,8 µg/mL, en düşük değer ise 5 µg/mL olarak ölçülmüştür (García ve diğ. 2017). Başka bir çalışmada, *A. brasilense* Az39 ve *A. brasilense* Cd izolatlarının IAA üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmada *A. brasilense* Cd için 10,8 µg/mL, *A. brasilense* Az39 için ise 2,9 µg/mL olarak ölçülmüştür. 0, 86, 340 ve 680 mM NaCl eklenen LB besiyerinde inkübe edilen *Bacillus velezensis* FMH2 suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise, süreç sonundaki IAA üretimleri sırasıyla $0,975 \pm 9,6$ µg/mL, $112,5 \pm 5,5$ µg/mL, $73,21 \pm 0,5$ µg/mL olarak ölçülmüştür (Perrig ve diğ. 2007). *Raphanus sativus* bitkisi üzerinde yapılan tuz stresi çalışmasında, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinin IAA üretim potansiyeli incelenmiştir. Çalışmada, 0, 75, 150 mM NaCl konsantrasyonlarında inkübe edilen bakteriler için en yüksek değer 75 mM NaCl konsantrasyonunda *Pseudomonas fluorescens* bakterisine ait olduğu ve üretilen IAA değerinin 22,48 µg/mL olarak ölçüldüğü belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, en düşük değer 150 mM NaCl konsantrasyonundaki *Bacillus subtilis*'in ürettiği IAA

konsantrasyonu olduğu ve üretilen IAA konsantrasyonunun 17,73 µg/mL olduğu belirtilmiştir (Mohamed ve Gomaa, 2012). *Pseudomonas psychrotolerans* CS51 suşunun 200 mM NaCl ve NaCl eklenmeden yedi gün inkübasyona bırakıldıktan sonraki IAA üretim potansiyelinin incelendiği bir çalışmada NaCl eklenmeyen besiyerindeki IAA konsantrasyonunun $33 \pm 1,8$ ng/mL olduğu, 200 mM NaCl eklenen besiyerinde üretilen IAA konsantrasyonunun ise $17,6 \pm 0,4$ ng/mL olarak ölçüldüğü görülmüştür (Kubi ve diğ. 2021). *Klebsiella* sp. SBP-8 suşunun bitki büyümesini teşvik edici özelliklerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, 100 mg/L triptofan eklenmiş Nutrient sıvı besiyeri ile üç günlük inkübasyon sonunda üretilen IAA konsantrasyonu $0,4100 \pm 0,084$ µg/mL değerinde ölçülmüştür (Singh ve diğ. 2015). Bitki büyümesini teşvik edici özelliği yönünden incelenen diazotrofik bir bakteri olan *Brevundimonas* spp.'nin patates bitkisi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda indol-3-asetik asit değerlendirilmesi için Salkowski reaktifi kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *Brevundimonas* spp. izolatlarının IAA üretim potansiyelinin olmadığı rapor edilmiştir (Naqqash ve diğ. 2020)

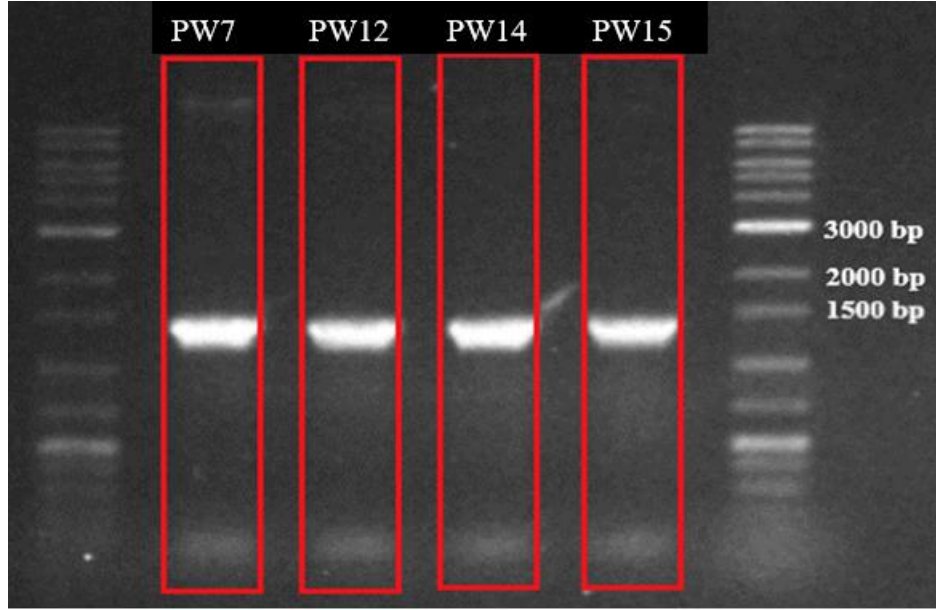
Benzer şekilde, literatürde mor kükürtsüz bakterilerin IAA üretim potansiyellerinin incelendiği bazı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *Rhodopseudomonas palustris* CS2 ve *Rhodopseudomonas faecalis* SS5 suşlarının bitki büyümesini teşvik edici özelliklerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, 500 mg/mL triptofan eklenmiş LB sıvı besiyerinde inkübe edilen *R. palustris* CS2 suşunun $77,18 \pm 3,7$ µg/mL, *R. faecalis* SS5 suşunun ise $76,67 \pm 2,8$ µg/mL konsantrasyonunda IAA ürettiği saptanmıştır (Batoool ve diğ. 2017). Ayrıca mikroaerobik koşullarda ışık altında inkübe edilen altı farklı mor kükürtsüz bakteri izolatı için IAA konsantrasyonlarının belirlendiği bir çalışmada en yüksek IAA konsantrasyonunun $0,59 \pm 0,10$ mg/L, en düşük IAA konsantrasyonunun ise $0,18 \pm 0,03$ mg/L olduğu kaydedilmiştir (Khuong ve diğ. 2020). IAA üretim potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, 1 mM triptofan eklenen G5 besiyerinde mikroaerobik ışık altında inkübasyonu gerçekleştirilen yirmi sekiz mor kükürtsüz bakteri izolatının ürettiği IAA konsantrasyonlarının ise, en düşük $43,05 \pm 0,67$ mg/L, en yüksek $302,6 \pm 1,77$ mg/L olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, izolatlar arasında en iyi IAA üretim etkinliği gösteren izolatın *R. palustris* KTSWR2 suşu olduğu rapor edilmiştir (Nookongbut ve diğ. 2019). Pirinç tarlasından elde edilen mor kükürtsüz bakterilerin bitki büyümesini teşvik edici özelliklerinin araştırıldığı bir

diğer çalışmada, bakteriler 100 mg/L tripftofan eklenen BIM besiyerinde mikroaerobik ışıklı ortamda ve aerobik karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İki gün spektrofotometre ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre mikroaerobik ışık koşulu altında inkübe edilen bakteriler için, en düşük $1,60 \pm 0,47$ mg/L ve en yüksek $12,8 \pm 0,34$ mg/L değerleri ölçülmüştür. Aerobik karanlık ortamda inkübe edilen bakteriler için ise, en düşük $1,08 \pm 0,56$ mg/L ve en yüksek $38,5 \pm 0,53$ mg/L değerleri ölçülmüştür (Khuong ve diğ. 2022). *R. palustris* GJ-22 suşu ile yapılan bir çalışmada IAA üretim potansiyeli belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda anaerobik koşullar altında inkübe edilen bakteri için en yüksek IAA üretim potansiyeli (29,5 mg/L) olduğu rapor edilmiştir (Su ve diğ. 2017).

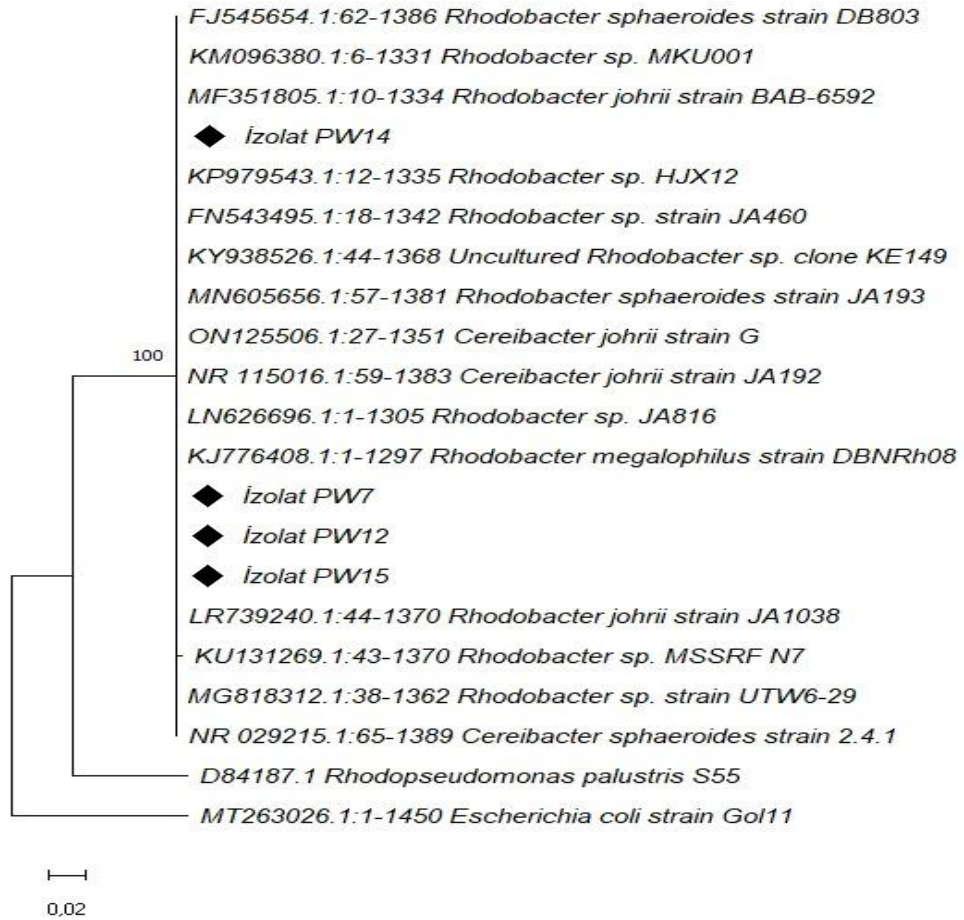
Çalışmada, dört izolata ait IAA üretim potansiyeli için en düşük değer PW12'ye ait olduğu ($0,461 \mu\text{g/mL}$) ve en yüksek değer PW15'e ait olduğu ($2,58 \mu\text{g/mL}$) belirlenmiştir.

4.7 İzolatların moleküler biyolojik olarak tanılanması

Moleküler biyolojik çalışmalar kapsamında yapılan konvansiyonel PCR ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonuçları, istenilen boyutta (yaklaşık 1500 baz çifti) DNA'ların çoğaltıldığını göstermiştir (Şekil 16). Dört izolata ait 16S DNA dizi analizleri ile oluşturulan filogenetik ağaç sonuçlarına göre, izolatların *Rhodobacter* cinsi üyeleriyle %99 üzerinde dizi benzerlikleri olduğu saptanmıştır. Bu nedenle elde edilen izolatlar *Rhodobacter* sp. PW7, *Rhodobacter* sp. PW12, *Rhodobacter* sp. PW14, *Rhodobacter* sp. PW15 olarak adlandırılmıştır (Şekil 17).



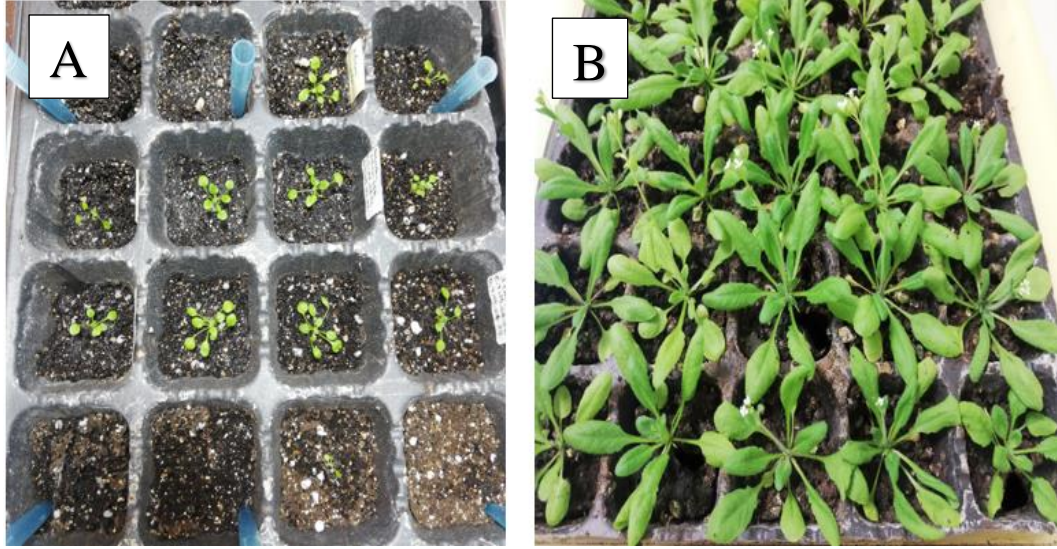
Şekil 16.: İzolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 17.: Çalışmaya ait 16S rRNA sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaç

4.8 *A. thaliana* bitkisinin büyütülmesi

A. thaliana (Col-0) bitkisi, herhangi bir olumsuz duruma karşı yedekli bir şekilde 40 viyol içerisinde büyütülmüştür. Bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması için 39 gün gerekli koşullar altında büyütülmüştür (Şekil 18). Çalışma için gerekli boyuta ulaşan bitkiler arasından eşit yaprak büyüklüğü ve sayısındaki viyoller seçilmiştir.



Şekil 18.: *A. thaliana* bitkisi (A) bitkilerin bir haftalık görüntüsü (B) bitkilerin 39. gün görüntüsü

4.9 *A. thaliana* rizosferine bakteri inokülasyonu ve tuz stresi çalışması

Şekil 18’de gösterilen 39. gün bitkilerinden çalışma için gerekli boyuta ulaşan bitkiler arasından eşit yaprak büyüklüğü ve sayısındaki viyoller seçilmiştir. Bitkilerden 48 saatte bir toprak örneği alınmıştır ve yaprak boyları ve sayısı ölçülerek kaydedilmiştir. Şekil 19’da *A. thaliana* bitkisinin farklı zaman ve parametreler içerisindeki değişimleri gösterilmektedir. Kontrol bitkisinin zamana bağlı olarak göstermiş olduğu yaprak sayısında ve boyutundaki artış bitkinin sağlıklı bir şekilde büyüdüğünü göstermektedir. Kontrol bitkisine göre sadece bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak sayısında ve boyutunda artış görüldü. Bu durum bakterilerin bitkinin büyümesini teşvik etme özelliğinin olduğunu göstermektedir. Mor kükürtsüz bakteri ve NaCl inoküle edilen viyoldeki durum, zamana bağlı bir şekilde abiyotik strese karşı bakterilerin bitkideki yaprak sayısı ve boyutu mor kükürtsüz bakteri ve kontrol

bitkisine oranla daha düşüktür. NaCl inoküle edilmiş bitkide zamanla yaprak sayısında kayıplar ve bitkinin rengindeki değişimler abiyotik stresin bitkiye karşı vermiş olduğu etkinin bir parçası olarak değerlendirilmektedir. Bu durumda, yaprak sayısındaki ve boyutundaki artışlar, yaprakların renklerindeki canlılık bakterinin abiyotik strese karşı bitkinin büyümesini teşvik ettiği görülmektedir.

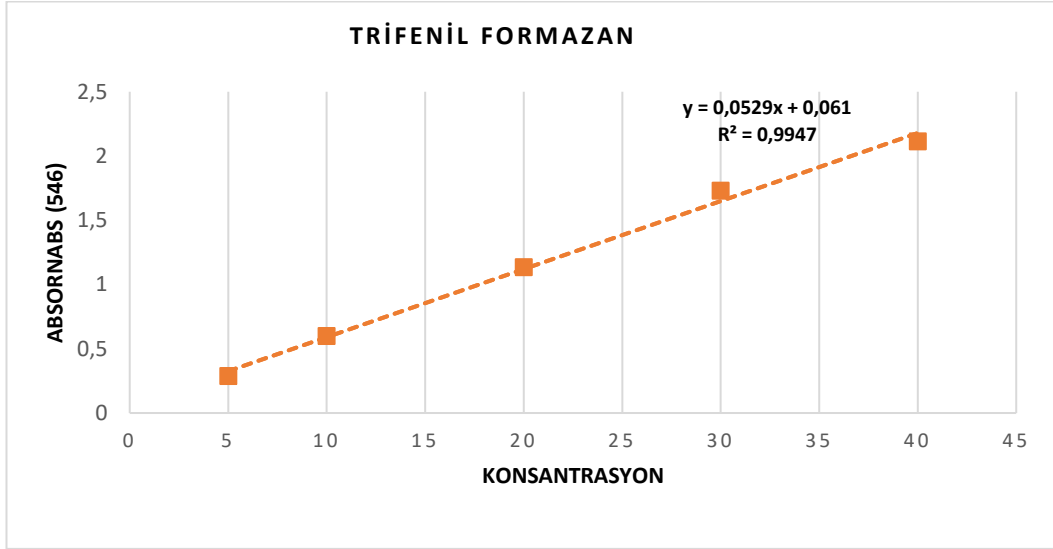


Şekil 19.: *A. thaliana* bitkisinin farklı parametrelerdeki görselleri

4.10 Topraktaki mikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Topraktaki mikrobiyal aktiviteyi belirlemek amacıyla, klorür varlığında dehidrojenaz aktivitesi ile ortamda üretilen trifenil formazan miktarının belirlenebilmesi için, bir seri trifenil formazan konsantrasyonunun absorbansa karşı bir standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 20). Buna göre spektrofotometre ölçüm sonuçları ve üretilen trifenil formazan konsantrasyonları Tablo 19'da, çalışma

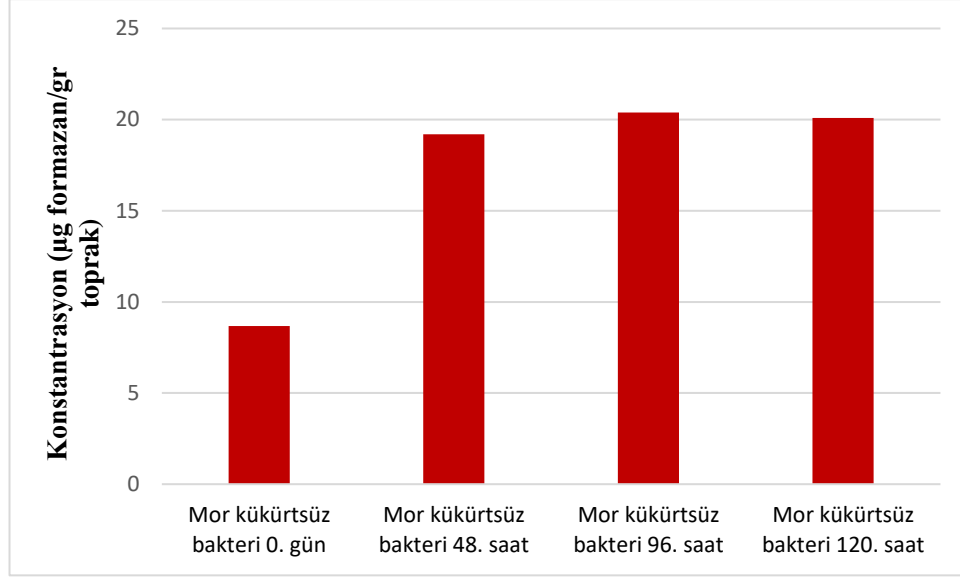
gruplarına göre trifenil formazan konsantrasyonları ise Şekil 21 ve Şekil 22’de gösterilmiştir.



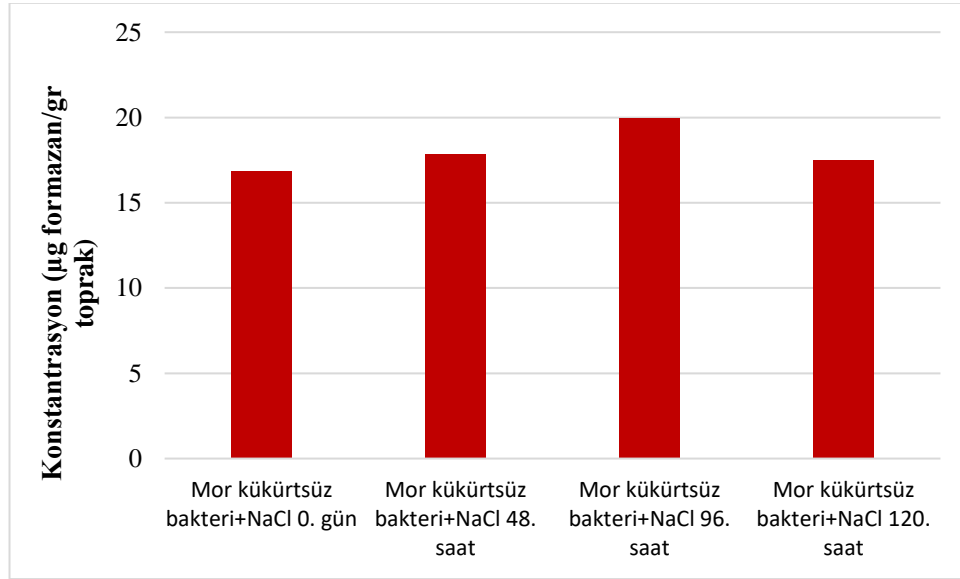
Şekil 20.: Trifenil formazan standartı

Tablo 20.: Mikrobiyal aktivite sonuçları

ÖRNEKLER	Üretilen trifenil formazan miktarı (µg/g)
Mor kükürtsüz bakteri 0. saat	8,67
Mor kükürtsüz bakteri 48. saat	19,18
Mor kükürtsüz bakteri 96. saat	20,39
Mor kükürtsüz bakteri 120. saat	20,09
Mor kükürtsüz bakteri+NaCl 0. saat	16,84
Mor kükürtsüz bakteri+NaCl 48. saat	17,82
Mor kükürtsüz bakteri+NaCl 96. saat	19,94
Mor kükürtsüz bakteri+NaCl 120. saat	17,52



Şekil 21.: Sadece mor kükürtsüz bakterileri inoküle edilen bitki toprağındaki mikrobiyal aktiviteyi gösteren grafik

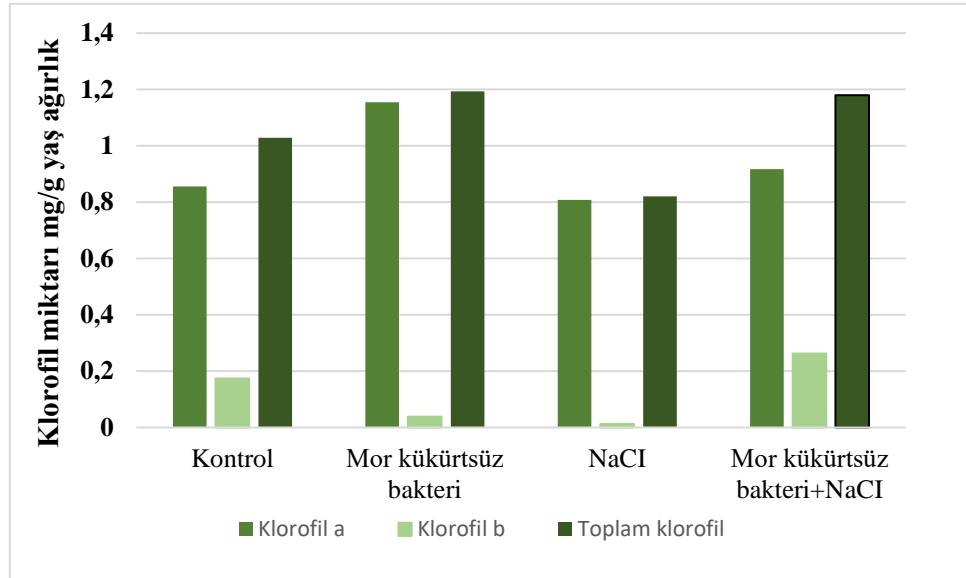


Şekil 22.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitki toprağındaki mikrobiyal aktiviteyi gösteren grafik

4.11 *A. thaliana*'dan elde edilen toplam klorofil miktarı

Yapraklardaki toplam klorofil ekstraksiyonu deneyinde elde edilen sonuçlar, mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş ve 150 mM NaCl eklenmiş bitkinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarının kontrol bitkisine göre 0,14 mg/yaş ağırlık artış olduğunu göstermiştir. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş ve 150 mM NaCl

eklenmiş bitkinin klorofil miktarı ile sadece 150 mM NaCl eklenmiş bitkinin toplam klorofil miktarı karşılaştırıldığında ise; bakteri ve NaCl ile muamele edilen bitkinin klorofil miktarında, sadece tuzla muamele edilen bitkiye göre 4,21 mg/yaş ağırlık artış olduğu görülmektedir. Bu bilgiler ışığında, abiyotik strese karşı mor kükürtsüz bakterilerin klorofil miktarının artmasına da olumlu yönde etkileri olduğu sonucuna varılmaktadır.



Şekil 23.: *A. thaliana* bitki yapraklarının klorofil ekstraksiyon ölçüm sonucu

Literatürde farklı bakteri eklenerek elde edilen bitki toplam klorofil miktarları ile tuz ilişkini gösteren yeterli sayıda makale bulunmaktadır. Örneğin, nohut bitkisine inoküle edilen *Azospirillum linoferum* FK1 susunun, 0 mM, 75 mM ve 150 mM NaCl varlığında toplam klorofil miktarlarının belirlendiği bir çalışmada, sadece *Azospirillum linoferum* FK1 inoküle edilen bitkideki toplam klorofil miktarının kontrol bitkisine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bitkilerin tuz varlığında ürettikleri toplam klorofil miktarlarındaki durum ise, *A. linoferum* FK1 inoküle edilen ve NaCl eklenen bitkinin kontrol bitkisine göre klorofil miktarlarının daha düşük olduğu görülmüştür. *A. linoferum* FK1 inoküle edilen ve NaCl eklenen bitkinin sadece NaCl eklenen bitkiye göre klorofil miktarında artış olduğu görülmüştür (El-Esawi ve diğ. 2019). Bitki büyümesinde olumlu etkileri olan *Kocuria chizophula* Y1 susunun 0 mM, 100 mM ve 200 mM konsantrasyonlarındaki NaCl varlığında mısır bitkisindeki klorofil miktarlarının incelendiği başka bir çalışmada, *K. thizophila* Y1 susunun inoküle edildiği bitkinin 0 mM, 100 mM ve 200 mM NaCl

konsantrasyonlarındaki klorofil miktarlarının kontrol bitkisine göre önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Li ve diğ. 2020). *Bacillus amyloliquefaciens* SN13 suşu ile yapılan bir çalışmada ise, suşun inoküle edildiği pirinç bitkisindeki klorofil miktarının kontrol bitkisindeki klorofil miktarına göre daha fazla olduğu ve aynı zamanda *Bacillus amyloliquefaciens* SN13 inoküle edilen bitkiye 200 mM NaCl eklendikten sonra da klorofil miktarının kontrol bitkisine göre daha fazla olduğu görülmüştür (Nautiyal ve diğ. 2013). *Pseudomonas stutzeri* E25 ve *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 bakterilerinin *Physalis ixocarpa* bitkisine inoküle edildikten sonra bitkinin klorofil miktarlarındaki ölçüm sonuçlarının kontrol bitkisine kıyasla daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Rojas-Solis ve diğ. 2018). Ayrıca *Brassica napus* bitkisine inoküle edilen *Enterobacter* sp. (S16-3) ve *Pseudomonas* sp. (C16-2O) bakterilerinin ise 0, 100, 200 ve 300 mM olarak artan NaCl konsantrasyonlarında bitkinin toplam klorofil miktarlarının azaldığı görülmüştür (Neshat ve diğ. 2022). Başka bir çalışmada mor kükürtsüz bakteri suşu olan *R. palustris* G5 ile *Cucumis sativus* bitkisine inoküle edildikten sonra klorofil içeriği incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre kontrol bitkisinin klorofil içeriğine göre bakteri inoküle edilen bitkideki klorofil miktarı %36,56 artmış olduğu görülmüştür. NaCl eklenen ve bakteri inoküle edilen bitkideki klorofil miktarı, sadece NaCl eklenen bitkideki klorofil içeriğinden %96.46 daha fazla olduğu görülmüştür (Ge ve Zhang, 2019). *Burkholderia phytofirmans* PsJN suşunun *A. thaliana* bitkisine inoküle edildiği bir çalışmada, bitkinin inoküle edilen bakterinin değişen konsantrasyonlarına göre klorofil miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *B. phytofirmans* PsJN suşu inoküle edilen bitkinin kontrol bitkisine göre daha fazla klorofil ürettiği ve inoküle edilen bakteri konsantrasyonu arttıkça klorofil miktarının arttığı rapor edilmiştir (Poupin ve diğ. 2013). Yapılan bir çalışmada ALT29 ve ALT43 olarak adlandırılan tuza toleranslı bakteriler ile aşılansız soya fasulyesi bitkilerindeki klorofil miktarları belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda kontrol bitkisine göre toplam klorofil içeriğinde %21 artış gözlenmiştir (M. A. Khan ve diğ. 2021). Tuz stresi altındaki *O. sativa* bitkisine inoküle edilen sekiz izolat için süreç sonundaki klorofil miktarları ölçülmüştür. Klorofil ekstraksiyonu için %80 aseton kullanılan çalışmada, bakteri inoküle edilen bitkilerden elde edilen veriler, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek klorofil içeriği göstermiştir. En yüksek klorofil a ve klorofil b içeriği, *Achromobacter* sp.'de 131,9 ve 106,9 mg/g, *Microbacterium esteraromaticum*'da 121,5 ve 85,6 mg/g ve *Lysinibacillus* sp.'de 113,3 ve 82,5 mg/g olarak ölçülmüştür (Prittish ve diğ. 2020). *Enterobacter* sp.

suşunun NaCl stresi altındaki *Oryza sativa* bitkisindeki klorofil içeriklerinin belirlendiği bir çalışmada, sadece bakteri inoküle edilen bitkinin klorofil içeriği kontrol bitkisine göre artış göstermiştir. Bakteri inoküle edilen ve NaCl eklenen bitkinin klorofil içeriği sadece NaCl eklenen bitkinin klorofil içeriğine göre artış gösterdiği rapor edilmiştir (Sarkar ve diğ. 2018).

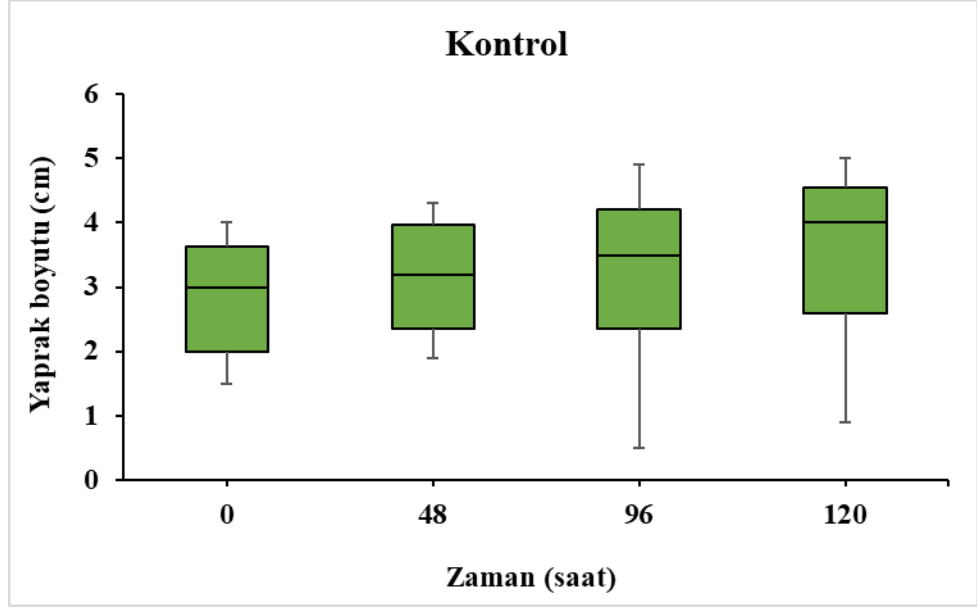
Tez çalışması kapsamında elde edilen toplam klorofil miktar verilerinin literatürde bulunan çalışmalardan elde edilmiş olan sonuçlar ile uyumlu olduğu ve tuz varlığında bitki toprağına bakteri eklenmesinin bitkilerin klorofil miktarlarında artışa neden olabildiği görülmüştür.

4.12 *A. thaliana* kök ve yaprak ölçümü

Bir önceki çalışmalarda kullanılan mor kükürtsüz bakteri ve NaCl ilave edilmiş bitkinin yaprak ölçümleri Tablo 21’de, sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçümleri Tablo 22’de, NaCl inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçümleri Tablo 23’te, kontrol bitkisinin yaprak ölçümleri Tablo 24’te gösterilmiştir. Bitkinin 120. saat sonunda kök gelişimi için kök ölçümleri bir cetvel vasıtası ile ölçülmüştür. Kök gelişimi için ölçüm sonuçları Şekil 26’da gösterilmiştir.

Tablo 21.: Kontrol bitkisinin yaprak ölçüm sonuçları (cm)

	0. gün yaprak boyutu	48. saat yaprak boyutu	96. saat yaprak boyutu	120. saat yaprak boyutu
Yaprak 1	1,5	1,9	2,3	2,5
Yaprak 2	1,5	2	2,4	2,7
Yaprak 3	2	2,4	3,2	3,9
Yaprak 4	2	2,2	3	3,4
Yaprak 5	3	3,1	3,5	4
Yaprak 6	3	3,1	3,7	4
Yaprak 7	3	3,3	4,2	4,5
Yaprak 8	3	3,4	4	4,5
Yaprak 9	3,5	3,9	4,2	4,6
Yaprak 10	4	4,2	4,6	4,9
Yaprak 11	4	4,3	4,7	5
Yaprak 12	4	4,3	4,9	5
Yaprak 13			0,6	1
Yaprak 14			0,6	1
Yaprak 15			0,5	0,9

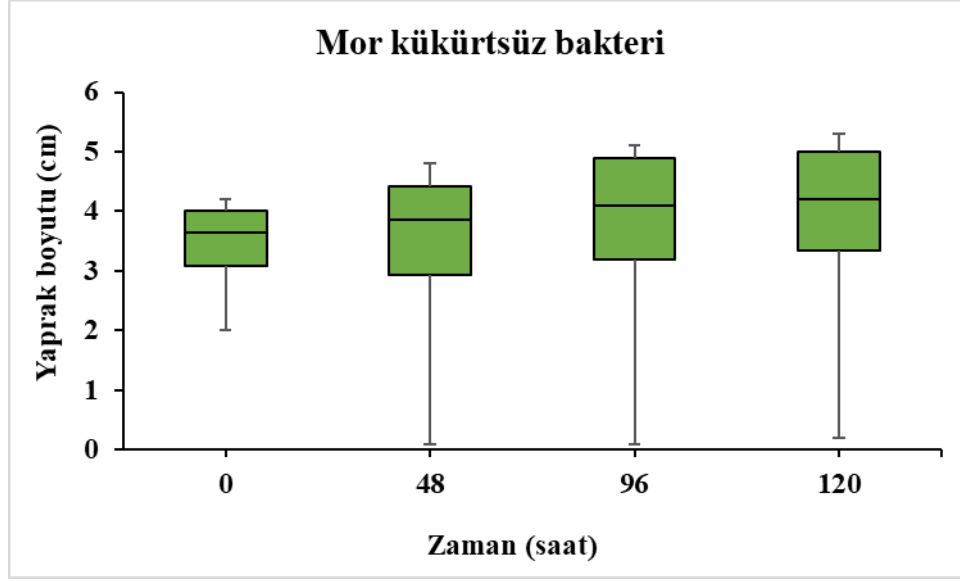


Şekil 22.: Kontrol bitkisinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bıyık grafiği

Yukarıdaki Tablo 21 ve Şekil 22’de verilen veriler ışığında, kontrol bitkisinin 0. saat, 48. saat, 96. saat ve 120. saat sonunda ölçümleri gerçekleştirilen yaprak boyutu ve yeni yaprak oluşumunda artışlar olduğu görülmektedir.

Tablo 22.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçüm sonuçları (cm)

	0. gün yaprak boyutu	48. saat yaprak boyutu	96. saat yaprak boyutu	120. saat yaprak boyutu
Yaprak 1	3,8	4,2	4,9	5
Yaprak 2	3,6	3,0	3,7	4,1
Yaprak 3	4,2	4,7	5	5,1
Yaprak 4	4	4,5	4,9	5
Yaprak 5	3,5	3,9	4,2	4,3
Yaprak 6	2	2,4	3	3,2
Yaprak 7	2,5	2,9	3,4	3,5
Yaprak 8	3,7	4,1	4,7	4,8
Yaprak 9	4,1	4,8	5,1	5,3
Yaprak 10	4	4,5	5	5,1
Yaprak 11	3	3,4	3,9	4
Yaprak 12	3,1	3,8	4,1	4,2
Yaprak 13		0,2	0,6	0,8
Yaprak 14		0,1	0,4	0,5
Yaprak 15			0,1	0,2

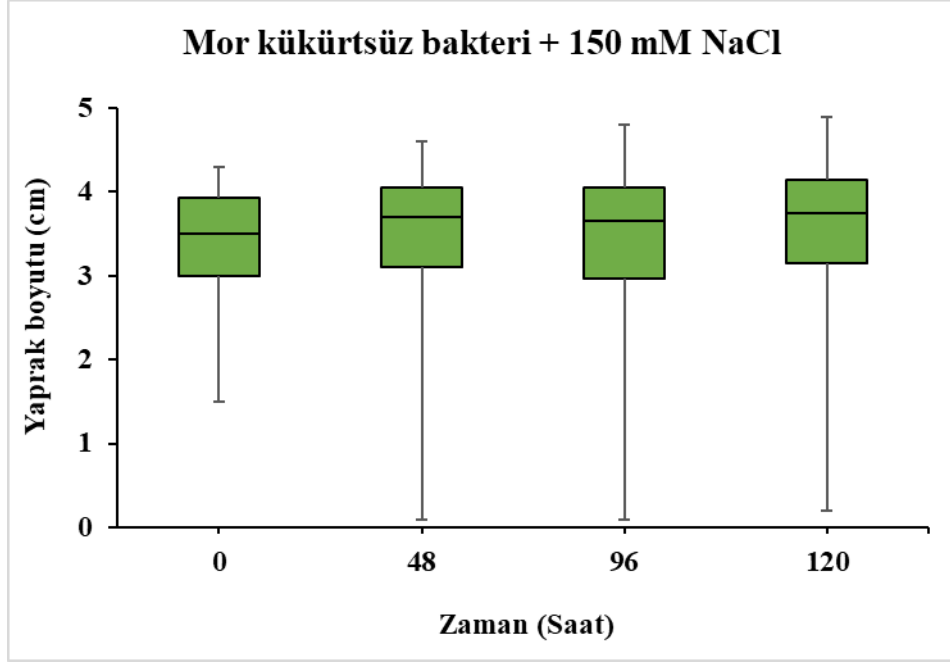


Şekil 23.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bilyık grafiği

Yukarıdaki Tablo 22 ve Şekil 23'te gösterilen veriler doğrultusunda, sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitki için, 0. saat, 48. saat, 96. saat ve 120. saat sonunda ölçülen yaprak boyutu ve oluşan yeni yaprak sayılarında artışlar olduğu görülmektedir.

Tablo 23.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitki için yaprak ölçüm sonuçları (cm)

	0. gün yaprak boyutu	48. saat yaprak boyutu	96. saat yaprak boyutu	120. saat yaprak boyutu
Yaprak 1	3,5	3,8	4	4,1
Yaprak 2	3,5	3,7	3,9	4
Yaprak 3	2,8	3	3,3	3,4
Yaprak 4	4,1	4,2	4,4	4,5
Yaprak 5	1,5	1,8	2	2,4
Yaprak 6	4,3	4,6	4,8	4,9
Yaprak 7	3,7	3,9	4	4,1
Yaprak 8	4	4,2	4,2	4,3
Yaprak 9	3	3,2	3,3	3,4
Yaprak 10	3	3,3	3,4	3,5
Yaprak 11		0,1	0,2	0,3
Yaprak 12			0,1	0,2

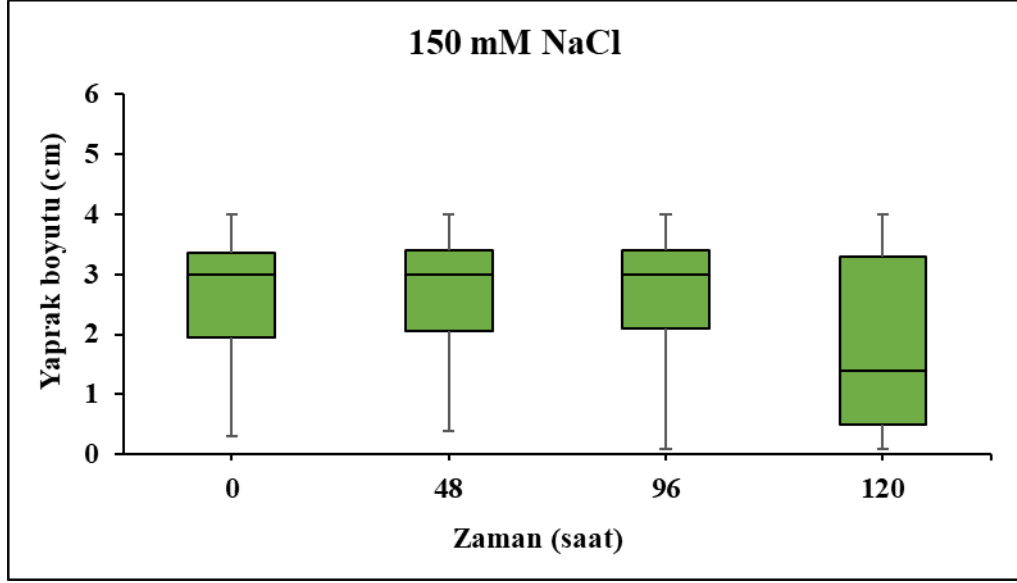


Şekil 24.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için kutu bilyık grafiği

Yukarıdaki tablo 23 ve Şekil 24'te gösterilen veriler ışığında, mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak boyutu ve yeni yaprak oluşumu var olan abiyotik strese karşı artış göstermeye devam ettiği görülmektedir.

Tablo 24.: 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları (cm)

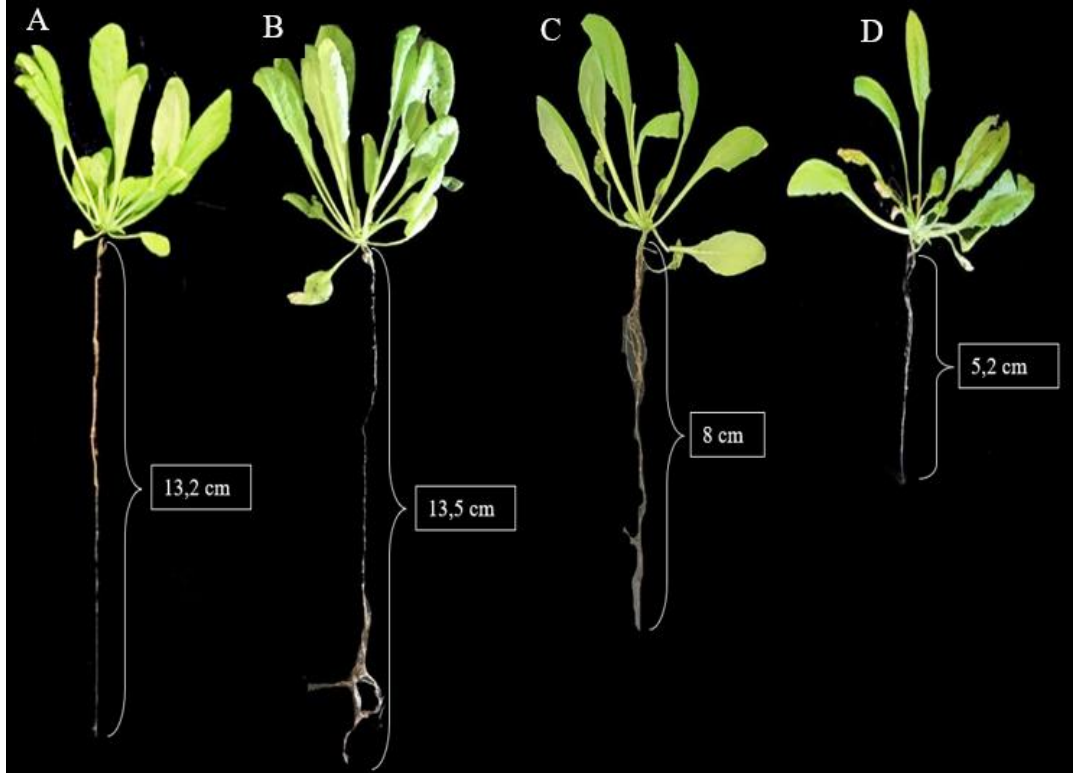
	0. gün	48. saat	96. saat	120. saat
Yaprak 1	4	4	4	-
Yaprak 2	3,5	3,5	3,5	-
Yaprak 3	3	3	3	-
Yaprak 4	2,7	2,8	2,8	-
Yaprak 5	1,2	1,3	1,4	1,4
Yaprak 6	3,2	3,3	3,3	-
Yaprak 7	3	3	3	-
Yaprak 8	3,2	3,3	3,3	3,3
Yaprak 9	4	4	4	4
Yaprak 10	0,3	0,4	0,1	0,1
Yaprak 11	0,4	0,5	0,5	0,5



Şekil 25.: 150 mM NaCl eklenen bitkinin yaprak ölçüm sonuçları için oluşturulan kutu bilyık grafiği

Tablo 24 ve Şekil 25'te verilen 150 mM NaCl eklenen bitkinin abiyotik strese karşı yaprak boyutlarında önemli artışların gözlenmediği ve zamana bağlı olarak yeni yaprak oluşumunun var olmadığı görölmektedir.

Yukarıdaki tablo ve şekillerde gösterildiği gibi, elde edilen verilerle sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş topraktaki yaprak sayısının kontrol bitkisi ile aynı sayıda olduğu görölmektedir. Ancak yaprak boyutundaki artış kontrol bitkisine göre daha fazla olmuştur. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen bitkinin yaprak sayısının kontrol bitkisine göre daha az olmasına karşın, yaprak boyutundaki artışın neredeyse aynı olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkide abiyotik stres olmadan gözlenen olumlu etkiler abiyotik stres varlığında da gözlenmiştir.



Şekil 26.: Bitkinin kök ölçüm sonuçları: (A) Kontrol bitkisi (B) Mor Kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitki (C) Mor Kükürtsüz Bakteri inoküle edilen ve NaCl eklenen bitki (D) NaCl eklenen bitki

Kök uzunlukları ölçüldüğünde, 120. saat sonundaki kontrol bitkisine göre sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş bitkinin kök boyutunda 0,3 cm'lik artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkinin kök yapısının, kontrol bitkisine göre daha kalın ve saçaklı olduğu gözlenmiştir. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl eklenmiş bitkinin kök uzunluğu kontrol bitkisine daha az olduğu, fakat kökteki saçaklanmanın kontrol bitkisine göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen bitki ile sadece NaCl ilave edilen bitkinin kök uzunluğu karşılaştırıldığında, mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen bitkinin kök uzunluğu 2,8 cm daha uzun olduğu görülmektedir.

Literatürde bitkiye inoküle edilen farklı bakterilerin, bitkinin kök kısmındaki değişimin belirlendiği yeterli sayıda veri bulunmaktadır. Örneğin, mor kükürtsüz bakterilerin pirinç bitkisi üzerindeki kök gelişimi ve ürün verimin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *Rhodopseudomonas* sp. Tsuru 2, *Rhodobacter* sp. Tsuru 3 ve *R. sphaeroides* NBRC 12203 suşlarının hem ölü hücreleri hem de canlı hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada, *Rhodobacter* sp. Tsuru 3 suşunun bitkinin kök uzunluğu ve

yüzey alanı gibi kök ve gövde gelişimi üzerine önemli derecede olumlu etki gösterdiği görülmüştür. *Rhodopseudomonas* sp. Tsuru 2 suşu kontrol bitkisine göre bitki köküne etkisi olduğu, ancak bu etkinin *Rhodobacter* sp. Tsuru 3 suşuna göre daha az olduğu görülmüştür (Iwai ve diğ. 2022). Başka bir çalışmada ise *R. palustris* CS2 ve *R. faecalis* SS5 suşunun *Vigna mungo* bitkisinin kök gelişimine etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, *R. palustris* CS2 suşunun *R. faecalis* SS5 suşuna göre daha fazla etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Batoool ve diğ. 2017). *R. palustris* suşlarının tuz stresi altındaki *Oryza sativa* bitkisindeki kök uzunluklarına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, tuz eklenmemiş koşullar altında büyüyen bitki için önemli bir fark görülmemiştir. Buna karşın, tuz eklenen bitkilerin *R. palustris* suşları varlığında kök uzunlukları sadece tuz eklenen bitkinin kök uzunluğuna göre önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Kantha ve diğ. 2015). *R. palustris* G5 suşu ile yapılan bir çalışmada, *Cucumis sativus* L. bitkisine inoküle edilen bakterinin tuz stresine karşı etkisi incelenmiştir. Çalışmada, bitkiye inoküle edilen bakterinin kök gelişimine etkisinin karşılaştırılması için kök ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre, sadece *R. palustris* G5 suşu eklenen bitkinin kök uzunluğu $6,87 \pm 0,43$ cm iken tuz ve bakteri inoküle edilen bitkinin çalışma sonunda kök uzunluğu $4,81 \pm 0,20$ cm ölçülmüştür (Ge ve Zhang, 2019). *B. phytofirmans* PsJN suşu ile yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda inoküle edildiği *A. thaliana* bitkisinin kök uzunlukları değerlendirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre bakteri inoküle edilen bitki ile kontrol bitkisinin kök uzunlukları arasında önemli ölçüde artış olduğu ve uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakterilerin de kendi içlerinde kök ölçümlerinde farklar olduğu rapor edilmiştir (Poupin ve diğ. 2013). ALT29 ve ALT43 olarak adlandırılan tuza toleranslı bakteriler için yapılan çalışmada, soya tohumlarındaki kök uzunluğu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada, 0 mM, 80 mM, 160 mM ve 240 mM NaCl konsantrasyonları bitkilere eklenmiştir. Çalışma sonucunda NaCl stresi altındaki bitkilerin kök uzunlukları kontrol bitkisine göre %29 azalma göstermiştir. ALT29 ve ALT43 izolatları inoküle edilen bitkilerin tuz stresine karşı göstermiş olduğu etki olumlu yönde olmuştur ve kök uzunluğu %21 artmıştır (M. A. Khan ve diğ. 2021). Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin izole edildiği bir çalışmada *O. sativa* bitkisine NaCl inoküle edildikten sonra süreç sonundaki kök uzunlukları karşılaştırılmıştır. Çalışmada, *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Lysinibacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Exiguobacterium indicum*, *Microbacterium*

esteraromaticum, *Bacillus aryabhatai* ve *Bacillus subtilis* bakterileri izole edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Lysinibacillus* sp. izolatu 7,27 cm, *Achromobacter* sp. izolatu 7,60 cm, *Microbacterium esteraromaticum* suşu 6,82 cm ile NaCl stresine karşı kök uzunluğu en iyi sonuç veren izolatlar olduğu rapor edilmiştir (Prittesh ve diğ. 2020). *Enterobacter* sp. suşunun NaCl stresi altındaki *O. sativa* bitkisindeki kök uzunluğu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sadece bakteri eklenen bitkinin kök uzunluğu kontrol bitkisine göre önemli bir artış göstermiştir. NaCl stresi altında ve bakteri inoküle edilen bitkinin kök uzunluğu sadece NaCl eklenen bitkinin kök uzunluğuna göre artış göstermiştir (Sarkar ve diğ. 2018). *Alyssum serpyllifolium* bitkisine dört endofitik bakteri inoküle edildikten sonra bitkideki kök uzunluğu ölçülerek bakterilerin bitki büyümesine etkisi incelenmiştir. A3R3, A3S4, A2R6 ve A3S6 olarak adlandırılan izolatlar için kök uzunlukları sırasıyla, $2,5 \pm 0,2$ cm, $2,3 \pm 0,2$ cm, $2,2 \pm 0,3$ cm, $2,3 \pm 0,2$ cm olarak ölçülmüştür (Ma ve diğ. 2011). *Oryza sativa* bitkisine inoküle edilen *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 izolatının NaCl eklendikten sonra kök uzunlukları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kontrol bitkisinin kök uzunluğu $3,15 \pm 0,75$ cm, sadece *B. amyloliquefaciens* RWL-1 inoküle edilen bitkinin kök uzunluğu $5,50 \pm 1,18$ cm, sadece 120 mM NaCl eklenen bitkinin kök uzunluğu $2,80 \pm 0,63$ cm, *B. amyloliquefaciens* RWL-1 inoküle edilen ve 120 mM NaCl eklenen bitkinin kök uzunluğu $4,05 \pm 0,72$ cm, 250 mM NaCl eklenen bitkinin kök uzunluğu $1,90 \pm 0,57$ cm, *B. amyloliquefaciens* RWL-1 inoküle edilen ve 250 mM NaCl eklenen bitkinin kök uzunluğu $3,35 \pm 0,58$ cm ölçülmüştür (Shahzad ve diğ. 2017).

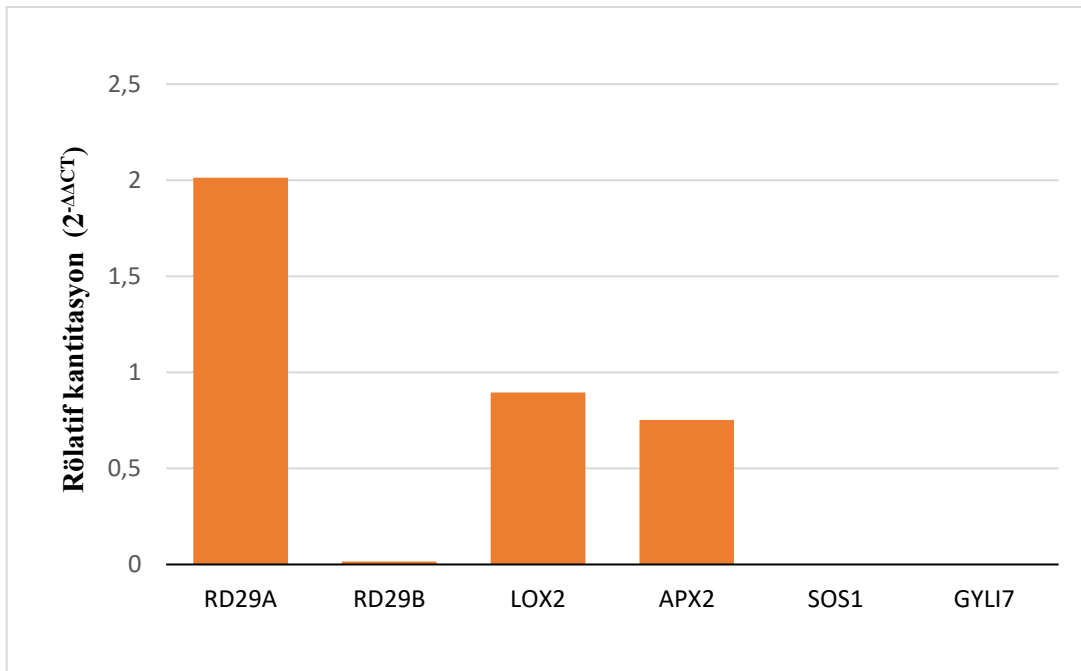
Literatür verileri ile tez çalışmasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, mor kükürtsüz bakterilerin bitki kök ve gövde gelişiminde olumlu etki gösterdiği görülmektedir. Ayrıca, tez çalışması ile elde edilen mor kükürtsüz bakteri izolatlarının mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen bitkinin kök uzunluğuna ve gelişimine olumlu yönde etkisinin olduğu sonucuna varılmaktadır.

4.13 *A. thaliana*'da tuz stres genlerinin ifade düzeylerinin araştırılması

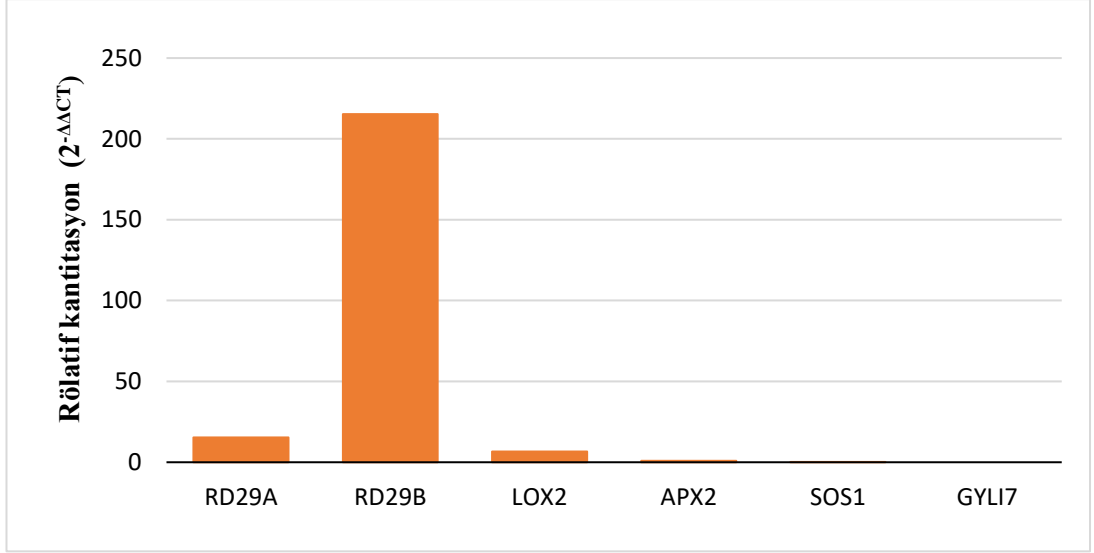
A. thaliana bitkisinde tuz stresi toleransının moleküler mekanizmalarını araştırmak için, erken tuz stresi tepkileriyle ilgili gen bölgelerini hedef alan RD29A, RD29B, LOX2, APX2, GLYI7, SOS1 primerleri kullanılmıştır. Referans gen bölgesi için ise ACTIN2 primeri kullanılmıştır. Bölüm 3.2.18'de anlatılan Real-Time PCR protokolü uygulanarak gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Her bir hedef gen için eşik döngü değerleri (*Ct*) referans gene göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 25.: Referans gene göre normalizasyonu yapılan genlerin ifade düzeyleri

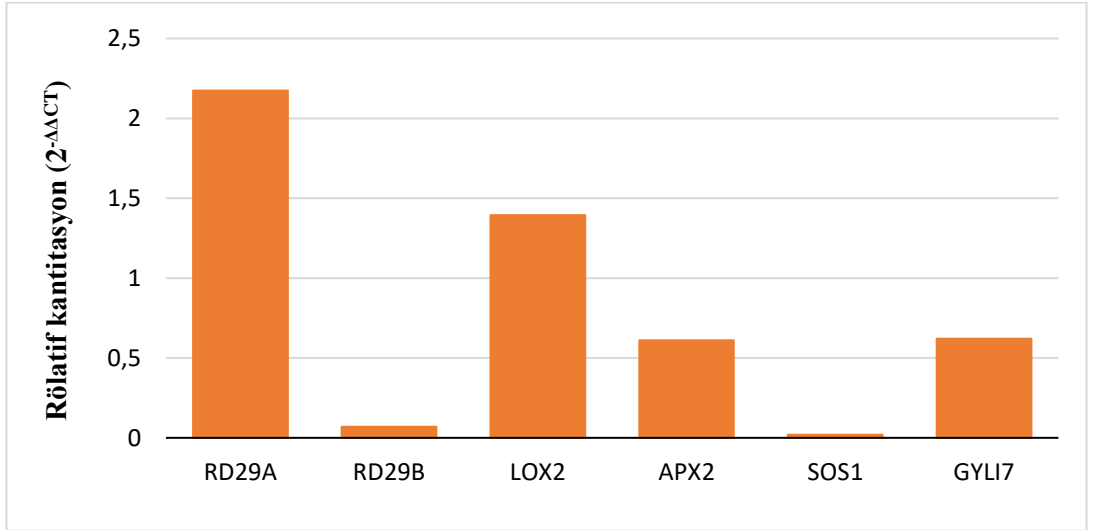
Genler	Mor kükürtsüz bakteri	150 mM NaCl	Mor kükürtsüz bakteri+ 150 mM NaCl
RD29A	2,013	15,348	2,174
RD29B	<1 (0,015)	215,270	<1 (0,07)
LOX2	<1 (0,895)	6,589	1,394
APX2	<1 (0,752)	<1 (0,864)	<1 (0,611)
SOS1	0	<1 (0,03)	<1 (0,02)
GYLI7	0,000017	0	<1 (0,62)



Şekil 27.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkinin gen ifade düzeyleri



Şekil 28.: 150 mM NaCl ilave edilen bitkideki gen ifade düzeyleri



Şekil 29.: Mor kükürtsüz bakterilerin inoküle edilen bitkideki gen ifade düzeyleri

Yapılan bir çalışmada, *Burkholderia phytofirmans* PsJN suşunun 150 mM NaCl varlığında *A. thalina* bitkisine inoküle edilerek kök ve yapraklarındaki gen ifade düzeylerini araştırılmıştır. *B. phytofirmans* PsJN inoküle edilen bitkide RD29A, RD29B, LOX2, APX2, GYLI7 genlerinde kontrole göre yukarı regülasyon olduğu saptanmıştır. Ancak, köklerde 24 saatten sonra LOX2 geninde aşağı regülasyon olduğu saptanmıştır. Bitkinin yapraklarında ise, bu durum RD29A, RD29B, APX2, GYLI7 genlerinde başlangıca göre yukarı regülasyon olmuşken, LOX2 geninde 2. saatte aşağı regülasyon olduktan sonra, 24. saatte yukarı regülasyon olduğu

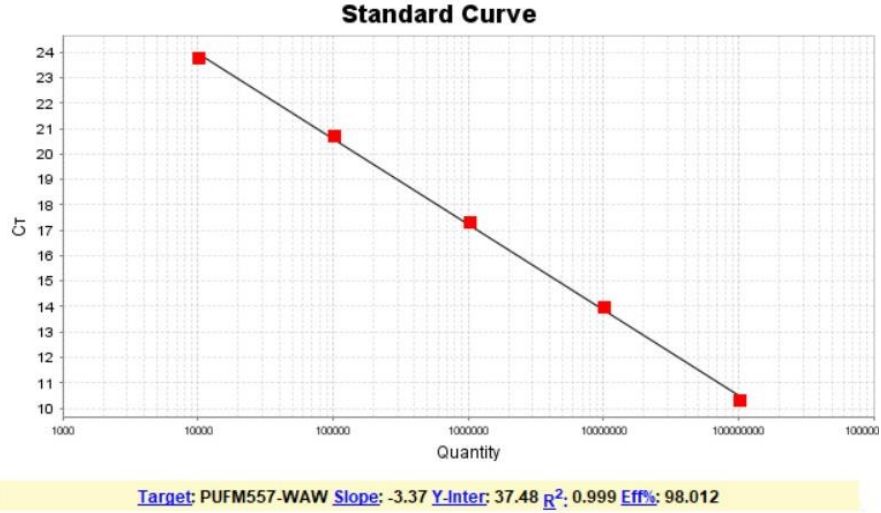
saptanmıştır (Pinedo ve diğ. 2015). Yapılan bir çalışmada tuz stresi altındaki *A. thaliana* bitkisine bir bitki uyarıcısı olan BC204 ilave edilmiştir. Bitkinin 50 mM NaCl varlığında SOT1, SOS1, P5CS1 ve RD29A genlerinin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, BC204, RD29A ve SOS1 genlerinin ifadesini artırırken, P5CS1 ve SOT genlerinin ifadesini azalttığı gözlenmiştir. NaCl, SOT1 ve SOS1 genlerinin ifadesini arttırırken, P5CS1 ve RD29A genlerinin ifadesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. Hem BC204 hem de NaCl'nin birlikte ilave edildiğinde ise, P5CS1 ve RD29A genlerinin ifade düzeyinde azalma gözlenirken, SOS1 ve SOT1 genlerinin ifadelerinde artış gözlenmiştir (Loubser ve Hills, 2020). Bir diğer çalışmada ise, mısır bitkisi plazma zarında bulunan ZmPIP1;1 proteinini *A. thaliana* bitkisine transfer edilmiştir. 120 mM NaCl varlığında RD29A ve RD29B genlerindeki ifade düzeyleri, kontrol bitkisine göre yukarı regüle oldukları rapor edilmiştir (Zhou ve diğ. 2018). *Pseudomonas* PS01 suşu ile aşılanan *A. thaliana* bitkisinin 150 mM tuz stresi koşulları altındaki gen ifade düzeylerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, abiyotik strese duyarlı RD29A, RD29B, LOX2, APX2 ve GLYI7 genleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, 150 mM NaCl eklenmiş bitkideki ve 150 mM NaCl eklenmiş ve *Pseudomonas* PS01 inoküle edilen bitkideki gen ifade düzeylerinin kontrol bitkisine göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. 150 mM NaCl eklenmiş ve *Pseudomonas* PS01 inoküle edilen bitkideki RD29A ve RD29B genlerinin ifade düzeyinin, 150 mM NaCl eklenmiş bitkiye göre farklılık göstermediği görülmüştür. 150 mM NaCl eklenmiş ve *Pseudomonas* PS01 inoküle edilen bitkideki LOX2 geninin ifade düzeyi, 150 mM NaCl eklenmiş bitkiye göre anlamlı bir artış göstermişken, APX2 ve GLYI7 genlerinde anlamlı ifade düzeyleri göstermemiştir (Chu ve diğ. 2019). Bitki büyümesini teşvik edici özelliği olan *Bacillus oryzikola* YC7007 suşunun, 0, 80, 100 mM NaCl stresi altındaki ½ MS ortamında büyütülen *A. thaliana* bitkisi üzerindeki etkilerinin gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan RD29A ve RD29B genleri için *B. oryzikola* YC7007 inoküle edilen ve NaCl eklenen bitkide her iki tuz konsantrasyonunda kontrol bitkisine göre gen ifade düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu rapor edilmiştir (Baek ve diğ. 2020).

Bu tez çalışmasında mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen *A. thaliana*'da RD29A geni haricindeki diğer abiyotik stresle ilgili genlerde anlamlı ifade düzeylerinin olmadığı veya hiç ifade olmadığı saptanmıştır. Mor kükürtsüz bakteri

ve NaCl inoküle edilen bitkide RD29A ve LOX2 genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenirken, diğer genlerde anlamlı ifade düzeyleri saptanmamıştır. Sadece NaCl inoküle edilen bitkinin gen ifade düzeyleri incelendiğinde en yüksek değer RD29B genine ait olduğu görülmektedir. Buna göre; RD29A, RD29B ve LOX2 genlerinde anlamlı ifade düzeyleri saptanmış, APX2 ve SOS1 genlerinde anlamlı ifade düzeyleri saptanamamış, GLY17 geninde ise hiç ifade olmadığı gözlenmiştir. Özetle, gen ifade çalışmalarından elde edilen bilgiye göre, sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen topraktaki *A. thaliana* bitkisi ile mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş ve 150 mM NaCl ilave edilmiş topraktaki *A. thaliana* bitkisindeki gen ifade düzeyleri oldukça benzer olduğu görülmektedir. Sadece 150 mM NaCl ilave edilen topraktaki *A. thaliana* için, stres genlerinde önemli artışlar olduğu görülmektedir (Tablo 25). Bu sonuçlardan, mor kükürtsüz bakterilerin *A. thaliana* bitkisinin 150 mM NaCl varlığında oluşan abiyotik strese karşı olumlu etki gösterdiği ve abiyotik stres yanıt genlerinin ifade düzeylerini neredeyse tuzsuz topraktaki mor kükürtsüz bakteri inoküle edilmiş olan bitkinin gen ifade düzeylerine kadar düşürdüğü sonucuna varılmıştır.

4.14 Bitki rizosferinde mor kükürtsüz bakterilerin biyoizlemesi

Topraktaki mor kükürtsüz bakterilerin belirlenmesi için $1,03 \times 10^{11}$ kopya DNA/ μ L mertebesinden $1,03 \times 10^1$ kopya DNA/ μ L mertebesine seri dilüsyonları yapılan DNA'lar için Real-Time PCR cihazında oluşturulan standart eğri grafiği Şekil 30'da gösterilmiştir. Elde edilen *Ct* değerlerine karşılık gelen DNA kopya sayıları, mor kükürtsüz bakteriler için oluşturulan standart eğri grafiği ile hesaplanmıştır. Mor kükürtsüz bakteriler için kullanılan primer seti (pufM557-pufMWAW) için erime sıcaklığı (*Tm*) ise 87,93°C olarak belirlenmiştir.



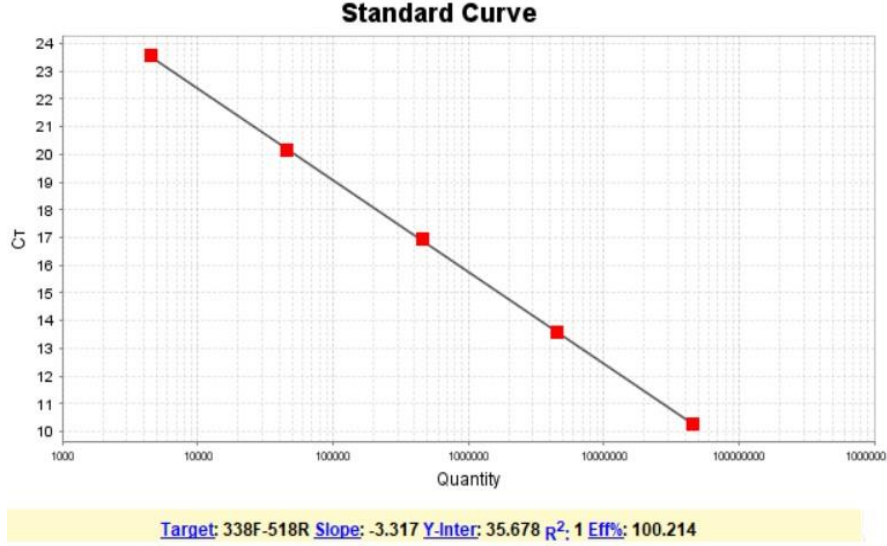
Şekil 30.: İzolatlar için oluşturulan standart eğri grafiği

Mor kükürtsüz bakterilerin PCR ürünü için Real-Time PCR cihazında oluşturulan standart eğri grafiğinin eğimi -3,37 olarak hesaplanmıştır (Şekil 30). Buna göre, mor kükürtsüz bakteriler için ilgili PCR verimi şu şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{PCR verimi} = ([10^{(-1/\text{eğim})}] - 1) \times 100 = ([10^{(-1/-3,37)}] - 1) \times 100 = \%98,03$$

Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen toprakta 0. gün $1,23 \times 10^6$ kopya DNA/10 g, 48. saat $4,60 \times 10^5$ kopya DNA/10 g, 96. saat $7,02 \times 10^5$ kopya DNA/10 g ve 120. saat sonunda $6,92 \times 10^5$ kopya DNA/10 g mertebesinde mor kükürtsüz bakteri miktarları hesaplanmıştır. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl ilave edilen topraktaki mor kükürtsüz bakteri DNA kopya miktarları 0. gün $1,30 \times 10^6$ kopya DNA/10 g, 48. saat $7,16 \times 10^5$ kopya DNA/10 g, 96. saat $1,35 \times 10^6$ kopya DNA/10 g ve 120. saat sonunda $6,08 \times 10^5$ kopya DNA/10 g olarak hesaplanmıştır. Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkinin sonuçlarında, başlangıçta $1,23 \times 10^6$ kopya DNA/10 g iken süreç sonunda bu değer $6,92 \times 10^5$ kopya DNA/10 g hesaplanmıştır. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen bitkinin ölçüm sonuçlarında 1 log azalma görülmüştür. Mor kükürtsüz bakterilerin ve NaCl sonuçları için; başlangıçta $1,30 \times 10^6$ kopya DNA/10 g mertebesindeki değer, 120. saat sonunda $6,08 \times 10^5$ mertebesine 1 log azalma göstermiştir (Şekil 32). Bu değerler göz önüne alındığında, izolatlar bitkinin direkt olarak kök kısmına inoküle edildiğinden dolayı mor kükürtsüz bakterilerin varlığı açısından alınan örneklerde eşit olmadığı yorumu yapılabilir. Ayrıca bitkinin kökleri tarafından salgılanan bazı bileşikler, bitkiler ve bitki büyümesini teşvik eden bakteriler arasındaki ilişkiyi etkiler.

Toplam bakterilerin biyoizleme çalışması için $4,56 \times 10^{10}$ kopya DNA/ μ L mertebesinden $4,56 \times 10^1$ kopya DNA/ μ L mertebesine seri dilüsyonları yapılan DNA'lar için Real-Time PCR cihazında oluşturulan standart eğri grafiği Şekil 31'de gösterilmiştir. Toplam bakteri primer seti (338F-518R) için erime sıcaklığı (Tm) $87,63^\circ\text{C}$ olarak belirlenmiştir.

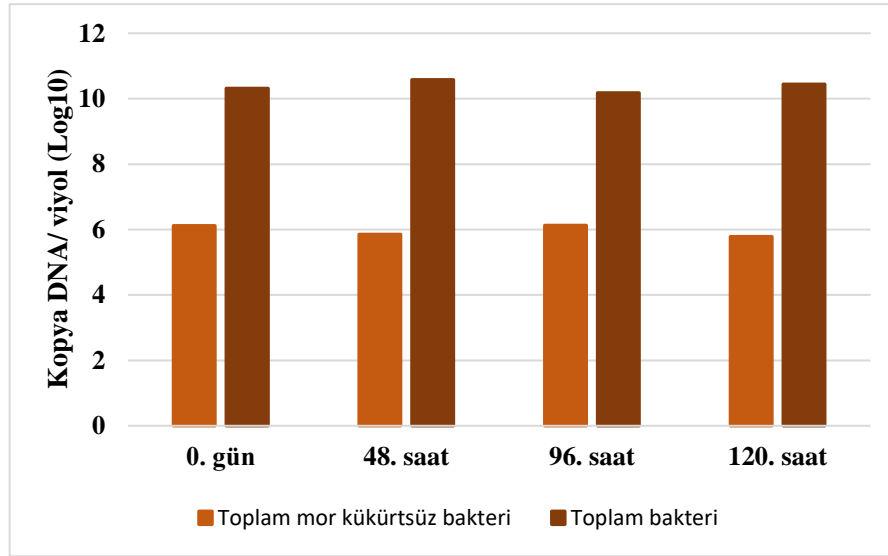


Şekil 31.: Toplam bakteri için oluşturulan standart eğri grafiği

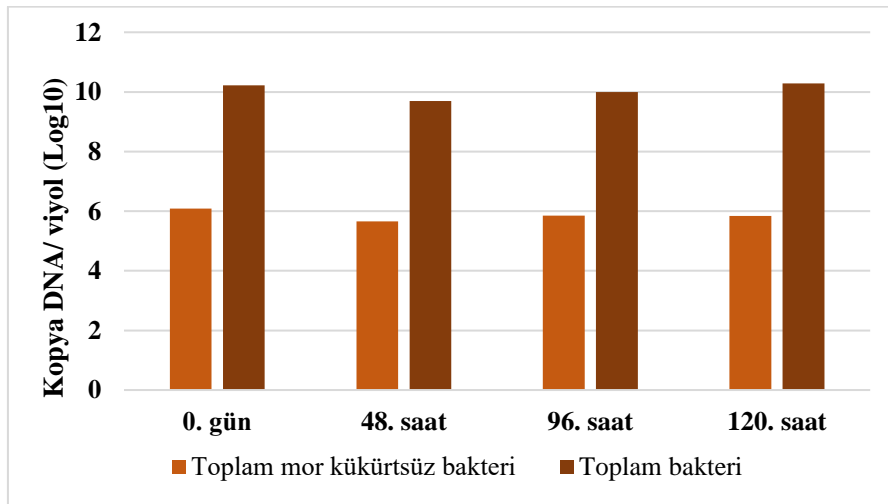
Toplam bakteri PCR ürünü için Real-Time PCR cihazında oluşturulan standart eğri grafiğinin eğimi -3,317 olarak hesaplanmıştır (Şekil 31). Buna göre, toplam bakteri için ilgili PCR verimi şu şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{PCR verimi} = ([10^{(-1/\text{eğim})}] - 1) \times 100 = ([10^{(-1/-3,317)}] - 1) \times 100 = \% 100,2$$

Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen toprakta 0. gün $1,66 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g, 48. saat $4,99 \times 10^9$ kopya DNA/10 g, 96. saat $9,78 \times 10^9$ kopya DNA/10 g, 120. saat sonunda $1,92 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g mertebesinde toplam bakteri miktarları hesaplanmıştır (Şekil 32). Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen topraktaki toplam bakteri DNA kopya miktarları 0. gün $2,07 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g, 48. saat $3,79 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g, 96. saat $1,52 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g, 120. saat sonunda $2,75 \times 10^{10}$ kopya DNA/10 g olarak hesaplanmıştır (Şekil 33). Ayrıca, seyreltme plaka yöntemi ile yapılan agar petri sayım sonuçlarına göre, yapılan petrideki koloni sayımlarının sonuçlarına göre topraktaki toplam bakteri sayısı $2,06 \times 10^9$ kob/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 32.: Sadece mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen viyoldeki (10 g toprak) mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri miktarlarının grafiği



Şekil33.: Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve 150 mM NaCl eklenen viyoldeki (10 g toprak) mor kükürtsüz bakteri ve toplam bakteri miktarlarının grafiği

Bir çalışmada, *Bacillus subtilis* FB17 suşunu bir yaprak patojeni *Pseudomonas syringae* ile enfekte olmuş *A. thaliana* bitkisinin köklerine inoküle edilmiştir. Bitkiye inoküle edilen mikroorganizmalar *A. thaliana* bitkisi tarafından salgılanan L-malik asiti kullanarak bitkinin kök kısmında kolonizasyonun zaman içerisinde arttığı saptanmıştır (Rudrappa ve diğ. 2008). *Rhodobacter* sp. ile yapılan çalışmalarda organizmaların malik asiti kullanabildiklerini göstermişlerdir (Assawamongkhelsiri ve diğ. 2016; Callister ve diğ. 2006; Pandey ve diğ. 2012; Qiang ve diğ. 2019). Bu

tez çalışmasında, *A. thaliana*'nın köküne inoküle edilen *Rhodobacter* sp. izolatları kök tarafından salgılanan malik asiti dolaylı yollardan kullanabileceği ve kök kısmında kolonizasyonun daha yoğun olabileceğini söylenebilir. *Rhodobacter* sp. izolatları bitkinin direkt olarak kök kısmına inoküle edildiğinden dolayı, bitki kökünün zarar görmesini engellemek amacıyla kök kısmına doğru örnek alınmaması hesaplanan değerlerdeki azalışlara neden olabileceği söylenebilir. Mor kükürtsüz bakteri inoküle edilen ve NaCl ilave edilen bitkinin sadece NaCl eklenen bitkiye göre kök gelişimi, yaprak uzunluğu, yaprak sayısı ve klorofil miktarı fazla olması, izolatların bitkiye inoküle edildikten sonraki süreç içerisinde ya sabit kaldığını ya da miktarsal olarak artmış olabileceğini düşündürmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonucunda, izole edilen izolatların bitki büyümesine olumlu yönde etkileri olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında, mor kükürtsüz bakterilerin eklendiği toprakta bulunan bitkinin, zamanla kök ve yaprak boyut ve sayılarındaki artışlar ile birlikte klorofil miktarında artış olduğu saptanmıştır. Gen ifade çalışmalarından elde edilen veriler de bu sonuçları desteklemiştir. Sonuç itibariyle *Rhodobacter* sp. olarak tanımlanan dört mor kükürtsüz bakteri izolatının tuz stresi altındaki bitkide hem fizyolojik olarak hem de gen ifade seviyelerinde olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara yönelik öneriler şu şekilde sıralanabilir: Çalışmada araştırılan yapmış olduğumuz azot fiksasyonu yeteneği, fosfat çözündürme yeteneği, IAA üretimi ve ALA üretimi gibi etki mekanizmalarının yanı sıra bitki büyümesini teşvik eden farklı etki mekanizmaları da mevcuttur. Örnek olarak bakterilerin biyokontrol ajanı olarak kullanılabilmesi verilebilir. Biyokontrol ajanı olarak kullanılan bakteriler, bitkilerin hastalık kontrolünde ve bitki büyümesinin desteklenmesinde önemli roller oynayan HCN dahil olmak üzere çok sayıda metabolit üretir. Bu mekanizmalardan biri olan hidrojen siyanür (HCN) üretimi genellikle bitki büyümesini teşvik edici bakteriler tarafından küçük miktarlarda sentezlenir ve bu da fungusların, bakteriler tarafından sentezlenen antifungal metabolitlere karşı direnç geliştirmesini engeller ve böylece biyokontrol ajanı olarak kullanılan bakteri suşunun etkinliğini artırır (Sehrawat ve diğ. 2022). Bir diğer etki mekanizması ise siderefor üretimidir. Sideroforlar, demir şelatlama potansiyeline sahip düşük moleküler ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin temel mekanizmalarından biri de siderefor gibi ikincil metabolitlerin üretimini içermektedir. Demir toprakta bol miktarda bulunmasına rağmen, çoğu bitki tarafından kullanılamaz. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler tarafından üretilen sideroforlar, toprakta bulunan organik veya inorganik komplekslerin çözünmesine ve şelatlanmasını sağlayarak bitkilerin demir ihtiyacının karşılanmasına yardımcı olur (Arora ve Verma, 2017). Çalışmada izole edilen mor kükürtsüz bakteriler için bitki büyümesine yardımcı olan ve yukarıda bahsedilen etki mekanizmaları üzerinde çalışmalar yapılarak desteklenebilir.

Dünyada hızla artan nüfus nedeniyle gıdaya olan ihtiyaçta artmaktadır. Bu nedenle ekilebilir arazide istenmeyen böceklerin, yabancı otların ve patojen mikroorganizmaların yok edilmesi için pestisitler kullanılmaktadır (Umadevi ve diğ. 2017). Toprağın sürekli olarak pestisitlerle ağır şekilde muamele edilmesi sonucunda toprakta var olan yararlı mikroorganizmaların popülasyonlarının da azalmasına neden olabilmektedir (Aktar ve diğ. 2009). Topraktaki biriken pestisitleri parçalama yeteneğine sahip çeşitli mikroorganizma kaynakları vardır. Pestisitleri parçalama yeteneğine sahip çeşitli mikroorganizma kaynakları vardır. Genel olarak, pestisit bozundurucuları olarak tanımlanan mikroorganizmalar, çok çeşitli pestisit kontamine olmuş bölgelerden izole edilmiştir. Pestisit tamamen biyolojik olarak bozunduğunda, ana bileşiğin oksidasyonu ile karbondioksit ve su oluşur. Bu işlem mikroorganizmalara metabolizmaları için gereken enerjiyi sağlar (Parte ve diğ. 2017). Mikroorganizmalar ile pestisitlerin parçalanma özelliği göz önüne alındığında elde ettiğimiz izolatların ileri çalışmalarında tarım alanında yaygın olarak kullanılan pestisitlerin giderimi bir başka çalışma konusu olarak ele alınabilir.

Çalışmada kullanılan *A. thaliana* bitkisi üzerinde etkilerinin incelendiği mor kükürtsüz bakterilerin bir sonraki çalışmalarda sürdürülebilirlik ve ekonomik açıdan farklı bitkiler üzerinde *in vitro* ve *in situ* etkinlikleri araştırılabilir. Bu bağlamda bitki büyümesini teşvik edici özellikleri belirlenen izolatlar, tarımsal alanda biyogübre olarak kullanılabilir.

6. KAYNAKÇA

Ahmed, V., Verma, M. K., Gupta, S., Mandhan, V., Chauhan, N. S., “Metagenomic Profiling of Soil Microbes to Mine Salt Stress Tolerance Genes”, *Frontiers in Microbiology*, 9:159, (2018).

Alef, K. and Nannipieri, P., *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, London: Academic Press, 311-373, (1995).

Ali, S., Hameed, S., Shahid, M., Iqbal, M., Lazarovits, G., Imran, A., “Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity”, *Microbiological Research.*, 232, 126389, (2020).

Aktar, Md. W., Sengupta, D., Chowdhury, A., “Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards”, *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12, (2009).

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., Hayat, S., “Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77, (2020).

Arora, N. K. and Verma, M. “Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria”, *3 Biotech*, 7(6), 381, (2017).

Asif, A., Mohsin, H., Rehman, Y. *Recent Advancement in Microbial Biotechnology*, London: Academic Press, 309-337, (2021).

Assawamongkholisiri, T., Plangklang, P., Reungsang, A., “Photofermentation and lipid accumulation by *Rhodobacter* sp. KKU-PS1 using malic acid as a substrate”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(15), 6259-6270, (2016).

Baek, D., Rokibuzzaman, M., Khan, A., Kim, M. C., Park, H. J., Yun, D., Chung, Y. R., “Plant-Growth Promoting *Bacillus oryzicola* YC7007 Modulates Stress-Response Gene Expression and Provides Protection From Salt Stress” *Frontiers in Plant Science*, 10:1646, (2020).

Basak, N., Jana, A. K., Das, D., Saikia, D., “Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(13), 6853-6871, (2014).

Batool, K., tuz Zahra, F. ve Rehman, Y., “Arsenic-Redox Transformation and Plant Growth Promotion by Purple Nonsulfur Bacteria *Rhodopseudomonas palustris* CS2 and *Rhodopseudomonas faecalis* SS5”, *BioMed Research International*, (2017).

Bu, Q., Li, H., Zhao, Q., Jiang, H., Zhai, Q., Zhang, J., Daowen, W., Chuanyou, L., “The Arabidopsis RING Finger E3 Ligase RHA2a Is a Novel Positive Regulator of Abscisic Acid Signaling during Seed Germination and Early Seedling Development”, *Plant Physiology*, 150(1), 463-481, (2009).

Callister, S. J., Nicora, C. D., Zeng, X., Roh, J. H., Dominguez, M. A., Tavano, C. L., Monroe, M. E., Donohue, T. J., Smith, R. D., Lipton, M. S., “Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 proteomes”. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 424-436, (2006).

Casida, L. E., “Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations”, *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 630-636, (1977).

Chu, T. N., Tran, B. T. H., Van Bui, L., Hoang, M. T. T., “Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*”, *BMC Research Notes*, 12(1), 11, (2019).

Doğan-Güner, E. M. and Koku, H., “Analysis of the carbon metabolism of *Rhodopseudomonas palustris* for biohydrogen production”, *Biotech Studies*, 31(1), 1-15, (2022).

Dutta, A., Banerjee, S., Dinda, S., Chowdhury, I., Haldar, S., Bandyopadhyay, S., “A critical analysis on the roles of exopolysaccharides and ACC deaminase in salinity stress tolerance in crop plants”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102372, (2022).

Egamberdieva, D., Alaylar, B., Kistaubayeva, A., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., “Biochar for Improving Soil Biological Properties and Mitigating Salt Stress in Plants on Salt-affected Soils”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53(2), 140-152, (2022).

Einen, J., Thorseth, I. H. ve Øvreås, L., “Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy”, *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 182-187, (2008).

El-Esawi, M. A., Al-Ghamdi, A. A., Ali, H. M., Alayafi, A. A., “*Azospirillum lipoferum* FK1 confers improved salt tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by modulating osmolytes, antioxidant machinery and stress-related genes expression”, *Environmental and Experimental Botany*, 159, 55-65, (2019).

Etesami, H., Noori, F., Ebadi, A. ve Reiahi Samani, N., *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*, Cham: Springer International Publishing, 287-315, (2020).

Feraru, E., Feraru, M. I., Barbez, E., Waidmann, S., Sun, L., Gaidora, A., Kleine-Vehn, J., “PILS6 is a temperature-sensitive regulator of nuclear auxin input and organ growth in *Arabidopsis thaliana*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3893-3898, (2019).

Food and Agriculture Organization of the United Nations, “Global map of salt-affected soils [online]”, (10 Ekim 2022), <https://www.fao.org/3/cb7247en/cb7247en.pdf>, (2021).

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. ve Olsen, G. J., “Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470, (2008).

Gamalero, E. and Glick, B. R., “Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress”, *Biology*, 11(3), 437, (2022).

García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A. ve Groppa, M. D., “In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress”, *Microbiological Research*, 202, 21-29, (2017).

Ge, H. ve Zhang, F., “Growth-Promoting Ability of *Rhodopseudomonas palustris* G5 and Its Effect on Induced Resistance in Cucumber Against Salt Stress”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 180–188, (2019).

Glick, B. R., “Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications”, *Scientifica*, (2012).

Goodrich, J., “Arabidopsis: A Laboratory Manual. D. WEIGEL & J. GLAZEBROOK”, *Genetics Research*, 80(1), 77-77, (2002).

Goswami, M. ve Deka, S., “Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: A review”, *Pedosphere*, 30(1), 40-61, (2020).

Gupta, R. S., Beatty, J. T., *Advances in Botanical Research*, 66, San Diego, USA: Academic Press, 37-66, (2013).

Hansen, T. A., Van Gernerden, H., “Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria”, *Archiv für Mikrobiologie*, 86(1), 49-56, (1972).

Hartman, K. and Tringe, S. G., “Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress”, *Biochemical Journal*, 476(19), 2705-2724, (2019).

Hayashi, S., Iwamoto, Y., Hirakawa, Y., Mori, K., Yamada, N., Maki, T., Yamamoto, S., Miyasaka, H., “Plant-Growth-Promoting Effect by Cell Components of Purple Non-Sulfur Photosynthetic Bacteria”, *Microorganisms*, 10(4), 771, (2022).

Hohmann, N., Schmickl R., Chiang T., Lučanová M., Kolář F., Marhold K., Koch M. A., “Taming the wild: resolving the gene pools of non-model Arabidopsis lineages”, *BMC Evolutionary Biology*, 14, 224, (2014).

Imhoff, J. F., Hiraishi, A. and Süling, J., *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays*, 119-132, (2005).

Iwai, R., Uchida, S., Yamaguchi, S., Sonoda, F., Tsunoda, K., Nagata, H., Koga, A., Goto, M., Hatashi, S., Yamamoto, S., Miyasaka, H., “Effects of Seed Bio-

Priming by Purple Non-Sulfur Bacteria (PNSB) on the Root Development of Rice”, *Microorganisms*, 10(11), 2197, (2022).

Kant, S., Kant, P., Raveh, E. and Barak, S., “Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. Halophila*”, *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1220-1234, (2006).

Kantha, T., Kantachote, D. ve Klongdee, N., “Potential of biofertilizers from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains to assist rice (*Oryza sativa* L. subsp. Indica) growth under salt stress and to reduce greenhouse gas emissions”, *Annals of Microbiology*, 65(4), 2109-2118, (2015)

Kaur, H., Sharda, R. ve Sharma, P., “Effect of Hoagland solution for growing tomato hydroponically in greenhouse”, *HortFlora Research Spectrum*, 5(4), 310-315, (2016).

Khan, A. R., Park, G.-S., Asaf, S., Hong, S.-J., Jung, B. K. ve Shin, J.-H., “Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants”, *PLOS ONE*, 12(2), e0171534, (2017).

Khan, M. A., Sahile, A. A., Jan, R., Asaf, S., Hamayun, M., Imran, M., Adhikari, A., Kang, S., Kim, K., Lee, I., “Halotolerant bacteria mitigate the effects of salinity stress on soybean growth by regulating secondary metabolites and molecular responses”. *BMC Plant Biology*, 21(1), 176, (2021).

Khuong, N. Q., Kantachote, D., Dung, N. T. T., Huu, T. N., Thuc, L. V., Thu, L. T. M., Quang, L. T., Xuan, D. T., Nhan, T. C., Tien, P. D., “Potential of potent purple nonsulfur bacteria isolated from rice-shrimp systems to ameliorate rice (*Oryza sativa* L.) growth and yield in saline acid sulfate soil”, *Journal of Plant Nutrition*, 46(3), 1-22, (2022).

Khuong, N. Q., Kantachote, D., Thuc, L. V., Nookongbut, P., Xuan, L. N. T., Nhan, T. C., Xuan, L. N. T., Tantirunkij, M., “Potential of Mn²⁺-Resistant Purple Nonsulfur Bacteria Isolated from Acid Sulfate Soils to Act as Bioremediators and Plant Growth Promoters via Mechanisms of Resistance”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(4), 2364-2378, (2020).

Krämer, U., “Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*”. *ELife*, 4, e06100, (2015).

Kubi, H. A. A., Khan, M. A., Adhikari, A., Imran, M., Kang, S.-M., Hamayun, M. ve Lee, I.-J., “Silicon and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas psychrotolerans* CS51 Mitigates Salt Stress in *Zea mays* L.”, *Agriculture*, 11(3), 272, (2021).

Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., Verma, J. P., “Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants”, *Frontiers in Microbiology*, 11:1216, (2020).

Kumar, Bahadur, D., Maurya, B., Raghuwanshi, R., Meena, V., Singh, D. ve Dixit, J., “Dose a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability”, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9, 715-724, (2015).

Koch, Marcus A., and Matschinger M., “Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 6272-77, (2007).

Kooke, R., Kruijer W., Bours R., Becker F., Kuhn A., Geest H., Buntjer J., Doeswijk, T., Guerra, J., Bouwmeester, H., Vreugdenhil, D., Keurentjes, J. J. B., “Genome-Wide Association Mapping and Genomic Prediction Elucidate the Genetic Architecture of Morphological Traits in *Arabidopsis*”. *Plant Physiology*, 170, 2187, (2016).

Lai, Y. C., Liang, C. M., Hsu, S. C., Hsieh, P. H. ve Hung, C. H., “Polyphosphate metabolism by purple non-sulfur bacteria and its possible application on photo-microbial fuel cell”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(6), 722-730, (2017).

Li, X., Sun, P., Zhang, Y., Jin, C. ve Guan, C., “A novel PGPR strain *Kocuria rhizophila* Y1 enhances salt stress tolerance in maize by regulating phytohormone levels, nutrient acquisition, redox potential, ion homeostasis, photosynthetic capacity and stress-responsive genes expression”, *Environmental and Experimental Botany*, 174, 104023, (2020).

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method”, *Methods*, 25(4), 402-408, (2001).

Lorenzen, I., Aberle, T., Plieth, C., “Salt stress-induced chloride flux: A study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe”, *The Plant Journal*, 38(3), 539-544, (2004).

Loubser, J. and Hills, P., “The Application of a Commercially Available Citrus-Based Extract Mitigates Moderate NaCl-Stress in *Arabidopsis thaliana* Plants”, *Plants*, 9(8), 1010, (2020a).

Loubser, J. and Hills, P., “The Application of a Commercially Available Citrus-Based Extract Mitigates Moderate NaCl-Stress in *Arabidopsis thaliana* Plants”, *Plants*, 9(8), E1010, (2020b).

Lu, H., Zhang, G., He, S., Zhao, R., Zhu, D., “Purple non-sulfur bacteria technology: A promising and potential approach for wastewater treatment and bioresources recovery”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(9), 161, (2021).

Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., Freitas, H., “Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—Effects on plant growth and Ni uptake”, *Journal of Hazardous Materials*, 195, 230-237, (2011).

Madigan, M., Cox, S. S., Stegeman, R. A., “Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae”, *Journal of Bacteriology*, 157(1), (1984).

Madigan, M. T. and Jung, D. O., *The Purple Phototrophic Bacteria*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1-15, (2009).

Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Allaoui, A., Biskri, L., “Plant Growth Enhancement using Rhizospheric Halotolerant Phosphate Solubilizing Bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 Isolated from *Chenopodium quinoa* Willd”, *Microorganisms*, 8(6), (2020).

Majeed, A., Muhammad, Z., Ahmad, H., “Plant growth promoting bacteria: Role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops”, *Plant Cell Reports*, 37(12), 1599-1609, (2018).

McKinlay, J. B., *Microbial BioEnergy: Hydrogen Production*, 38, Dordrecht: Springer Netherlands, 155-176, (2014).

Merugu, E., Rudra, M. P. P., Girisham, S., Reddy, S. M., “Biotechnological Applications of Purple Non Sulphur Phototrophic Bacteria: A Minireview”, 3(1), 376-384, (2012).

Mukhtar, S., Zareen, M., Khaliq, Z., Mehnaz, S. ve Malik, K., “Phylogenetic analysis of halophyte-associated rhizobacteria and effect of halotolerant and halophilic phosphate-solubilizing biofertilizers on maize growth under salinity stress conditions”, *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 556-573, (2020).

Mohamed, H. I. and Gomaa, E. Z., “Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress”, *Photosynthetica*, 50(2), 263-272, (2012).

Montiel-Corona, V., Buitrón, G., “Polyhydroxyalkanoates from organic waste streams using purple non-sulfur bacteria”, *Bioresource Technology*, 323, 124610, (2021).

Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M. H., Oldroyd, G. E. D., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ane, J. M., Peters, J. W., “Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes”, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3698-3710, (2016).

Naing, A. H., Maung, T.-T. ve Kim, C. K., “The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase

activities in plant tolerance to abiotic stress”, *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1992-2012, (2021).

Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A. ve Sopory, S. K., “Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 1-9, (2013).

Naqqash, T., Imran, A., Hameed, S., Shahid, M., Majeed, A., Iqbal, J., Hanif, M., Ejaz, S., Malik, K. A., “First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. As growth enhancer and root colonizer of potato”, *Scientific Reports*, 10(1), 12893, (2020).

Neshat, M., Abbasi, A., Hosseinzadeh, A., Sarikhani, M. R., Dadashi Chavan, D. ve Rasoulnia, A., “Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms”, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 347-361, (2022).

Nookongbut, P., Kantachote, D., Khuong, N. Q., Sukhoom, A., Tantirungkij, M., Limtong, S., “Selection of Acid-Resistant Purple Nonsulfur Bacteria from Peat Swamp Forests to Apply as Biofertilizers and Biocontrol Agents”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(3), 488-500, (2019).

Nunkaew, T., Kantachote, D., Nitoda, T. ve Kanzaki, H., “Selection of salt tolerant purple nonsulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation”, *Applied Soil Ecology*, 86, 113-120, (2015).

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. and Babalola, O. O., “Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197, (2017).

Pandey, A., Srivastava, N. and Sinha, P., “Optimization of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* NMBL-01”, *Biomass and Bioenergy*, 37, 251-256, (2012).

Patten, C. L. and Glick, B. R., “Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid”, *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220, (1996).

Papagiannakis, E., Kennis, J. T. M., van Stokkum, I. H. M., Cogdell, R. J. and van Grondelle, R., “An alternative carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer pathway in photosynthetic light harvesting”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6017-6022, (2002).

Parte, S. G., Mohekar, A. D. and Kharat, A. S., “Microbial degradation of pesticide: A review”, *African Journal of Microbiology Research*, 11(24), 992-1012, (2017).

Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D. ve Luna, M. V., “Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143-1150, (2007).

Pinedo, I., Ledger, T., Greve, M. and Poupin, M. J., “*Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance”, *Frontiers in Plant Science*, 6, 466, (2015).

Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., González, B., “Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*”, *PLOS ONE*, 8(7), e69435, (2013).

Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., Jat, L. K., *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, Woodhead Publishing, 129-157, (2019).

Prittesh, P., Avnika, P., Kinjal, P., Jinal, H. N., Sakthivel, K., Amaresan, N., “Amelioration effect of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria on growth and physiological properties of rice (*Oryza sativa*) under salt-stressed conditions”, *Archives of Microbiology*, 202(9), 2419-2428, (2020).

Qiang, S., Su, A. P., Li, Y., Chen, Z., Hu, C. Y. ve Meng, Y. H., “Elevated β -Carotene Synthesis by the Engineered *Rhodobacter sphaeroides* with Enhanced CrtY Expression”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(34), 9560-9568, (2019).

Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S. Y., Hashidoko, Y., “Salkowski’s Reagent Test as a Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11), 2202-2208, (2010).

Ramakrishna, W., Yadav, R. and Li, K., “Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin”, *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18, (2019).

Ray, S., Singh S., Sarma B. K., Singh H. B., “Endophytic *Alcaligenes* Isolated from Horticultural and Medicinal Crops Promotes Growth in Okra (*Abelmoschus Esculentus*)”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 401-12, (2016).

Richard, P. O., Adekanmbi, A. O., Ogunjobi, A. A., “Screening of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize Plant (*Zea Mays* L.) for Ammonia Production and Nitrogen Fixation”, *African Journal of Microbiology Research*, 12, 829-34, (2018).

Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., Bais, H. P., “Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria”, *Plant Physiology*, 148(3), 1547-1556, (2008).

Sakpirom, J., Kantachote, D., Nunkaew, T. ve Khan, E., “Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation”, *Research in Microbiology*, 168(3), 266-275, (2017).

Sarker, P. K., Karmoker, D., Shohan, M. U. S., Saha, A. K., Rima, F. S., Begum, R. A., Islam, M. R., Seraj, Z. I., “Effects of multiple halotolerant rhizobacteria on the tolerance, growth, and yield of rice plants under salt stress”, *Folia Microbiologica*, (2022).

Sehrawat, A., Sindhu, S. S., Glick, B. R., “Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture”, *Pedosphere*, 32(1), 15-38, (2022).

Singh, R. P., Jha, P., Jha, P. N., “The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress”, *Journal of Plant Physiology*, 184, 57-67, (2015).

Su, P., Tan, X., Li, C., Zhang, D., Cheng, J., Zhang, S., Lu, X., “Photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* GJ-22 induces systemic resistance against viruses”, *Microbial Biotechnology*, 10(3), 612-624, (2017).

Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S.-M., Lee, I.-J. “Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*”, *Environmental and Experimental Botany*, 136, 68-77, (2017).

Smoleń, S., Lukasiwicz, A., Klimek-Chodacka, M. ve Baranski, R., “Effect of Soil Salinity and Foliar Application of Jasmonic Acid on Mineral Balance of Carrot Plants Tolerant and Sensitive to Salt Stress”, *Agronomy*, 10(5), 659, (2020).

Sridharan, R., Vetrivelan, M., Krishnaswamy, V. G., Jansi R, S., Rishin, H., Kumar D, T. ve Doss C, G. P., “Integrated approach in LDPE degradation – An application using Winogradsky column, computational modeling, and pathway prediction”, *Journal of Hazardous Materials*, 412, 125336, (2021).

Tammam, A. A., Rabei Abdel Moez Shehata, M., Pessaraki, M., El-Aggan, W. H., “Vermicompost and its role in alleviation of salt stress in plants – I. Impact of vermicompost on growth and nutrient uptake of salt-stressed plants”, *Journal of Plant Nutrition*, 1-12, (2022).

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11”, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027, (2021).

Tiang, M. F., Fitri Hanipa, M. A., Abdul, P. M., Jahim, J. M. d., Mahmud, S. S., Takriff, M. S., Lay, C. H., Reungsang, A., Wu, S. H., “Recent advanced biotechnological strategies to enhance photo-fermentative biohydrogen production by

purple non-sulphur bacteria: An overview”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(24), 13211-13230, (2020).

Tirry, N., Kouchou A., El Omari B., Ferioun M., El Ghachtouli N., “Improved chromium tolerance of *Medicago sativa* by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)”, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1149, (2021).

Torpee, S., Kantachote, D., Sukhoom, A., Tantirungkij, M., “Culture optimization to enhance carotenoid production of a selected purple nonsulfur bacterium and its activity against acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (2021).

Ullah, S. and Bano, A., “Isolation of plant-growth-promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of halophytes and their impact on maize (*Zea mays* L.) under induced soil salinity”, *Canadian Journal of Microbiology*, 61(4), 307-314, (2015).

Umadevi, S., Ayyasamy, P. M., Rajakumar, S., *Bioremediation and Sustainable Technologies for Cleaner Environment*, Cham: Springer International Publishing, 3-12, (2017).

Wang, Z., Xu, G., Ma, P., Lin, Y., Yang, X., Cao, C., “Isolation and Characterization of a Phosphorus-Solubilizing Bacterium from Rhizosphere Soils and Its Colonization of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis*)”, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1270, (2017).

Wang, J., Li, R., Hui, Z., Wei, G., Li, Z., “Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application”, *BMC Microbiology*, 20, 38, (2020).

Yang, P. Y. and Ting, I. S.,” Nitrogen Fixing Biomass for Aerobic Treatment of Soft Drink Bottling Plant Wastewater”, *In Proceedings Ninth National Symposium on Food Processing Wastes*, 100, (1978).

Yutin, N., Suzuki, M. T., Béjà, O., “Novel Primers Reveal Wider Diversity among Marine Aerobic Anoxygenic Phototrophs”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8958-8962, (2005).

Zhou, L., Zhou, J., Xiong, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, G., Cai, Y., “Overexpression of a maize plasma membrane intrinsic protein ZmPIP1;1 confers drought and salt tolerance in *Arabidopsis*”, *PLOS ONE*, 13(6), e0198639, (2018).