

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ TEK YILLIK BİTKİLERDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT
BAKTERİLERDE SİDEROFOR ÜRETİM POTANSİYELLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Şilan ATBAŞ
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ TEK YILLIK BİTKİLERDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT
BAKTERİLERDE SİDEROFOR ÜRETİM POTANSİYELLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Şilan ATBAŞ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2019-8770
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2022

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN danışmanlığında, Şilan ATBAŞ tarafından sunulan “Çeşitli Tek Yıllık Bitkilerden İzole Edilmiş Olan Endofit Bakterilerde Siderofor Üretim Potansiyelleri” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 09/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Yasemin BEKTAŞ

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Şilan ATBAŞ

ÖZET

ÇEŞİTLİ TEK YILLIK BİTKİLERDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT BAKTERİLERDE SİDEROFOR ÜRETİM POTANSİYELLERİ

ATBAŞ, Şilan

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Haziran 2022, 57 sayfa

Endofit bakteriler sağlıklı bitkilerin dokuları içinde hiçbir belirgin hastalık belirtisine neden olmadan, yaşam döngüsünün tamamını veya bir kısmını geçiren mikroorganizmalardır. Bu çalışmada daha önce bazı kültür ve yabanıl tahıl bitkilerinin (Poaceae familyası) sağlıklı kök, gövde ve yaprak örneklerinden izolasyonu gerçekleştirilen 30 adet endofit bakteri izolatu için Kobalt (Co), Nikel (Ni) ve Demir (Fe) elementleri için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) değerleri belirlenmiş ve akabinde izolatların Fe^{+3} ihtiyaçlarını karşılamak için ürettikleri siderofor moleküllerinin Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} ağır metallerine bağlanabilme kabiliyetlerinin test edilmiştir. 10 adet izolatın siderofor üretmediği görülmüştür. Bu izolatların dışındaki 20 adet izolatın farklı değerlerde siderofor ürettikleri ve ayrıca yine bu 20 adet izolatın sentezleyip besi ortamına salgıladıkları siderofor moleküllerinin her üç metal (Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2}) için afiniteleri olduğu ortaya konmuştur. Bir sonraki aşamada izolatların her bir metale karşı verdikleri MIC değerleri göz önünde bulundurularak, bu metaller Chrome Azurol Sulfonate (CAS) besi ortamlarına eklenmiş ve izolatların ağır metal stresi altında siderofor üretim profilleri incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında, siderofor üretim indekslerine (SI) göre seçilen belirli sayıda izolatın 16S rRNA dizilemesi yolu ile moleküler tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonucunda, 2 adet *Pseudomonas sp.*, 4 adet *Bacillus sp.*, 1 adet *Chryseobacterium sp.*, 1 adet *Staphylococcus sp.*, 1 adet *Peribacillus sp.* cinslerine ait sonuç vermiştir.

Anahtar kelimeler: Ağır metal, Endofit bakteriler, Mikrobiyal biyoteknoloji, Siderofor, 16S rRNA.



ABSTRACT

SIDEROPHORE PRODUCTION POTENTIALS IN ENDOPHYTE BACTERIA ISOLATED FROM VARIOUS ANNUAL PLANTS

ATBAŞ, Şilan

M.Sc. Thesis, Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bilgin TAŞKIN

June 2022, 57 pages

Endophyte bacteria are microorganisms that pass all or part of their life cycle in the tissues of healthy plants without causing any obvious signs of disease. In this study, Minimum Inhibition Concentration (MIC) for Cobalt (Co), Nickel (Ni) and Iron (Fe) elements for 30 endophyte bacterial isolates previously isolated from healthy root, stem and leaf samples of some cultivated and wild cereal plants (Poaceae family) values were determined and then the ability of the siderophore molecules produced to meet the Fe^{+3} needs of the isolates were tested to bind to Co^{+2} and Ni^{+2} heavy metals other than Fe^{+3} . It was observed that 10 isolates did not produce siderophores. It was revealed that 20 isolates other than these 10 isolates produce siderophores with different values, and that the siderophore molecules synthesized and secreted by these 20 isolates have affinities for all three metals (Fe^{+3} , Co^{+2} and Ni^{+2}). In the next step, considering the MIC values of the isolates against each metal, these metals were added to Chrome Azurol Sulfonate (CAS) media and the siderophore production profiles of the isolates under heavy metal stress were investigated. In the final stage of the study, molecular identification of a certain number of isolates selected according to their siderophore production index (SI) was carried out by 16S rRNA sequencing. As a result of the sequence analysis, 2 *Pseudomonas* sp., 4 *Bacillus* sp., 1 *Chryseobacterium* sp., 1 *Staphylococcus* sp., 1 *Peribacillus* sp. were revealed.

Keywords: Heavy metal, Endophyte bacteria, Microbial biotechnology, Siderophore, 16S rRNA.



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın her aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca hep yanımda olan her zaman moral veren ve cesaretlendiren yol arkadaşım Zafer MUŞ'a, arkadaşım Rümeysa GÖK'e teşekkür ederim. Gerek lisans gerekse yüksek lisans eğitimim süresince gösterdikleri ilgi ve destek için tüm Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyesi ve araştırma görevlisi hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Çalışma sürecinde gösterdikleri sabır, anlayış ve destekleri için tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmaya FYL-2019-8770 nolu proje ile destek veren Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

2022

Şılan ATBAŞ



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Endofit Bakteriler	3
2.2. Endofit Bakterilerin Çeşitliliği	4
2.3. Endofit Bakterilerin Bitkide Kolonizasyonu	5
2.4. Endofit Bakterilerin Önemi ve Biyoteknoloji	5
2.5. Sideroforların Genel Özellikleri	6
2.5.1. Siderofor nedir?	6
2.5.2. Kimyasal yapılarına göre sideroforlar	7
2.5.3. Hidroksamat siderofor	8
2.5.4. Katekolat (Fenolat) siderofor	8
2.5.5. Karboksilat sideroforlar	8
2.5.6. Karışık ligant	8
2.5.7. Siderofor üretimi	9
2.6. Ağır Metaller ve Siderofor İlişkisi	10
2.6.1. Ağır metaller	10
2.6.2. Sideroforlar ve demir	11
2.6.3. Sideroforlar ve diğer metaller	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Bakteri İzolatları	13
3.2. İzolatların Geliştirilmesi	14

3.3. İzolatların Kobalt (Co), Nikel (Ni) ve Demir (Fe) Elementleri için	
Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerlerinin (MIC) Belirlenmesi	15
3.4. Siderofor Aktivitelerinin Belirlenmesi	16
3.4.1. Chrome azurol S (CAS) testi	16
3.4.2. Sideroforların Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} metallerini bağlama kabiliyetinin belirlenmesi.....	18
3.4.3. Ağır Metal İçeren CAS Besi Ortamlarında Siderofor Tespiti	19
3.4.4 İzolatların Siderofor Üretim İndekslerinin Belirlenmesi	19
3.5. Bakterilerin Kısmi 16S rRNA Dizi Analizi ile Moleküler Tanımlanmasının Yapılması.....	20
3.5.1. DNA izolasyonu	20
3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	21
3.5.3. PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi.....	21
3.5.4. PZR ürünlerinin sekans analizi	22
3.6. Verilerin Analizi	22
3.7. İstatistiksel Analiz.....	22
4. BULGULAR	23
4.1. İzolatların Kobalt (Co), Nikel (Ni) ve Demir (Fe) Elementleri için	
Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Değerlerinin Belirlenmesi	23
4.2. Sideroforların Fe^{+3} Dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} Metallerini Bağlama Kabiliyetinin Belirlenmesi	31
4.3. Ağır Metal İçeren CAS Besi Ortamlarında Siderofor Tespiti	32
4.4. Moleküler Tanımlama İçin İzolat Seçimi	38
4.5. Seçilen İzolatların Moleküler Tanımlanması	38
4.6. Dizi Analizi Sonuçları	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	49
ÖZ GEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar	13
Çizelge 3.2. İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi	14
Çizelge 3.3. Metal stok solüsyonları	15
Çizelge 3.4. Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu hazırlanışı	17
Çizelge 3.5. Luria Broth (LB) agar bileşimi.....	17
Çizelge 3.6. 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması PZR koşulları.....	21
Çizelge 4.1. Kobalt (Co) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri.....	25
Çizelge 4.2. Nikel (Ni) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri.....	27
Çizelge 4.3. Demir (Fe) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerler	29
Çizelge 4.4. Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2} ile hazırlanan Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu (boyası) içeren LB besi ortamlarında izolatların verdiği ortalama siderofor üretim indeks (SI) değerleri	33
Çizelge 4.5. Farklı metal stresi altında, LB besi ortamlarında izolatların verdiği ortalama siderofor üretim indeks (SI) değerleri.....	34
Çizelge 4.6. Dizi analiz sonuçlarının EzBioCloud very tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analiz sonuçları ve GenBank erişim numaraları	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Siderofor tipleri	7
Şekil 3.1. Soldan sağa doğru sırasıyla Nikel (0,05 M), Demir (0,1M) ve Kobalt (0,1 M) stok Solüsyonları	15
Şekil 3.2. CAS agar petrileri.....	17
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan izolatların siderofor üretim indekslerinin (SI) hesaplanması (Doğan ve Taşkın., 2021).....	19
Şekil 4.1. İzolatların Kobalt (A), Nikel (B) ve Demir (C) elementleri için minimum inhibisyon konsantrasyon değerlerinin belirlenmesinde kullanılan örnek petri fotoğrafları	25
Şekil 4.2. Aynı kod numaralı izolatlar ile soldan sağa sırasıyla NiSO ₄ , CoCl ₂ ve FeCl ₃ ile hazırlanmış CAS reaktif boyası içeren katı LB besi ortamlarında yapılmış siderofor CAS testi örnek petri fotoğrafı.....	33
Şekil 4.3. 6(G25K3), 7(G30S1), 8(G47K1), 9(G56Y1) ve 10(G33Y3) kod numaralı izolatların A) CAS-LB+Fe, B) CAS-LB+Co+Fe, C) CAS-LB+Ni+Fe, D) CAS-LB, E) CAS-LB+Co, F) CAS-LB+Ni besi ortamlarında gösterdikleri siderofor üretme profilleri.....	38
Şekil 4.4. 6(G25K3), 7(G30S1), 8(G47K1), 9(G56Y1) ve 10(G33Y3) kod numaralı izolatların A) CAS-LB+Fe, B) CAS-LB+Co+Fe, C) CAS-LB+Ni+Fe, D) CAS-LB, E) CAS-LB+Co, F) CAS-LB+Ni besi ortamlarında gösterdikleri siderofor üretme profilleri.....	38
Şekil 4.5. Seçilen 9 adet izolata ait PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri.....	39



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigrat
µl.	Mikrolitre
bp.	Baz çifti
cfu	Colony forming unit
dk.	Dakika
g.	Gram
L.	Litre
ml.	Mililitre
Ph	Asit-baz ölçü birimi
α	Alfa

Kısaltmalar

Açıklama

CAS	Chrome Azurol S
Co	Kobalt
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleozit Trifosfat
Fe	Demir
HCl	Hidroklorik Asit
HDTMA	Hexadecyltrimethylammonium Bromide
LB	Luria Broth
NaOH	Sodium Hydroxide
Ni	Nikel
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kısaltmalar

Açıklama

RNA

Ribo Nükleik Asit

rRNA

Ribozomal Ribo Nükleik Asit

SI

Siderofor İndeksi

Std.

Standart

UV

Ultraviole



1. GİRİŞ

Endofit bakteriler, sağlıklı bitkilerin dokularında veya bitkilerin iç kısımlarından izole edilebilen, konukçusunda hastalık belirtisi yaratmadan, yaşamlarının bir kısmını veya tamamını konukçusunda tamamlayan mikroorganizmalardır (Hallman ve ark., 1997). Endofit bakteri kavramı ilk kez 1992 yılında Kloepper ve ark., tarafından tanımlanmıştır. Endofit bakteriler konukçusu oldukları bitkiler tarafından çevresel stres koşullarından ve diğer mikroorganizmalara karşı besin rekabetinden korunurlar. Endofitler bitkinin yaşam koşullarına adapte olmuşlardır ve patojenlere karşı bitki immün sistemini ve gelişimini destekleyerek konukçusuna yararlı olabilmektedirler (Sülü ve ark., 2016). Endofitler bitkinin kök, gövde, yaprak ve tohum gibi hemen hemen tüm dokularında bulunabilirler. Araştırmacılar, endofitik bakterilerin bitki kök, gövde ve yapraklarda kolonize olmalarının yanı sıra bitki içerisinde sistematik olarak yayılabildiklerini ortaya koymuşlardır (Hardoim ve ark., 2008).

Çeşitli endofit bakterilerin fosfat, demir gibi mineral ve diğer besin döngülerine katkı yaparak bitki büyümesini teşvik edici özellikleri ile ilgili pek çok araştırma mevcuttur (Verma ve ark., 2001; Wakelin ve ark., 2004, Lee ve ark., 2004, Costa ve Loper, 1994). Ancak, endofitik bakterilerin, endüstriyel öneme sahip ikincil metabolitler açısından araştırılması ile ilgili çalışmalar göreceli olarak daha yeni ve daha sınırlıdır (Carrim ve ark., 2006). Bu nedenle bu mikroorganizmalar, farklı potansiyellere sahip metabolitler ya da bileşikler keşfedebilmek için yeni bir kaynağın üyeleri olabilirler. Bakteriler çok önemli birincil ve ikincil metabolit kaynaklarıdır. Ayrıca kısa sürede büyük miktarlarda çoğaltılabilmeleri ve metabolit sentezini arttırmak için bakteriler üzerinde genetik değişiklikler yapılabilmesi göreceli olarak daha kolaydır.

Sideroforlar, mikroorganizmalar, mantarlar ve bitkilerde bulunan ve genellikle demir bağlama özellikleri ile bilinen çok farklı kimyasal yapı ihtiva edebilen hücre dışı ikincil metabolitlerdir. Bakteri hücreleri düşük miktarlarda demir barındıran habitatlardan hücre içine demir iyonu alımı için özel sistemler geliştirmiştir. Ayrıca, aerobik koşullar altında, demirin biyo-yararlanımı demir minerallerinin düşük çözünürlüğü nedeniyle son derece kısıtlıdır. Dolayısıyla bazı bakteriler siderofor sentezler ve hücre dışına salgılarlar. Sideroforlar genel olarak yüksek afiniteli demir

şelatlama ajanı olarak bilinirler (Matzanke, 1991). Diğer bir anlatımla, sideroforlar demir açlığı koşullarınca çevrelenmiş ortamlardan demir alabilmek için canlılar tarafından sentezlenen demir bağlayıcı sekonder metabolitlerdir (Hussein ve Joo, 2014). Canlılar yapısal olarak birbirinden farklı kimyasal yapı ihtiva eden çok çeşitli sideroforlar sentezleyebilir. Ayrıca sideroforların, demir yanında başka metalleri de bağlayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Hofmann ve ark., 2020). Endüstriyel tesislerden çevreye salınan metal yüklü atık sular süreçler uygun şekilde idare edilmezse çevresel bir tehdit oluşturur (Verma ve ark., 2017). Sideroforlar ve diğer doğal şelatlayıcılar, metal yüklü suların arıtılmasında kullanım potansiyeli olan ve yüksek performans sağlayan umut verici metal bağlama özelliklerine sahiptir. Dolayısıyla ağır metallerin çevresel arıtımında bakterilerin kullanımı da son yıllarda oldukça fazlaca önem kazanan bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında daha önce bazı kültür ve yabanıl tahıl bitkilerinden (Poaceae familyası) izolasyonu gerçekleştirilen 30 adet endofit bakteri izolatının demir (Fe^{+3}) dışında iki ağır metal iyonu olan kobalt (Co^{+2}) ve nikel (Ni^{+2}) stresi altında siderofor üretim kapasitelerinin araştırılması amaçlanmış ve izolatlar bu özellikleri açısından ilk defa incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında; siderofor aktivitesi yönünden yüksek olan izolatların 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tanısı yapılmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Endofit Bakteriler

Bitkiler sürekli olarak bakterilerle etkileşim halindedirler. Bitkilerle ilişkili bu bakteriler toprak ve toprakaltı organlarda, bitki dokusu yüzeyinde epifit olarak ve bitkilerin iç dokularında endofit olarak kolonize olurlar. Endofit bakteriler, bitkilerin iç doku/ doku aralarında yaşayan, konukçusunda hastalık belirtilerine neden olmayan, bitkilerin kök, yaprak ve meyve gibi dokularında kolonize olan bakterileridir (Petrini ve ark., 1989; Hallmann ve ark., 1997; Ryan ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014). Endofitler, yüzey sterilizasyonu yapılmış bitki dokularından veya bitkinin iç kısımlarından izole edilen, yaşamlarının bir kısmını veya tamamını bitki içerisinde geçiren bakteriyel ve fungal mikroorganizmalardır (Petrini ve ark., 1989; Hallmann ve ark., 1997; Ryan ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014).

Endofit bakteri kavramı Kloepper ve arkadaşları tarafından ilk kez 1992 yılında tanımlanmıştır. Endofit bakteriler konukçusu oldukları bitkiler tarafından çevresel etkenlerden, diğer mikroorganizmalar ile besin rekabetinden korunurlar. Bu mikroorganizmalar bitkinin seçici ortamına adapte olmuşlardır ve patojenlere karşı bitki metabolizmasını etkileyerek bitkiye yararlı olabilmektedirler (Sülü ve ark., 2016). Bu bakteriler aynı zamanda faydalı bakteriler olarak adlandırılır ve patojenik bakterilerin tersine bitkilerinin üzerinde gözle görülen bir etki oluşturmazlar (Sülü ve ark., 2016). Endofitler bitkinin kök, gövde, meyve ve ksilem gibi hemen hemen tüm dokularında bulunabilirler. Endofit bakterilerinin konukçuları ile ilişkileri çeşitli ve karmaşıktır (Sülü ve ark., 2016). Endofit bakteriler birçok bitki ile simbiyotik ilişkiler oluşturan bakterilerdir ve hemen hemen tüm içsel dokularda bulunabilirler. Rhizobium bakteriler ise kökün yüzeyini kolonize ederler ve bitkinin yüzeysel hücreleri arası boşluklarda koloni oluştururlar ve genellikle kök nodülleri oluştururlar. (Schultze ve Kondorosi, 2002).

2.2. Endofit Bakterilerin Çeşitliliği

Endofitik bakteriler, diğer bitki ilişkili bakterilere göre düşük popülasyon değerlerinde bulunur (Hallmann ve ark., 1997; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2004). Endofitik yoğunluğu, bakterinin türüne, bitki genotipine, konakçının hangi metabolik aşamada olduğuna ve çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir (Pillay ve Nowak, 1997).

Acidobacteria, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* ve *Verrucomicrobiae* gibi çok farklı şubelere ait kültür edilebilen veya edilemeyen iki yüz den fazla endofit bakteri cinsi rapor edilmiştir (Hallmann ve ark., 1997; Sessitsch ve ark., 2012; Sun ve Guo, 2012; Malfonova ve ark., 2013). Genel olarak endofit bakteriler üç ana şube olarak sınıflandırılmışlardır. Bunlar *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* şubeleridir. Bu şubelerin içerisinde *Azoarcus*, *Acetobacter* (*Gluconobacter* olarak yeniden adlandırılmış), *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* ve *Streptomyces* türleri vardır (Malfonova ve ark., 2013). Bununla birlikte tanımlanan endofitlerin sayısı çok daha azdır.

Endofitik bakteri türleri çok çeşitli bitki türünden elde edilmiş olsalar da çoğunlukta, , kanola (*Brassica napus*), domates (*Lycopersicum esculentum*), mısır (*Zea mays*), yulaf (*Avena sativa*), arpa (*Hordeum vulgare*), turp (*Raphanus sativus*) soya fasulyesi (*Glycine max*), bezelye (*P. sativum*), patates (*Solanum tuberosum*), buğday (*Triticum aestivum*), marul (*Lactuca serriola*) ve salatalık (*Cucumis sativa*) gibi çeşitli kültürlenebilir bitkilerden izole edilerek tanımlanmıştır. Bununla birlikte, ekonomik ve medikal öneme sahip bazı bitkilerden de pek çok bakteri suşu izole edilmiştir. *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Actinobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, ve *Serratia* türleri bunlara örnek olarak gösterilebilir (Gray ve Smith, 2005).

2.3. Endofit Bakterilerin Bitkilerde Kolonizasyonu

Endofitik bakteriler; stoma, lentisel, yaralar, lateral köklerin çıkma alanlardan ve kökçükler yoluyla bitkiye girmektedir (Huang, 1986). Birçok tohum, çeşitli endofit bakterileri taşımaktadır (Coombs ve Franco, 2003b; Hallmann et al., 1997). Endofit bakterilerin tohumla taşınması, onların yeni bitkilerde varlığını temin etmektedir. Methyloleophilus'lar soyafasulyesinde tohumla taşınmaktadır (Holland ve Polaco, 1994). Vejetatif yolla çoğalanlar (örneğin, patates yada şeker kamışı) kendi endofit bakterilerini yeni nesile aktarabilen ve enfeksiyon işlemini gerektirmeyen bitkilerdir.

2.4. Endofit Bakterilerin Tarımsal ve Biyoteknolojik Önemi

Bitkiler optimal metabolizmaları için çok farklı bitki besin maddesine ve elemente ihtiyaç duyarlar. Bu elementlerin en yaşamsal öneme sahip üç tanesi hidrojen, karbon ve oksijendir (White, 2006; Gardiner ve Miller, 2008; Fageria, 2009). Bitkiler bu elementleri topraktan, atmosferden, su ve organik maddelerden kimyasal formda elde edip kullanırlar. Endofit bakterilerin bitkilere bu besinlerin temininde katkısı yadsınamaz derecede büyüktür (Arachevaleta ve ark., 1989).

Endofit bakterilerin zararlı mikroorganizmaların bitkilerde gösterdikleri etkileri önlediği veya azalttığı gözlemlenmiştir. Bu bakterilerin konakçısına getirdiği faydalar rizofirik bakterilerdeki sistemler ile oldukça benzerlik göstermektedir (Kloepper ve ark., 1999; Gray ve Smith, 2005). Bitkilerin endofitik bakteriler ile aşılınmasıyla fungal, bakteriyel, viral, böcek ve nematodlardan kaynaklı zararlar azaltılabilmektedir (Kerry, 2000; Sturz ve ark, 2000; Ping ve Boland, 2004; Berg ve Hallmann, 2006).

Birçok endofit bakteri rizofirik bakteriler ile ortak cinslere sahiptir (Lodewyckx ve ark., 2002). Örneğin; *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* ve *Bacillus sp.* Bu cinsler çeşitli sekonder metabolitlerin üreticisidir. Sekonder metabolitler organizmaların büyümesi, gelişimi ve üremesiyle direkt ilişkili olmayan organik bileşiklerdir (Fraenkel ve Gottfried, 1959). Genel olarak sekonder metabolitler uygun olmayan koşullarda canlılar açısından bir savunma yanıtı olarak ortaya çıkmaktadır. Sekonder metabolitler, yıllardır tıp ve endüstride kullanılmaktadırlar. Sekonder metabolit olan sideroforlar bu anlamda önemli bir yere sahiptir.

Endofitik bakteriler fitoremediasyonda da kullanılabilirler. Ksenobiyotikler ile kontamine olmuş çevrede yetişen bitkilerin, bu bileşiklerin parçalanmasını sağlayan genlere sahip olan endofit bakterileri bünyesinde bulundurduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, nitro-aromatikler ile kontamine olmuş tarımsal alanlarda, bu bileşiklerin metabolize edilmesini sağlayan enzimleri kodlayan genlerin endofitik suşlardaki varlığı yaygın olarak bildirilmiştir (Siciliano ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada melez kavak ağaçlarından (*Populus deltoids x nigra*) izole edilmiş bir endofit bakteri türünün, 2,4,6-trinitrotoluen gibi sayısız nitro-aromatik bileşiği parçalayabildiği gösterilmiştir (Van Aken ve ark., 2004). Yapılan diğer bir çalışmada ise, genetik mühendisliği yolu ile değiştirilmiş endofit mikroorganizmalar ile desteklenen bitkilerde nikel ağır metale karşı toleransın arttığı gözlemlenmiştir (Lodewyckx ve ark., 2001).

2.5. Sideroforların Genel Özellikleri

2.5.1. Siderofor nedir?

Siderofor, kimyasal anlamda, demir elementinin yetersiz olduğu ortamlarda prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından sentezlenerek salgılanan düşük molekül ağırlığa sahip, metal şelatlayıcı bileşiklerdir (Miethke ve Marahiel 2007). Bakteri yaşamında birçok metal çeşitli enzimlerin kofaktörü olarak metabolizmaya katılmakta ve organizma yaşamına katkı sağlamaktadır. Bakterilerin, metalleri hücre içine alabilmeleri yaşamlarının devamlılığı için oldukça önemlidir. Bu nedenle düşük miktarda metal olan ortamlarda metal temin edilmesi önemlidir. Bu amaçla bu ortamlardan metal temini yapılabilmesi için bakteriler özel mekanizmalar geliştirmiştir. Bu sistemlerden biride siderofor üretim mekanizmasıdır. Sideroforlar, yüksek afiniteli ferrik demir şelatörü olarak bilinirler ve dolayısıyla organizmaları bu metalle besleyebilme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca sideroforların, demirin yanında başka metalleri de bağlayabilme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir.

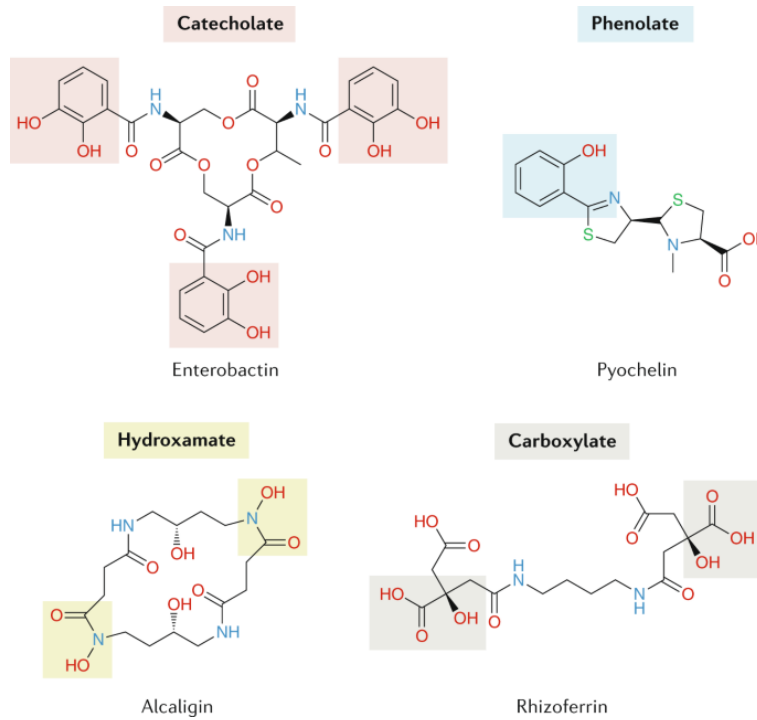
Sideroforların yapısı türler arasında büyük değişiklikler göstermektedir. Bakteriler ve konakçıları demiri bağlayabilmek için kimyasal yapıları birbirinden farklı sideroforlar sentezleyerek birbirleriyle yarışır (Miller ve ark., 2008). Bugüne kadar yaklaşık 500'den fazla siderofor çeşidi farklı mikroorganizmalardan izole edilmiştir

(Boukhalfa ve Crumbliss, 2002). Ayrıca sideroforlar çok zengin kimyasal çeşitlenişe sahiptirler (Chu ve ark., 2010; Hider ve Kong, 2010).

2.5.2. Kimyasal yapılarına göre sideroforlar

Bir sekonder metabolit olan sideroforlar, çok çeşitli kimyasal yapılara sahiptirler. Bu yüzden evrensel ve açık sınıflandırılmaları zordur. Sınıflandırma türe özgü ya da kimyasal iskeletlerine göre yapılmaktadır. Yapısal farklılıklara rağmen sideroforlar demir (III) ile yaptıkları 6-koordineli kompleks oluşturmaları ve büyük termodinamik stabiliteleri ile birbirlerine benzemektedirler. Sideroforların kimyasal bağlama grupları hidroksamatların oksijen atomlarını, katekolatları, α -hidroksi-karboksilik asitleri ve α -keto-karboksilik asitleri içerir.

Sideroforlar genel kimyasal yapılarına göre 4 sınıfta incelenmektedirler. Sideroforlar, hidroksamatlar, katekolatlar, karboksilatlar ve karma yapılı olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1). Şekil 2.1’de üst kısımda 3 siderofor çeşidi karboksilik asit, katekollar ve hidroksamatlar gösterilmiştir. Şeklin alt kısmında ise metal merkezleri üzerinden geometrik iki ana konfigürasyon gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Siderofor tipleri (Kramer ve ark. 2020).

2.5.3. Hidroksamat siderofor

Hidroksamat sideroforlar fungus ve bakteriler tarafından üretilirler. Ferrikrom *Ustilago sphaerogena* tarafından üretilen ilk siderofordur. Bu tip sideroforlar üç sekonder hidroksamat grup içerir ve her bir grup iki oksijen molekülüne ev sahipliği yapar. Bu sideroforlara, desferrioksamin E, desferrioksamin B (deferoksamin), enterobaktin, fusarinin C, ornibaktin, ferrioksamin ve ferrikrom örnek verilebilir (Crosa ve Walsh, 2002).

2.5.4. Katekolat (Fenolat) siderofor

Sadece bakteriler tarafından üretilen Sideroforların en yaygın ikinci grubu katekolat sideroforlardır. Katekolat sideroforlarda hidroksamat sideroforlar gibi yapılarında iki oksijen atomu içerirler. Hidroksamat ve katekolatlar, hekzadentat oktahedral kimyasal yapısını oluşturmak için bünyelerinde oksijen bulundururlar. Katekolat sideroforlara enterobaktin, vibriobaktin, agrobaktin, pyochelin ve yersiniabaktin örnek verilebilir (Neilands, 1981).

2.5.5. Karboksilat sideroforlar

Karboksilat sideroforlar hidroksamat ve fenolat yapılarını bulundurmazlar. Fe^{+3} bağlayabilmek için α -hidroksikarboksilat ve karboksilat bileşiklerini kullanarak elde edilirler. Karboksilat sideroforlara staphyloferrin A, mikobaktin, rhizoferrin, petrobaktin, piyoverdin, azotobaktin ve ferribaktin örnek verilebilir (Dave ve Dube, 2000; Jimenez ve ark., 2010).

2.5.6. Karışık ligant

Bu yapıdaki sideroforlar karboksilat ve hidroksil gruplarını birlikte barındırırlar. Karışık siderofarlara örnek olarak, mikobaktin, petrobaktin, azotobaktin, pyoverdin, yersiniabaktin ve maduraferin verilebilir (Modi ve ark., 2012; Ratul ve ark., 2012).

2.5.7. Siderofor üretimi

Demir, canlılığın başlangıcından itibaren yeryüzünde bulunan canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli temel elementlerden biridir. Doğal ortamlarda bol miktarda bulunmasına rağmen, serbest halde bulunan Fe^{+3} iyonunun mikroorganizmalar tarafından doğrudan hücre içine alımı son derece zordur (Varma ve Chincholkar, 2007). Sideroforlar; alınabilir demirin sınırlı olduğu ortamlarda prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından sentezlenen düşük molekül kütleye (200-2000 Da) sahip metal şelatlayıcı moleküllerdir (Schwyn ve Neilands, 1987).

Demirin siderofor aracılığıyla hücre içine alınabilir hale getirilmesi konusunda farklı mekanizmalar ortaya konmuştur. En kabul gören mekanizma; siderofor- Fe^{+3} kompleksinin mineral yüzeylerinde oluşması ve sonrasında çevresindeki toprak çözeltisine aktarılarak mikroorganizmalar veya bitkiler tarafından kullanılabilmesi için uygun hale gelmesidir (Kalinowski ve ark., 2000; Kraemer, 2004).

Mikroorganizmalarda sideroforlar aracılığı ile demir alınımı reseptör moleküllerinin kullanıldığı, enerji güdümlü bir süreçtir (Sigel ve Sigel 1998). Mikroorganizmalar farklı siderofor- Fe^{+3} transfer mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasındaki farklılıkları gösterebilir. Gram-negatif bakteriler, hücre yüzeyinde, siderofor- Fe^{+3} kompleksini tanıyan TonB dış hücre zarı reseptörlerine sahiptir (Krewulak ve Vogel 2008). Demir siderofor kompleksi, hücre dış zarı reseptör proteinleri FecA ve FepA aracılığı ile hücre içine taşınır. Bir sonraki aşamada, ATP bağlama kaseti (ABC) taşıma sistemi olarak sınıflandırılan FecC,D,E ve FepC,D,E proteinlerine aktarılır ve Ton B hücre zarı proteininin yardımıyla kompleks sitoplazmaya taşınır (Davidson ve Nikaido 1991; Boos ve Eppler 2001). Gram-pozitif bakterilerde, ikincil bir dış zar yapısı olmadığından, hücre zarına tutunmuş kompleks, periplazmik bağlayıcı proteinler tarafından yakalınır ve daha sonra sitoplazmaya taşınır (Fukushima ve ark., 2013; Braun ve Hantke, 2011).

Sideroforların, Fe alınımının düşük olduğu durumlarda bitkilere Fe sağladığı bilinmesine rağmen bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır (Crowley 2006). Bitkilerin, Fe alımında sideroforları kullandığına yönelik iki muhtemel mekanizma öne sürülmektedir. Birincisi, yüksek redoks potansiyeline sahip sideroforların kullanımıdır. Ancak bunlar $Fe(II)$ 'nin bitkinin taşıma sistemine geçişini azaltabilir. İkinci

mekanizmada ise; sideroforlar toprakraki demiri şelatlar ve sonra fitosideroforlarla ligand değişimi yapar (Masalha ve ark., 2000). Bu mekanizma, sideroforlar konsantrasyonu, kök dokusu etrafındaki redoks potansiyeli ve pH gibi bir çok değişkene bağlıdır (Crowley, 2006).

2.6. Ağır Metaller ve Siderofor İlişkisi

2.6.1. Ağır metaller

Ağır metal olarak adlandırılabilen elementlerin sınıflandırılması çok çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır. Ağır metal tanımının eksik ve karmaşık olmasından kaynaklı hangi elementleri kapsayıp kapsamadıkları konusu karışıktır. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ağır metal tanımını yanlış yönlendirici ve anlamsız olarak yapmıştır (Duffus, 2002). Bu isim sıklıkla kullanılmakla beraber metaller bu grup içerisine kimyasal özellikleri üzerinden yada fiziksel özellikleri üzerinden dahil edilmektedirler. Bazı gruplarda, ayırt edici özellik olarak ağır metallerin düşük konsantrasyonlarda ki toksik etkileri dikkate alınmaktadır. Bu tanımlama da ağır metallerin canlılık üzerindeki etkileri dikkate alındığından isimlendirmenin daha çok biyolojik etki üzerinden, biyoloji biliminin bakışına uygun bir tanım olarak kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. Ağır metaller, canlı çevre üzerinde çok büyük zararlara yol açarlar. Bunun yanı sıra ağır metal grupları içerisinde canlı yaşamına katkı sağlayan elementlerin de olduğu gözlenmiştir.

Canlılar yaşam döngüleri sırasında hücresel metabolik süreçlerde kullanmak için metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde temel metabolizma iyonlarının yanı sıra hücresel süreçlerde yapıya katılan metallerde bulunmaktadır. Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo gibi elementler örnek verilebilir. Bu metallerin bakteriyel hücrelerde μM seviyelerden mM seviyelere kadar varolabildiği gösterilmiştir (Heldal ve ark., 1985). Periyodik cetvelde geçiş elementleri, yarı metaller, lantanitler ve aktinitleri içeren ağır metal grupları ise genel olarak canlı yaşamına toksik etkiye yol açan metaller olarak bilinmektedirler. Bazı metaller ise biyolojik fonksiyon göstermezler, örnek olarak Hg, Pb, Ag ve Al metalleri verilebilir. Canlı yaşamına yararlı olan Vanadyum, Tungsten ve Kadmiyum gibi bazı istisna ağır metaller de tespit edilmiştir (Lane ve ark., 2000; Lane

ve ark., 2005). İstisnalar dışında olan toksik metallere karşı organizmalar kendilerini korumak için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir (Nies 1999; Nies 2003). Sideroforlar bu mekanizmalara örnek olarak gösterilebilir. Metal kıtlığı koşullarında bakteri besleme gibi bir işlev görürken ağır metal toksisitesine karşı bakterileri korumaktadırlar.

2.6.2. Sideroforlar ve demir

Daha önceki çalışmalarda demirin organizma yaşamında ne kadar önemli bir element olduğu belirtilmiştir. Sideroforlar organizmayı demirle beslerler. Sideroforlar, organizmayı demirle besleyebilmek için aerobik ortamlarda çoğunlukla çözünmemiş oksit anhidrat kompleksi halinde bulunan demiri şelatlama görevi yapmaktadır. Yani organizmanın, aerobik ortamlarda demiri saf mineral halinde temin etmesinin zor olduğu anlamına gelmektedir. Yapılan bir çalışmada, demirin (10^{-7} ile 10^{-24} M) mikroorganizma çevresinde her zaman düşük seviyede olduğu saptanmıştır (Raymond ve ark., 2003). Toprak açısından değerlendirildiğinde, siderofor konsantrasyonlarının, litre başına 10 μ M'den birkaç μ M'e kadar bulunabileceği varsayılmaktadır (Hersman, 1995). Daha önce yapılan bir çalışmada 1 μ M seviyesinde ki demirin siderofor üretimini maksimuma çıkardığı gözlenmiştir (Dave ve Dube, 2000). Demirin ortam koşullarında bu kadar az bulunmasıyla sideroforlar, demiri mikroorganizma için temin edebilir forma getirerek ortamı zenginleştirmiş olmaktadır. Bunu yanı sıra çevre koşullarına göre siderofor patojenik bir organizmaya aitse bazen virülans faktörü olarak da değerlendirilebilecek bileşenler olarak ortaya çıkmaktadırlar.

2.6.3. Sideroforlar ve diğer metaller

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ağır metallerin de siderofor mekanizmasını etkilediği ortaya konmuştur (Herlem ve ark., 1996, Neubauer ve ark., 2000). Sideroforlar, canlı organizmalara ait metal şelatlama kompleksleri birçok metal grubu ile etkileşime girerek düşük miktarlarda metalleri canlı yapısına kazandırmaktadırlar.

Bazı sideroforlar demir metaline daha fazla aktiflik ile bağlarken diğer metallere daha düşük bir aktiflik ile bağlanmaktadır. Daha önce sideroforlarla Ag, Al, Cd, Cr, Co, Eu, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl, Zn gibi metallerin bağlanmasına ilişkin

alışmalar yapılmıştır. Metallerin az olduğu koşullarda siderofor mekanizması organizmaya katkı sunarken, fazlalığı koşullarında metallerin canlı hücreye toksik etki yaptığı bilinmektedir. Bu koşullarda siderofor mekanizması fazla metallerden korunmak için denge ayarlayıcı rol üstlenmektedir (Schalk ve ark., 2011).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Bu çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bakterioloji laboratuvarında stoklarında bulunan, Van ili ve civarında, bazı kültür ve yabancı tahıl bitkilerinden (Poaceae familyası) izole edilmiş endofit bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Bu tez çalışmasında kullanılan 30 adet izolat, devam etmekte olan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FYL-2020-8551 kod numaralı “Van Gölü havzasındaki kültür ve yabancı buğdaygil türlerinden Endofit Bakteri izolasyonu karakterizasyonu ve bu bakterilerin kuraklık stresi ve bitki gelişimine olan etkinliklerinin belirlenmesi” başlıklı proje kapsamında toplanan izolatlardan seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar

İzolat No	İzolat Kodu	Konukçu	İzolasyon Yapılan Organ
1	G119Y2T	Çipil	Yaprak
2	G88K1	Tir Buğday	Kök
3	G119S1	Çipil	Sürgün
4	G120S3	Hanım Tarağı	Sürgün
5	G32S2	Püsküllü Çayır Otu	Sürgün
6	G25K3	Kamış	Kök
7	G30S1	Yabani Arpa	Sürgün
8	G47K1	Teşhis edilemedi	Kök
9	G56Y1	İki Sıralı Arpa	Yaprak
10	G33Y3	Yabani Buğday	Yaprak
11	G88S1	Tir Buğday	Sürgün
12	G20Y3	Yabani Buğday	Yaprak
13	G115S1	Eromopyrum	Sürgün
14	G24Y1	Yabani Arpa	Yaprak

Çizelge 3.1. Kullanılan izolatlar, konukçuları ve izole edilen organlar (devam)

İzolat No	İzolat Kodu	Konukçu	İzolasyon Yapılan Organ
15	G79Y2	İki Sıralı Arpa	Yaprak
16	G35S1	Yabani Buğday	Sürgün
17	G111K3	Kelt Kuyruğu	Kök
18	G37K1	Tir Buğday	Kök
19	G6Y2	Buğday	Yaprak
20	G45K1	Eromopyrum	Kök
21	G9Y2	Yabani arpa	Yaprak
22	G15S1	Yulaf/Albatros	Sürgün
23	G12S1	Arpa/Özdemir	Sürgün
24	G101K4	Kelt Kuyruğu	Kök
25	G99K3	Yabani Arpa	Kök
26	G53Y2	Domuz Ayrığı	Yaprak
27	G111K1	Kelt Kuyruğu	Kök
28	G105Y1B	Domuz Ayrığı	Yaprak
29	G45Y1	Kılçıksız Brom	Yaprak
30	G135Y4	Buğday	Yaprak

3.2. İzolatların Geliştirilmesi

%20 gliserol içeren nutrient sıvı besiyerinde -80°C’de saklanan saf kültürlerin geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar (NA) besiyerinin Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Nutrient Agar	Et Özütü	1 g
	Maya Özütü	2 g
	NaCl	5 g
	Pepton	5 g
	Agar	15 g

3.3. İzolatların Kobalt (Co), Nikel (Ni) ve Demir (Fe) Elementleri için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerlerinin (MIC) Belirlenmesi

İzolatların her bir metal iyonu için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değerleri, katı besiyeri ortamındaki ağır metal konsantrasyonları izolatlar büyüymeyene kadar kademeli olarak artırılarak belirlenmiştir. Bunun için CoCl_2 , NiSO_4 ve FeCl_3 stok solüsyonları hazırlanarak, filtrasyon yöntemi ile sterilizasyonları sağlanmıştır (Çizelge 3.3, Şekil 3.1). Kobalt için, 0,1 mM aralıklarla 0 mM-1 mM arasında CoCl_2 içeren, nikel için 0,1 mM aralıklarla 0 mM-3 mM arasında NiSO_4 içeren ve demir için, yine 0,1 mM aralıklarla 0 mM-3 mM arasında FeCl_3 içeren besi ortamları kullanılmıştır. Metallerin ilgili konsantrasyonlarını içeren NA besi ortamlarını hazırlamak için, otoklav yolu ile sterilize edilmiş ve 60-70 °C ye kadar soğutulmuş besi ortamlarına gerekli hacimde alınan ilgili metal stoğu eklenmiş ve karıştırılarak aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür. EB izolatların 10^6 cfu/ml yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 20 μl alınarak hazırlanan NA besi ortamına birbirinden eşit uzaklıktaki noktalara damlatma yolu ile ekimler yapılmıştır. 10 günlük inkübasyondan sonra bile izolatlar petrilere büyümediğinde MIC değerleri not edilmiştir.

Çizelge 3.3. Metal stok solüsyonları

Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 0,1 M)
CoCl_2 (MW=129,84 g/mol)	CoCl_2	0.260 g
	dH_2O	20 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (50 mL, 0,05 M)
NiSO_4 (MW=154,76 g/mol)	NiSO_4	0.380 g
	dH_2O	50 mL
Solüsyon	Bileşen	Miktar (20 mL, 1 M)
FeCl_3 (MW=162,20 g/mol)	FeCl_3	3.24 g
	dH_2O	20 mL

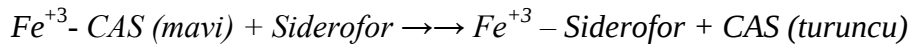


Şekil 3.1. Soldan sağa doğru sırasıyla Nikel (0.05 M), Demir (0.1 M) ve Kobalt (0.1 M) stok solüsyonları.

3.4. Siderofor Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.4.1. Chrome azurol S (CAS) testi

CAS agar deneyi, siderofor moleküllerinin Fe^{+3} için yüksek afinite göstermesini temel alan ve siderofor tespitinde kullanılan evrensel bir testtir. HDTMA içeren CAS agar petrileri, Fe^{+3} ile Chrome Azurol Sulfonate (CAS) boyasının kompleks oluşturmasından dolayı mavi renktedir. HDTMA ortamda boyanın çökmesini engellemekte ve bakteriyel büyümeyi teşvik etmektedir. Siderofor varlığında aşağıda belirtilen reaksiyon gerçekleşir, serbest boya açığa çıkar ve mavi renk turuncuya dönüşür.



Deneye başlamadan önce, cam eşyalar demiri uzaklaştırmak için 3 M hidroklorik asit (HCl) ile durulanmış ve ardından deiyonize suda yıkanmıştır (Cabaj ve Kosakowska, 2009). CAS reaktif boyası, Schwyn ve Neilands (1987) uyarınca hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Bakteriyel izolatların siderofor üretme yeteneği, Schwyn ve Neilands (1987)'in geliştirdiği orjinal evrensel CAS-siderofor testinin modifiye edilmiş versiyonu kullanılarak belirlenmiştir (Hu ve Xu, 2011; Arora ve Verma, 2017). CAS agar petrileri, 900 ml sterilize edilmiş Luria Broth (LB) agar ortamına ayrıca steril

edilmiş 100 ml CAS reaktif solüsyonu karıştırılarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.4, Şekil 3.2). CAS reaktif boyasının ve LB agar besi ortamının final pH'ı otoklav öncesi NaOH ve HCl kullanılarak yavaşça 6.8'e getirilmiş ve bu değer aşılmamıştır.

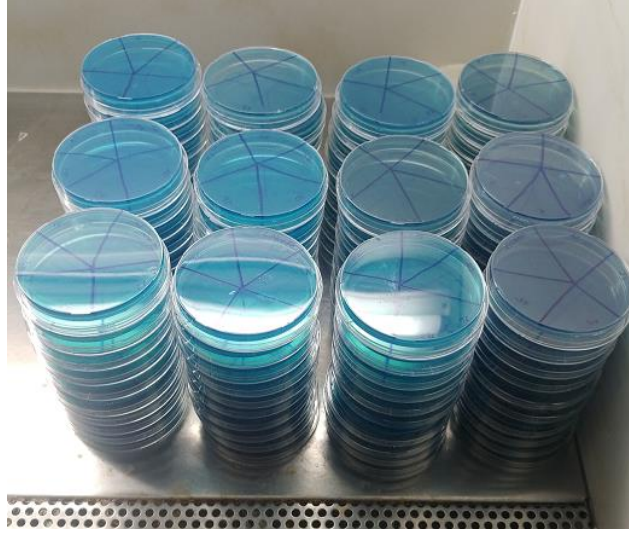
Saf kültür halinde elde edilen izolatlar CAS Agar besiyerine nokta ekim tekniği ile transfer edilerek 25°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan ve kolonileri etrafında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumu olarak ve CAS testi için pozitif izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir (Payne, 1994). Bütün analizler üçer tekrarlı olacak olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu hazırlanışı

Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu	1.	60.5 mg chrome azurol S (CAS) 50ml saf su içinde çözülür.
	2.	10 mM HCl içinde hazırlanmış 1 mM, 10 ml Fe ³⁺ solüsyonu (0.027g FeCl ₃ .6H ₂ O /100ml dH ₂ O) bir numaralı solüsyona eklenir.
	3.	72.9 mg HDTMA 40 ml saf su içinde çözülerek yukarıdaki solüsyona eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.
	Oluşan koyu mavi süspansiyon otoklavda sterilize edilir (121°C / 15 dk.)	

Çizelge 3.5. Luria Broth (LB) agar bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Luria Broth Agar	Trypton	10 g
	Maya Özü	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	15 g



Şekil 3.2. CAS agar petrileri.

3.4.2. Sideroforların Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} metallerini bağlama kabiliyetinin belirlenmesi

Sideroforların demir dışında kobalt ve nikel metallerini bağlama kabiliyetini taramak için farklı metaller (Co ve Ni) içeren Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu (boyası) hazırlanmıştır (Mehnert ve ark., 2017; Hofmann ve ark., 2021). CAS reaktif boyası, Schwyn ve Neilands (1987) uyarınca hazırlanmış ancak karışımında yer alan 1 mM Fe^{+3} yerine yine aynı derişimde (1 mM) $CoCl_2$ veya $NiSO_4$ kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Bölüm 3.4.1’de ayrıntıları ile çalışma prensibi verilen CAS agar petrilerinde, Fe^{+3} yerine Co^{+2} veya Ni^{+2} ile Chrome Azurol Sulfonate (CAS) boyası kompleks oluşturur ve metal-şelatlama ajanı (siderofor) varlığında belirtilen reaksiyon gerçekleşir, serbest boya açığa çıkar ve mavi renk turuncuya dönüşür.

Saf kültür halinde elde edilen izolatlar CAS Agar besiyerine nokta ekim tekniği ile transfer edilerek 25 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan ve kolonileri etrafında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumu olarak ve CAS testi için pozitif izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir (Payne, 1994). Bütün analizler üçer tekrarlı olacak olarak gerçekleştirilmiştir.

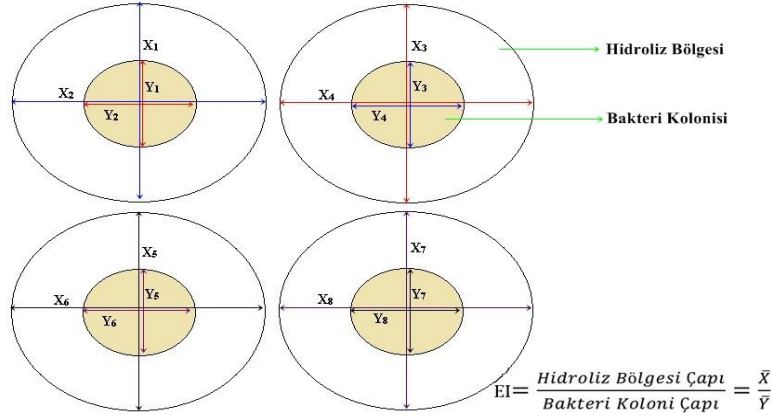
3.4.3. Ağır metal içeren CAS besi ortamlarında siderofor tespiti

İzolatların ağır metal stresi altında siderofor üretim profillerini incelemek için izolatların her bir metale karşı verdikleri MIC değerleri göz önünde bulundurularak, bu metallerin CAS besi ortamlarındaki final konsantrasyonları belirlenmiştir. Besi ortamlarındaki final konsantrasyonları CoCl_2 için 0,3 mM, NiSO_4 için 0,8 mM ve FeCl_3 için 1 mM olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda ağır metal içeren CAS-LB agar besi ortamlarını hazırlamak için ağır metaller steril solüsyon halinde, yukarıda belirtilen final konsantrasyonlar elde edilecek şekilde, metallerin daha önce hazırlanan stok solüsyonlarından CAS-LB besi ortamlarına eklenerek hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Ayrıca çalışmanın bu bölümünde hazırlanan tüm besiyerlerinde CAS- Fe^{+3} reaktif boyası kullanılmıştır.

Saf kültür halinde elde edilen izolatlar CAS Agar besiyerine nokta ekim tekniği ile transfer edilerek 25 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan ve kolonileri etrafında oluşan turuncu renkli zonlar siderofor oluşumu olarak ve CAS testi için pozitif izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir (Payne, 1994). Bütün analizler üçer tekrarlı olacak olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. İzolatların siderofor üretim indekslerinin belirlenmesi

İzolatlar için, siderofor üretim indeksi (SI) bölüm 3.2.2’ de belirtilen inkübasyon sürelerinin sonunda alınan ölçümler kullanılarak hesaplanmıştır. Siderofor üretim İndeksleri, ilk olarak ekstraselüler enzim üretim indeksi olarak kullanılan yöntem baz alınarak, ilgili testte ölçülen ortalama zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak ifade edilmiştir (Carrim ve ark., 2006; Jena ve Rath., 2013; Doğan ve Taşkın, 2021). Bu çalışmada siderofor üretim indeksi (SI) değeri 1.25 ve altı değerler değerlendirme dışı tutulmuştur.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan izolatların siderofor üretim indekslerinin (SI) hesaplanması (Doğan ve Taşkın, 2021).

3.5. Bakterilerin Kısmi 16S rRNA Dizi Analizi ile Moleküler Tanımlanmasının Yapılması

İzolatların CAS-LB besi ortamlarındaki siderofor aktivitelerinin belirlenmesinden sonra farklı zon çapları veren, 10 adet izolat tanı işlemleri için seçilmiştir. Kısmi 16S rRNA baz dizisinin belirlenmesi yöntemi ile bakterilerin tanısı; DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması, PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve bu sıranın veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmuştur.

3.5.1. DNA izolasyonu

PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak için, ilgili izolatlardan total DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bunun için yaklaşık 10^7 CFU/mL yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 2 mL alınarak 10 dk kaynatılmış ve santrifüjlenerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır (Newton, 1995). Total DNA içeren supernatant temiz bir tüpe transfer edilerek, PZR reaksiyonlarında kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonlarında 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1492r (5'- TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') evrensel primer çifti kullanılmıştır (Lane, 1991). İzole edilen DNA'daki 16S rRNA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması amacıyla, her bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki PZR karışım hazırlanmış ve reaksiyonlar çizelge 3.6'da verildiği gibi gerçekleştirilmiştir;

PZR karışımı;

- 7.5 µl kalıp DNA
- 5 µl PZR Tamponu (10X)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2.5 µl Taq DNA polimeraz
- 4 µl dNTP karışımı (0.3 mM)
- 5 µl 27f primerinden (20 pmol)
- 5 µl 1492r primerinden (20 pmol)
- 20 µl steril distile su

Çizelge 3.6. 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95°C	5 dk	1
94°C	1 dk	30
55°C	1 dk	
72°C	2 dk	
72°C	10 dk	1

3.5.3. PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

5 µL PZR ürününe 1 µL jel yükleme tamponu eklenip, 1X TAE ile hazırlanmış %1'lik agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. PZR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için agaroz jeldeki ilk kuyucuğa 100bp DNA marker yüklenmiştir. Jel 100 voltta 1 saat yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanarak UV ışığı altında

incelenmiştir.

3.5.4. PZR ürünlerinin sekans analizi

PZR ürünleri Sanger dizileme tekniği kullanılarak hizmet alımı (BM Labosis/Ankara) yolu ile yaptırılmıştır. Kısmi 16S rRNA dizilemesi 27f ileri primeri kullanılarak tek yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler “<https://www.ezbiocloud.net/>” adlı internet sayfasında yer alan veri tabanı ile karşılaştırılmış ve sonrasında diziler GenBank sitesine girişleri yapılarak “accession” erişim numaraları alınmıştır.

3.6. Verilerin Analizi

Tüm nitel enzim ölçüm deneyleri dörder tekrarlı ve her bir petri ölçümü ikişer tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen siderofor üretim (SI) indeks verilerinin istatistik analizinde, SAS 9.4 (SAS, 2014) paket programı kullanılmıştır. Gruplara ait ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde genel doğrusal model (GLM) analizi yapılarak, gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Kobalt (Co), Nikel (Ni) ve Demir (Fe) Elementleri için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Van gölü havzası içerisinde, farklı bölgelerden, çeşitli kültür ve yabancı tahıl bitkilerinin sağlıklı kök, sürgün ve yaprak bölgelerinden daha önce Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ve devam etmekte olan, FBA-2020-8551 kod numaralı “Van Gölü havzasındaki kültür ve yabancı buğdaygil türlerinden endofit bakteri izolasyonu karakterizasyonu ve bu bakterilerin kuraklık stresi ve bitki gelişimine olan etkinliklerinin belirlenmesi” başlıklı proje kapsamında izolasyonu yapılan endofit bakteri izolatları kütphanesinden temin edilen 30 adet izolat kullanılmıştır.

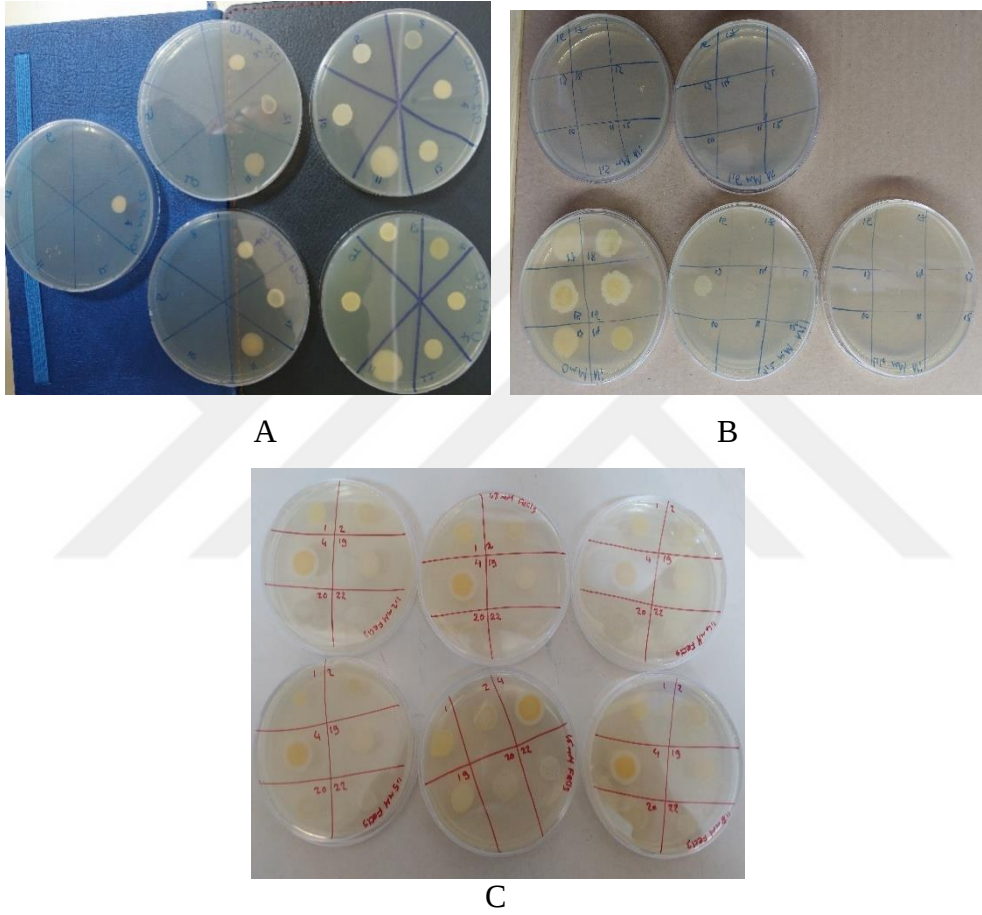
25°C’de gelişen toplam 30 adet izolat 3.3.’de belirtildiği gibi, LB katı besi ortamında her bir metal iyonu için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değerleri incelenmiştir (Şekil 4.1). Katı besi ortamındaki ağır metal konsantrasyonları izolatlar büyüemeyene kadar kademeli olarak artırılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.’de bu izolatların denenen ağır metal iyon konsantrasyonlarındaki gelişebilme profilleri yer almaktadır.

Kobalt için, 0.1 mM aralıklarla 0 - 1 mM arasında CoCl_3 içeren besi ortamlarında 30 adet izolatın koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlar 0.9 mM ve üstü CoCl_3 içeren besi ortamlarında hiçbir izolatın gelişemediğini ortaya koymuştur. İzolatlar kobalt metali için farklı MIC değerleri ortaya koymasına rağmen en yüksek değeri 0.8 mM ile 7(G30S1) izolat göstermiş, en düşük değeri 0.3 mM ile 5(G32S2), 6(G25K3), 8(G47K1), 9(G56Y1), 10(G33Y3), 15(G79Y2), 19(G6Y2), 24(G101K4), 28(G105Y1B) ve 29(G45Y1) kod numaralı izolatlar göstermiştir (Çizelge 4.1).

Nikel için, 0,1 mM aralıklarla 0 - 3 mM arasında NiSO_4 içeren besi ortamlarında 30 adet izolatın koloni gelişim profilleri ortaya konmuştur. Sonuçlara göre 20 adet izolat 1.1 mM ve üstü NiSO_4 konsantrasyonlarında gelişim gösterememiştir. 18(G37K1) ve

29(G45Y1) kod numaralı izolatlar 2.6 mM a kadar gelişim göstererek nikel karşı en dirençli izolatlar olmuşlardır (Çizelge 4.2).

Demir için, yine 0.1 mM aralıklarla 0 - 3 mM arasında FeCl_3 içeren besi ortamları kullanılmıştır. Demir için en düşük inhibisyon değerini 3(G119S1) izolat 1.1 mM ile göstermiştir. 18 adet izolat ise 2.9 mM ve üstü demir konsantrasyonlarında gelişim gösterememiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.1. İzolatların Kobalt (A), Nikel (B) ve Demir (C) elementleri için minimum inhibisyon konsantrasyon değerlerinin belirlenmesinde kullanılan örnek petri fotoğrafları.

Çizelge 4.1. Kobalt (Co) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri

Kobalt (Co) Konsantrasyonu		0 mM	0.1 mM	0.2 mM	0.3 mM	0.4 mM	0.5 mM	0.6 mM	0.7 mM	0.8 mM	0.9 mM	1 mM
İzolat No	İzolat Kodu											
1	G119Y2T	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	G88K1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	G119S1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	G120S3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	G32S2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	G25K3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	G30S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	G47K1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	G56Y1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	G33Y3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	G88S1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
12	G20Y3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	G115S1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14	G24Y1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
15	G79Y2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	G35S1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17	G111K3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
18	G37K1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
19	G6Y2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	G45K1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Çizelge 4.1. Kobalt (Co) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri (devam)

Kobalt (Co) Konsantrasyonu		0 mM	0.1 mM	0.2 mM	0.3 mM	0.4 mM	0.5 mM	0.6 mM	0.7 mM	0.8 mM	0.9 mM	1 mM
İzolat No	İzolat Kodu											
21	G9Y2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
22	G15S1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
23	G12S1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
24	G101K4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	G99K3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
26	G53Y2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
27	G111K1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
28	G105Y1B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
29	G45Y1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
30	G135Y4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Koloni oluşumu var. -: Koloni oluşumu yok.

Çizelge 4.2. Nikel (Ni) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri (devam)

Nikel (Ni) Konsantrasyonu		0 mM	1 mM	1.1 mM	1.2 mM	1.3 mM	1.4 mM	1.5 mM	1.6 mM	1.7 mM	1.8 mM	1.9 mM	2 mM	2.1 mM	2.2 mM	2.3 mM	2.4 mM	2.5 mM	2.6 mM
İzolat No	İzolat Kodu																		
12	G20Y3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	G115S1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	G24Y1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	G79Y2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	G35S1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	G111K3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	G37K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	G6Y2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	G45K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	G9Y2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	G15S1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	G12S1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	G101K4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	G99K3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	G53Y2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	G111K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	G105Y1B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	G45Y1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30	G135Y4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Koloni oluşumu var. -: Koloni oluşumu yok.

Çizelge 4.3. Demir (Fe) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerler

[illegible]

Çizelge 4.3. Demir (Fe) metalinin 30 adet izolat için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri (devamı)

Demir (Fe) Konsantrasyonu	0 mM	1 mM	1.1 mM	1.2 mM	1.3 mM	1.4 mM	1.5 mM	1.6 mM	1.7 mM	1.8 mM	1.9 mM	2 mM	2.1 mM	2.2 mM	2.3 mM	2.4 mM	2.5 mM	2.6 mM	2.7 mM	2.8 mM	2.9 mM
İzolat No	İzolat Kodu																				
21	G9Y2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
22	G15S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	G12S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
24	G101K4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	G99K3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	G53Y2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	G111K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
28	G105B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	G45Y1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30	G135Y4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Koloni oluşumu var. -: Koloni oluşumu yok.

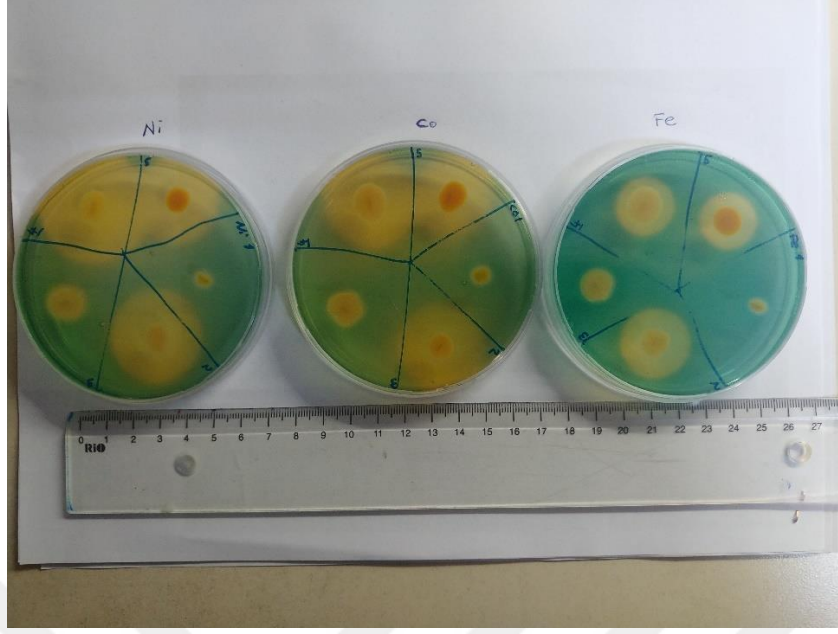
4.2. Sideroforların Fe^{+3} Dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} Metallerini Bağlama Kabiliyetinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2} metalleri ile hazırlanan CAS reaktif boyası içeren üç ayrı katı LB besi ortamı hazırlanmış ve daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi izolatlar bu besi ortamlarına inoküle edilmiştir. 25°C 'de 7 gün inkübasyona bırakılan ve kolonileri etrafında oluşan sarı-turuncu renkli zonlar siderofor oluşumu olarak ve CAS testi için pozitif izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir (Payne, 1994) (Çizelge 4.2).

Bu aşamada besi ortamlarına CAS reaktif boyası dışında metal eklemesi yapılmamıştır. Burada izolatların Fe^{+3} ihtiyaçlarını karşılamak için ürettikleri sidrofor moleküllerinin Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} ağır metallerine bağlanabilme kabiliyetlerinin test edilmesi amaçlanmıştır. Fe^{+3} yerine, Co^{+2} veya Ni^{+2} metallerinin Chrome Azurol Sulfonate (CAS) boyası kompleks oluşturması ve sonrasında izolatlar tarafından salgılanan metal-şelatlama ajanlarının (siderofor) metalleri kendine bağlaması sonucunda serbest boyanın açığa çıkması, izolat çevresinde sar-turuncu bir zon oluşturur (Şekil 4.2).

İnkübasyon sonunda elde edilen zon ve koloni çapları kullanılarak oluşturulan siderofor üretim indeksleri (SI) verilerine göre G119S1, G25K3, G79Y2, G35S1, G6Y2, G9Y2, G12S1, G101K4, G53Y2 ve G135Y4 kod numaralı 10 adet izolatın CAS- Fe^{+3} içeren besi ortamı da dahil olmak üzere siderofor üretmediği görülmüştür. Bu izolatların dışındaki 20 adet izolatın farklı SI değerlerinde siderofor ürettikleri ortaya konmuştur (Çizelge 4.2). Ayrıca yine bu 20 adet izolatın sentezleyip besi ortamına salgıladıkları siderofor moleküllerinin her üç metal (Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2}) için afiniteleri olduğu açıkça görülmüştür.

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi G119Y2T, G111K3 ve G30S1 gibi izolatların her üç metal için verdiği SI değerleri benzer iken G88K1, G47K1 ve G45Y1 gibi izolatların bu üç metal için gösterdikleri SI değerlerinin birbirlerinden oldukça farklı olduğu, farklı metaller için farklı zon değerleri verdikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Aynı kod numaralı izolatlar ile soldan sağa sırasıyla NiSO_4 , CoCl_2 ve FeCl_3 ile hazırlanmış CAS reaktif boyası içeren katı LB besi ortamlarında yapılmış siderofor CAS testi örnek petri fotoğrafı.

4.3. Ağır Metal İçeren CAS Besi Ortamlarında Siderofor Tespiti

Çalışmanın bu aşamasında izolatların ağır metal stresi altında siderofor üretim profillerini incelemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda izolatların her bir metale karşı verdikleri MIC değerleri göz önünde bulundurularak, bu metallerin CAS besi ortamlarındaki final konsantrasyonları belirlenmiştir. Besi ortamlarındaki final konsantrasyonları CoCl_2 için 0,4 mM, NiSO_4 için 0.8 mM ve FeCl_3 için 1 mM olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda metal içeren CAS-LB agar besi ortamlarını hazırlamak için ağır metaller steril solüsyon halinde, yukarıda belirtilen final konsantrasyonlar elde edilecek şekilde, metallerin daha önce hazırlanan stok solüsyonlarından CAS-LB besi ortamlarına eklenerek hazırlanmıştır. Ayrıca hiçbir metal stresi oluşturmayan, CAS-LB agar içeren petrilerde kontrol amaçlı hazırlanmış ve bu testte kullanılmıştır (Şekil 4.3). Ayrıca çalışmanın bu bölümünde verilerin standart olması amacı doğrultusunda tüm besi ortamlarında CAS-Fe^{+3} reaktif boyası kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. Fe⁺³, Co⁺² ve Ni⁺² ile hazırlanan Chrome azurol S (CAS) reaktif solüsyonu (boyası) içeren LB besi ortamlarında izolatların verdiği ortalama siderofofor üretim indeksi (SI) değerleri

İzolat No	İzolat Kodu	CAS-Fe	CAS-Co	CAS-Ni
		SI	SI	SI
1	G119Y2T	1.51±0.11 ^g	1.31±0.03 ⁱ	1.52±0.04 ^{hi}
2	G88K1	2.47±0.03 ^d	3.33±0.00 ^a	3.21±0.22 ^{abc}
3	G119S1	-	-	-
4	G120S3	1.55±0.02 ^g	2.57±0.14 ^{cdef}	3.76±0.21 ^a
5	G32S2	2.00±0.00 ^{ef}	2.83±0.13 ^{bcd}	3.20±0.04 ^{abc}
6	G25K3	-	-	-
7	G30S1	1.53±0.051 ^g	1.33±0.09 ⁱ	1.39±0.10 ⁱ
8	G47K1	1.62±0.21 ^g	2.88±0.00 ^{bcd}	1.76±0.32 ^{ghi}
9	G56Y1	2.96±0.35 ^{ab}	3.05±0.40 ^{bc}	2.31±0.12 ^{efg}
10	G33Y3	3.18±0.57 ^{ab}	3.07±0.24 ^{bc}	3.15±0.32 ^{abc}
11	G88S1	1.50±0.00 ^g	2.30±0.20 ^{efg}	2.45±0.09 ^{def}
12	G20Y3	1.38±0.01 ^g	1.67±0.18 ^{hi}	1.40±0.18 ⁱ
13	G115S1	2.33±0.11 ^{de}	2.91±0.16 ^{bcd}	3.23±0.39 ^{abc}
14	G24Y1	1.66±0.15 ^{gf}	2.62±0.27 ^{cdef}	2.35±0.87 ^{efg}
15	G79Y2	-	-	-
16	G35S1	-	-	-
17	G111K3	1.63±0.06 ^g	1.67±0.07 ^{hi}	1.86±0.00 ^{fg}
18	G37K1	2.23±0.08 ^{de}	2.67±0.30 ^{cde}	2.81±0.66 ^{cde}
19	G6Y2	-	-	-
20	G45K1	1.56±0.10 ^g	2.39±0.19 ^{defg}	2.47±0.23 ^{def}
21	G9Y2	-	-	-
22	G15S1	3.24±0.17 ^a	3.59±0.48 ^a	3.29±0.17 ^{abc}
23	G12S1	-	-	-
24	G101K4	-	-	-
25	G99K3	3.00±0.00 ^{ab}	2.00±0.00 ^{gh}	3.00±0.00 ^{bcd}
26	G53Y2	-	-	-
27	G111K1	2.83±0.29 ^{bc}	3.00±0.87 ^{bc}	3.33±0.58 ^{abc}
28	G105Y1B	2.55±0.37 ^{cd}	2.12±0.22 ^{fgh}	2.01±0.17 ^{fgh}
29	G45Y1	1.27±0.23 ^g	2.05±0.16 ^{gh}	3.55±0.17 ^{ab}
30	G135Y4	-	-	-

*Siderofofor Üretim İndeksleri, ilgili testte ölçülen ortalama zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak hesaplanmıştır. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

** Aynı sütun içerisinde, farklı harflerle ifade edilen gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir (p<0.05) (Ortalama ± Std. Sapma).

Çizelge 4.5. Farklı metal stresi altında, LB besi ortamlarında izolatların verdiği ortalama siderofor üretim indeksi (SI) değerleri

		CAS-LB	CAS-LB+Co	CAS-LB+Ni	CAS-LB+Fe	CAS-LB+Co+Fe	CAS-LB+Ni+Fe
İzolat No	İzolat Kodu	SI	SI	SI	SI	SI	SI
1	G119Y2T	1.44±0.11 ^{ij}	1.29±0.14 ^h	1.42±0.14 ^{gh}	-	-	-
2	G88K1	2.62±0.16 ^{cd}	1.88±0.65 ^{defgh}	3.71±0.36 ^{ab}	-	-	-
3	G119S1	-	-	-	-	-	-
4	G120S3	2.01±0.17 ^{efg}	-	1.22±0.10 ^h	-	-	-
5	G32S2	1.89±0.05 ^{efghi}	3.32±0.33 ^{ab}	1.85±0.24 ^{tgh}	-	-	-
6	G25K3	-	-	-	-	-	-
7	G30S1	1.73±0.32 ^{tghij}	1.47±0.07 ^{tgh}	1.34±0.14 ^h	-	-	-
8	G47K1	2.17±0.54 ^{ef}	2.21±0.34 ^{cde}	2.00±0.54 ^{efg}	-	-	-
9	G56Y1	3.07±0.08 ^c	3.23±0.50 ^{ab}	2.93±0.61 ^{cd}	3.49±0.13 ^a	2.55±0.31 ^a	2.97±0.11 ^a
10	G33Y3	3.83±0.37 ^b	3.67±0.73 ^a	3.29±0.73 ^{bc}	3.31±0.34 ^a	2.66±0.18 ^a	2.42±0.11 ^{ab}
11	G88S1	1.54±0.00 ^{hij}	1.51±0.00 ^{tgh}	1.57±0.00 ^{tgh}	-	-	-
12	G20Y3	1.66±0.76 ^{tghij}	2.05±0.40 ^{defg}	1.34±0.05 ^h	-	-	-
13	G115S1	2.34±0.76 ^{de}	1.55±0.56 ^{efgh}	3.89±0.35 ^a	-	-	-
14	G24Y1	1.71±0.19 ^{tghij}	2.15±0.08 ^{def}	1.48±0.18 ^{tgh}	-	-	-
15	G79Y2	-	-	-	-	-	-
16	G35S1	-	-	-	-	-	-
17	G111K3	1.72±0.29 ^{tghij}	1.88±0.26 ^{defgh}	1.87±0.14 ^{tgh}	-	-	-
18	G37K1	1.94±0.37 ^{efgh}	2.27±0.52 ^{cd}	2.07±0.27 ^{efg}	-	-	-
19	G6Y2	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.5. Farklı metal stresi altında, LB besi ortamlarında izolatların verdiği ortalama siderofor üretim indeks (SI) değerleri (devam)

		CAS-LB	CAS-LB+Co	CAS-LB+Ni	CAS-LB+Fe	CAS-LB+Co+Fe	CAS-LB+Ni+Fe
İzolat No	İzolat Kodu	SI	SI	SI	SI	SI	SI
20	G45K1	2.02±0.24 ^{efg}	1.86±0.13 ^{defgh}	1.83±0.17 ^{fgh}	-	-	-
21	G9Y2	1.37±0.07 ^j	-	1.61±0.19 ^{fgh}	-	-	-
22	G15S1	3.46±0.13 ^b	2.84±0.10 ^{bc}	3.23±0.47 ^{bc}	-	-	-
23	G12S1	-	-	-	-	-	-
24	G101K4	-	-	-	-	-	-
25	G99K3	5.00±0.00 ^a	2.33±0.00 ^{cd}	4.00±0.00 ^a	-	-	-
26	G53Y2	-	-	-	-	-	-
27	G111K1	3.00±0.50 ^c	2.40±0.17 ^{cd}	2.61±0.67 ^{de}	-	1.80±0.06 ^b	2.03±0.45 ^{bc}
28	G105Y1B	2.33±0.26 ^{de}	1.86±0.41 ^{defgh}	2.11±0.17 ^{ef}	-	1.51±0.08 ^b	1.60±0.42 ^c
29	G45Y1	2.06±0.18 ^{efg}	1.41±0.10 ^{gh}	1.26±0.04 ^h	-	-	-
30	G135Y4	-	-	-	-	-	-

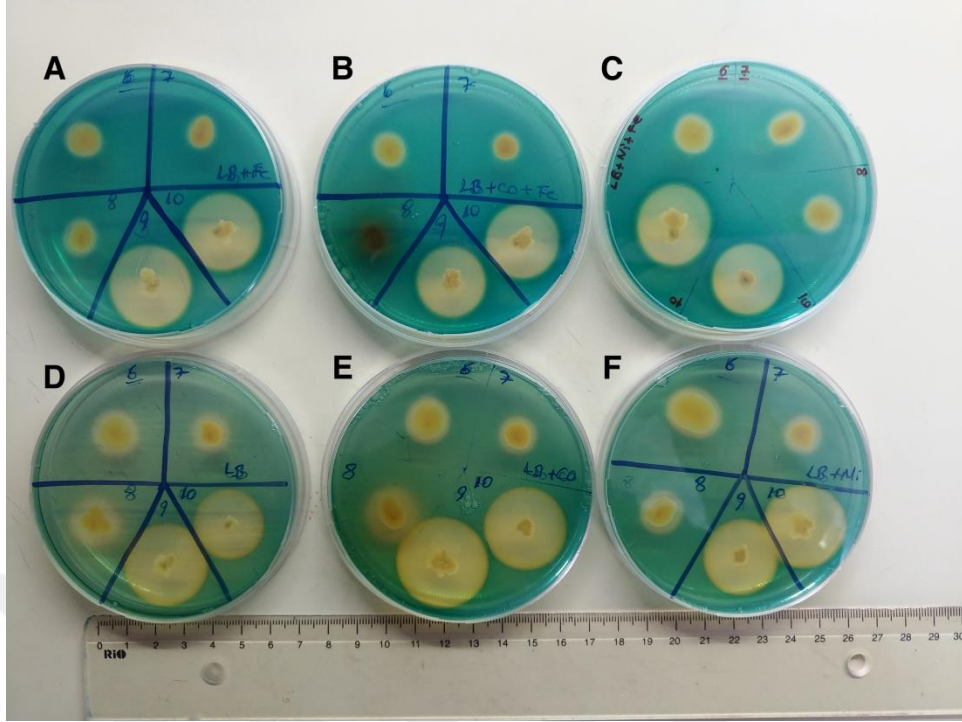
*Siderofor Üretim İndeksleri, ilgili testte ölçülen ortalama zon çaplarının ortalama koloni çaplarına oranı olarak hesaplanmıştır. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

** Aynı sütun içerisinde, farklı harflerle ifade edilen gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir (p<0.05) (Ortalama ± Std. Sapma).

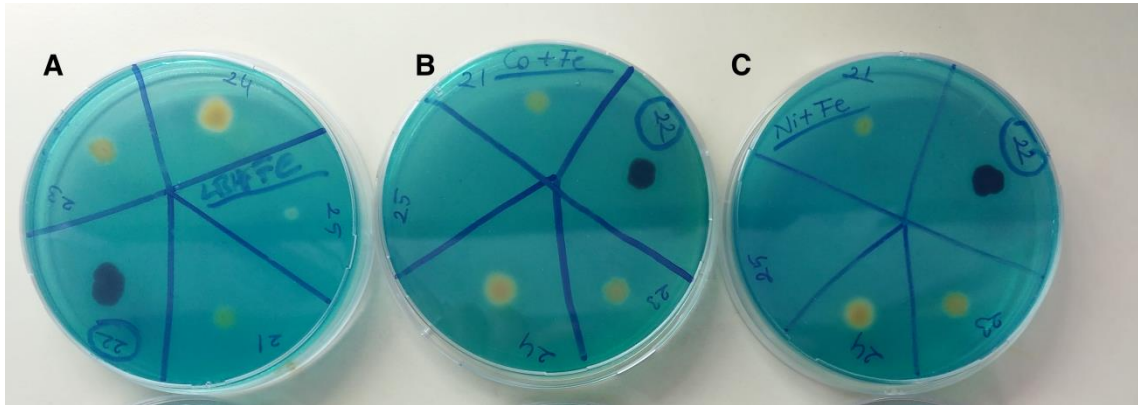
İzolatların metal stresi altında siderofor üretim profillerini ortaya koyabilmek için, ekstra metal içermeyen CAS-LB, 0.3 mM CoCl_2 içeren CAS-LB+Co, 0.8 mM NiSO_4 içeren CAS-LB+Ni, 1 mM FeCl_3 içeren CAS-LB-Fe, 0.3 mM CoCl_2 ve 1 mM FeCl_3 içeren CAS-LB+Co+Fe, 0.8 mM NiSO_4 ve 1 mM FeCl_3 içeren CAS-LB+Co+Ni besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen zon ve koloni çapları kullanılarak siderofor üretim indeksi (SI) verileri oluşturulmuştur (Çizelge 4.5).

CAS-LB+Fe, CAS-LB+Co+Fe ve CAS-LB+Ni+Fe besi ortamlarında yer alan 1 mM FeCl_3 , organizmaların besi ortamında hazır, kullanılabilir Fe^{+3} varlığında siderofor üretimini sınırlandırmak ve ortadan kaldırmak amaçlı olarak kullanılmıştır. G56Y1 ve G33Y3 kod numaralı izolatlar ilginç olarak bu kuraldan etkilenmemiş ve 1 mM kullanılabilir Fe^{+3} içeren her üç besi ortamında da oldukça yüksek zonlar üreterek hatırı sayılır SI değerleri vermiştir (Çizelge 4.5). Diğer taraftan G111K1 ve G105Y1B kod numaralı izolatlar sadece 1mM Fe^{+3} içeren CAS-LB+Fe besi ortamında beklenildiği gibi siderofor üretememiş fakat aynı oranda Fe^{+3} içeren CAS-LB+Co+Fe ve CAS-LB+Ni+Fe içeren besi ortamlarında zon üreterek önemli ölçüde SI değerleri vermiştir (Çizelge 4.5). Bunların dışında kalan izolatlar beklenildiği gibi demir içeren besi ortamlarında koloni oluşturmalarına rağmen siderofor üretimi gerçekleştirilmemişlerdir.

Çizelge 4.3’de verilen sonuçlar ile çalışmanın bir önceki aşaması olan “sideroforların Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} metallerini bağlama kabiliyetinin belirlenmesi” başlığı altındaki testlerin verilerini yansıtan Çizelge 4.2’de verilen sonuçlar genel olarak tutarlılık göstermektedir. Çizelge 4.2’de siderofor üretimi göstermeyen G119S1, G25K3, G79Y2, G35S1, G6Y2, G9Y2, G12S1, G101K4, G53Y2 ve G135Y4 kod numaralı 10 adet izolat bu çalışmanın bu aşamasında da hiçbir besi ortamında kayda değer SI değeri üretememiştir (Çizelge 4.3). Ancak iki çizelge arasında bazı sapmalar da gözlemlenmiştir. Örneğin G88S1 kod numaralı izolat Çizelge 4.2’de göstermiş olduğu SI değerlerini, kobalt ve nikel baskısı altında gösterememiştir. Bu izolat CAS-LB+Co besi ortamında zon vermemiş, CAS-LB+Ni besi ortamında düşük bir SI değeri üretebilmiştir. Bir diğer farklı olarak değerlendirebilecek izolat G15S1 kod numaralı izolattır. Bu izolat oldukça küçük koloniler oluşturmalarına rağmen hatırı sayılır SI değerleri verirken, ortama ekstra Fe^{+3} metali eklendiğinde (CAS-LB+Fe, CAS-LB+Co+Fe, CAS-LB+Ni+Fe) koyu siyah koloniler oluşturmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. 6(G25K3), 7(G30S1), 8(G47K1), 9(G56Y1) ve 10(G33Y3) kod numaralı izolatların A) CAS-LB+Fe, B) CAS-LB+Co+Fe, C) CAS-LB+Ni+Fe, D) CAS-LB, E) CAS-LB+Co, F) CAS-LB+Ni besi ortamlarında gösterdikleri siderofor üretme profilleri.



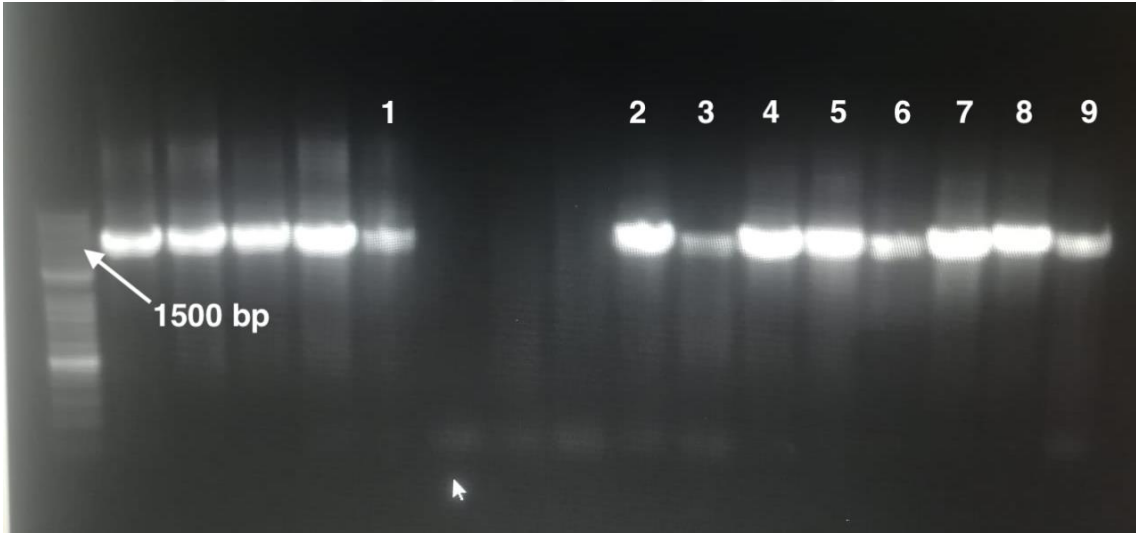
Şekil 4.4. 6(G25K3), 7(G30S1), 8(G47K1), 9(G56Y1) ve 10(G33Y3) kod numaralı izolatların A) CAS-LB+Fe, B) CAS-LB+Co+Fe, C) CAS-LB+Ni+Fe, D) CAS-LB, E) CAS-LB+Co, F) CAS-LB+Ni besi ortamlarında gösterdikleri siderofor üretme profilleri.

4.4. Moleküler Tanımlama İçin İzolat Seçimi

Ağır metal stresi altında vermiş oldukları siderofor üretim indekslerinin (SI) belirlenmesinden sonra, gelecek vaat eden 8 izolat (G32S2, G56Y1, G33Y3, G115S1, G15S1, G111K1, G105Y1B ve G45Y1) ile siderofor üretmeyen 1 izolat (G53Y2) 16S rRNA sekanslaması ile moleküler tanımlama için seçilmiştir.

4.5. Moleküler Tanımlama

27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1492r (5'- TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') evrensel primer çifti kullanılarak çoğaltılan, 9 adet izolata ait, yaklaşık 1500 bp büyüklüğündeki 16S rRNA gen bölgeleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Seçilen 9 adet izolata ait PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgeleri.

4.6. Dizi Analizi Sonuçları

Dizileme sonucunda, 9 izolatın kısmi 16S rRNA dizilemesi başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen diziler “<https://www.ezbiocloud.net/>” adlı internet sayfasında bulunan veri tabanı ile karşılaştırılmış ve “GenBank” sistemine girişleri yapılarak “accession” erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.6. Dizi analiz sonuçlarının EzBioCloud very tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analiz sonuçları ve GenBank erişim numaraları

İzolat Kodları	En Yakın Tür	En Yakın Suş	Benzerlik (%)	Tamamlanan Dizileme (1500 bp üzerinden) (%)	GenBank Erişim Numaraları
G32S2	<i>Chryseobacterium shigense</i>	DSM 17126	97.23	70.2	ON571627
G56Y1	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	99.03	77.0	ON571630
G33Y3	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	98.59	28.9	ON571628
G115S1	<i>Pseudomonas orientalis</i>	CFML 96-170	99.36	75.4	ON571626
G15S1	<i>Bacillus sp. DQ071564_s</i>	MKU 4	79.18	63.2	-
G53Y2	<i>Peribacillus simplex</i>	NBRC 15720	100.00	75.4	ON571625
G111K1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	ATCC 51129	99.91	76.1	ON571624
G105Y1B	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096	99.91	76.4	ON571623
G45Y1	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	DSM 13647	99.82	76.7	ON571629

Veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı veri analiz sonucunda, 9 adet izolata ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi, 2 adet *Pseudomonas sp.* (G115S1, G45Y1), 4 adet *Bacillus sp.* (G15S1, G56Y1, G33Y3, G105Y1B), 1 adet *Chryseobacterium sp.* (G32S2), 1 adet *Staphylococcus sp.* (G111K1), 1 adet *Peribacillus sp.* (G53Y2) cinslerine ait sonuç vermiştir. Kullanılan veri tabanına göre, G15S1 kod numaralı izolat *Bacillus* cinsi DQ071564_s kod numaralı suşa ait 16s rRNA dizisi ile %79.18 benzerlik oranı göstermesine rağmen, bu benzerlik oranının düşük olmasından dolayı GenBank bu izolat için erişim numarası vermemiştir. Dolayısı ile bu izolat için moleküler tanımlama işlemleri devam ettirilecektir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması Van Gölü havzasının belirli bölgelerinden buğdaygil bitkilerinden izolasyonu gerçekleştirilmiş endofit bakteri izolatlarının biyoteknolojik ve sağlık sektöründe önemli uygulama alanlarına sahip olan sideroforlar açısından karakterizasyonuna yönelik yapılmış ilk çalışmadır.

Endofitler bakteri veya fungus olabilen, yaygın olarak bitki büyümesini teşvik eden organizmalar (PGPR) olarak adlandırılan rizosferik mikroorganizmalardır. Endofit bakteriler bitki konakçısının iç dokularında yaşayabilen, yüzey sterilizasyonu yapılmış dokulardan izole edilen ve konakçısında belirgin bir hastalık belirtisi göstermeyen bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Reinhold-Hurek ve Hurek, 1998; Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011; Santoyo ve ark., 2016).

Birçok mikroorganizma demir açlığı durumunda, yaşam habitatlarında sınırlı miktardaki demiri çözünebilir hale getirebilmek ve hücre içerisine alabilmek için en az bir tip siderofor salgılamaktadır (Haas, 2003). Bakteriler, funguslar ve bitkiler tarafından üretilen bu sekonder metabolitler, demir alımını sağlayan şelatlama ajanlarıdır (Schalk ve ark., 2011). Demir, oksijenin bulunduğu birçok habitatta çözünmez oksit hidrat bileşikler olarak bulunur. Patojenik mikroorganizmalar için de benzer olarak demir elementi proteinlerle veya hem gruplarıyla güçlü şekilde ilişkili olmasından dolayı ortamda oldukça düşük miktarlarda bulunmaktadır (Miethke ve Marahiel 2007).

Bakteriler, metal fazlalığı ve metal sınırlılığı (demir başta olmak üzere) olan şartlara karşı çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Shi ve ark., 2017). Metal fazlalığı metal stresi olarak da tanımlanır. Bakteriler, ihtiyaç duydukları metalleri habitatlarından alabilmek için bu metalleri bağlı oldukları minerallerden veya topraktan çözmeye ihtiyaç duymaktadırlar (Hofmann ve ark., 2021). Bu metal-oksihidroksit çözünmesi genellikle seçici olmayan bir şekilde sitrat veya okzalit gibi organik asitlerle gerçekleştirilmekte ve sideroforlar tarafından desteklenmektedir (Akafia ve ark., 2014). Sideroforlar peptid ya da peptid olmayan bir iskelete sahip sekonder metabolitler olup bu iskelet çeşitli metal bağlama bölgeleri ihtiva ederek sideroforlara çeşitlilik sağlamaktadır (Hider ve Kong, 2010). Sideroforlar çok çeşitlidir ancak en genel

sınıflandırma ile hidroksamat, hidroksil, katekol, karboksilik veya karışık tipte olabilmektedir (Hofmann ve ark., 2020).

Sideroforların demirden (Fe^{+3}) başka nikel, kobalt, kadmiyum, galyum gibi ağır metalleri şelatladıklarına dair çalışmalar mevcuttur (Hofmann ve ark., 2021; Schwabe ve ark., 2018; Wiche ve ark., 2017). Dolayısı ile sideroforların seçici olarak farklı metallere veya iyonlara bağlanması sağlık, çevresel uygulamalar, biyosensör geliştirilmesi, metal ve biyoremediasyon gibi çeşitli araştırma alanları için ilgi çekmektedir (Singh ve ark., 2020). Bütün sideroforlar, Fe^{+3} için çok yüksek afinite gösteren şelatlayıcı ajanlardır. Bu nedenle, sideroforlar bağlı oldukları bileşiklerden demiri çözünebilir forma getirerek mikroorganizmalar için hücre içine alınabilir forma getirmesi önemlidir. Sideroforlar, 500 farklı kimyasal yapı içeren bir sekonder metabolit ailesini temsil etmektedir (Schalk ve ark., 2011). Sideroforlar genellikle demir yoksunluğunda sentezlenerek ekstraselüler olarak çevreye salgılanmaktadır. Ayrıca, siderofor sentezinin farklı metaller tarafından da aktive edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Schalk ve ark., 2011).

Bu çalışmada daha önce izolasyonu gerçekleştirilen 30 adet endofit bakteri izolatının demir (Fe^{+3}), kobalt (Co^{+2}) ve nikel (Ni^{+2}) stresi altında siderofor üretim profilleri **ilk defa ortaya konmuştur**. İlgili ağır metalleri kullanarak besi ortamlarında stres ortamı yaratabilmek için öncelikle izolatların Co^{+2} , Ni^{+2} ve Fe^{+3} elementleri için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİC) değerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Co^{+2} için, 0,1 mM aralıklarla 0 mM-1 mM arasında, Ni^{+2} için, 0,1 mM aralıklarla 0 mM-3 mM arasında ve Fe^{+3} için, yine 0,1 mM aralıklarla 0 mM-3 mM arasında denemeler kurulmuştur. Genel olarak izolatlar en fazla Fe^{+3} iyonun artan konsantrasyon değerlerinden etkilenmezken, en fazla hassasiyet gösterdikleri metal Co^{+2} olmuştur (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Co^{+2} için en yüksek MIC değeri 0.9 mM ile G30S1 izolatına ait iken, genellikle 0,7 mM ve üstünden izolatlar gelişim gösterememiştir. Fe^{+3} içeren besi ortamlarında ise genel olarak 2,9 mM ve üzerinde izolatlar gelişim göstermez iken en düşük MİC değeri 1,1 mM ile G119 S1 kod numaralı izolata ait olmuştur. İzolatlar Ni^{+2} metalinin artan konsantrasyon değerlerinden Fe^{+3} iyonuna göre daha fazla ancak Co^{+2} a göre daha az etkilenmişlerdir. 1,1 mM ve üstü NiSO_4 konsantrasyonu genel olarak izolatlar için toksik etki yaratırken 18(G37K1) ve 29(G45Y1) kod numaralı izolatlar 2,6 mM a kadar gelişim göstererek nikel karşı en dirençli izolatlar olmuşlardır

(Çizelge 4.2). Şu anda kabul edilebilir standart bir konsantrasyon değeri olmamasına rağmen metal dirençliliğini ayırt etmek için 1.0 mM ve üzerindeki metal iyonları konsantrasyonlarında büyüeyebilen bakteriler ilgili metale dirençli olarak kabul edilebilir (Malik ve Jaiswal, 2000; Tomova ve ark., 2015).

In vitro koşullarda ağır metal stresi oluşturmada önce izolatlar tarafından sentezlenen ve hücre dışına salgılanan sideroforların Fe^{+3} dışında Co^{+2} ve Ni^{+2} metallerini bağlama kabiliyetinin belirlenmesi bu tez çalışmasının bir sonraki hedefi olmuştur. Bunun için evrensel CAS reaktif boyası her üç metal için ayrı ayrı, ilgili metallerin aynı konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmış ve katı besi ortamlarına eklenmiştir. Hazırlanan besi ortamlarına bunun dışında metal eklemesi yapılmamıştır. Siderofor üretim indeksleri (SI) verilerine göre 10 adet izolatın hazırlanan besi ortamlarında kayda değer oranda siderofor üretmediği görülmüştür. Bu izolatların dışındaki 20 adet izolatın farklı SI değerlerinde siderofor ürettikleri ortaya konmuştur (Çizelge 4.2). Ayrıca yine bu 20 adet izolatın sentezleyip besi ortamına salgıladıkları siderofor moleküllerinin her üç metal (Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2}) için afiniteleri olduğu açıkça görülmüştür. Sonuçlar Schwyn & Neilands (1987)'in evrensel CAS testinin, yalnızca Fe-CAS çözeltisi ile siderofor konsantrasyonunu belirlemek için değil, aynı zamanda diğer metal iyonlarını bağlama yetenekleri açısından sideroforları test etmek için de kullanılabileceğini gösteren çalışmaların verileri ile örtüşmektedir (Mehnert ve ark., 2017; Hoffman ve ark., 2021). G88K1, G32S2 ve G88S1 gibi izolatların Co^{+2} ve Ni^{+2} vermiş olduğu SI değerlerinin Fe^{+3} için verdiklerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Ancak bu veriler sideroforların Co^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarına daha yüksek afinite ile bağlandı sonucunu çıkarmak için yetersiz olduğu açıktır. Bu iki metale bağlanan siderofor molekülleri demir ihtiyacını karşılayamadığı için hücrelerin daha fazla siderofor sentezleyip ve ortama salgılamış olma ihtimali düşünülmelidir. Bu aşamada besi ortamına metal eklenmediği ve stres ortamı oluşturmadığı için, izolatların siderofor dışında bir metal şelatlama ajanı sentezlediği ve SI değerlerinin bu nedenle yüksek olduğu hipotezi de ayrıca düşük olasılıklı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında izolatların metal stresi altında siderofor üretim profilleri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda her bir metale karşı verdikleri MIC değerleri göz önünde bulundurularak, izolatlar için stres yaratacak fakat toksik etki göstermeyecek maksimum metal konsantrasyonlar belirlenmiştir ve CAS-LB agar besi

ortamları hazırlanmıştır. Besi ortamlarındaki final konsantrasyonları CoCl_2 için 0,4 mM, NiSO_4 için 0,8 mM ve FeCl_3 için 1 mM olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.3’de görüldüğü üzere CAS-LB+Co+Fe ve CAS-LB+Ni+Fe besi ortamlarına kobalt ve nikel dışında 1 mM konsantrasyonda demir eklenmesinin sebebi, ortamdaki kullanılabilir Fe^{+3} iyonu konsantrasyonunu yüksek tutarak, Fe^{+3} ihtiyacından kaynaklanacak siderofor üretimini durdurmak ve olası zon oluşumlarını ortamdaki ağır metal stresi ile daha sağlıklı ilişkilendirebilmektir. Bu bağlamda G111K1 ve G105Y1B kodlu izolatlar sıra dışı sonuçlar vermiş, CAS-LB+Fe ortamında siderofor üretimi durmuş iken, CAS-LB+Co+Fe ve CAS-LB+Ni+Fe besi ortamlarında kayda değer CAS reaksiyonu üretme kabiliyeti göstermişlerdir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar bu iki izolatın Co^{+2} ve Ni^{+2} ağır metalleri ile başa çıkma mekanizmalarından birinin siderofor sentezi olabileceğini düşündürmektedir. Bu denemenin bir diğer ilginç sayılabilecek sonucu ise, G56Y1 ve G33Y3 kod numaralı izolatların verdiği SI değerleridir. Bu izolatlar CAS-LB besi ortamlarına eklenen 1 mM Fe^{+3} metal iyonundan hiçbir şekilde etkilenmeden CAS reaksiyonu göstermeye devam etmişler ve oldukça yüksek SI değerleri vermişlerdir. Oysa ortama çok daha düşük konsantrasyonlarda Fe^{+3} eklenmesinin pek çok mikroorganizmada siderofor sentezin durdurduğu/baskıladığı pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin, 27 μM Fe^{+3} eklenmesi 20 fungus ve 3 *Pseudomonas* bakterisinde siderofor sentezinin durmasına sebep olmuştur (Dave ve Dube, 2000). Büyüme koşullarının siderofor üreten bakteriler üzerindeki etkilerini inceleyen bir başka çalışmada, 50 μM a kadar arttırılan Fe^{+3} konsantrasyonunun bakterilerdeki üreme hızını etkilemeden siderofor sentezini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Sinha ve ark., 2019). Benzeri çalışmaların sayısını arttırmak mümkündür. Yüksek demir konsantrasyonlarında siderofor üretiminin baskılanmasını sağlayan çeşitli moleküler sebepler olabilir. Örneğin aerobaktin (hidroksamat tipi) gibi sideroforlarda, aerobaktin operonun ekspresyonu Fe kullanan ko-represör proteinleri tarafından inhibe edilir ve yüksek demir konsantrasyonunda bu proteinler aktif haldedir (Neilands, 1995).

Machuca ve Milagres (2003)’ün yürüttüğü bir çalışmada, çeşitli fungus türleri le yürütülen denemelerde sadece *Aspergillus niger* fungusların 4 mM Fe^{+3} konsantrasyon varlığında bile katı besiyerlerinde CAS reaksiyonu (zon oluşumu) oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Sideroforların biyosentezinin ortamın demir içeriği tarafından düzenlendiği ve fazla demir varlığında inhibe edildiği bilinmektedir (Neilands, 1993;

Machuca ve Milagres, 2003). Gerek yukarıda bahsi geçen *A. niger* çalışmasında gerekse tez çalışmamızda gözlemlenen yüksek demir konsantrasyonlarında siderofor biyosentezindeki düzenlemelerin olmaması, CAS reaktifi ile reaksiyona giren siderofor dışı bir bileşiğin ya da siderofor dışında bir şelatörün varlığını düşündürmektedir. Örneğin *A. niger* iyi bir sitrik ve oksalik asit üreticisi olarak bilindiğinden, muhtemelen bu organik asitler yüksek demir konsantrasyonlarında CAS ile reaksiyona giriyor olabilir (Machuca ve Milagres, 2003). Bir dizi toprakta yaşayan mantarın hem sitrik asit hem de malik asit salgıladığı gösterilmiştir (Guerinot ve ark., 1990). Ayrıca, demir eksikliğinden doğan stres koşullarında tepki olarak organik asitlerin salınımı *Neurospora crassa* için belgelenmiştir. Bu mantarlar tarafından salgılanan asitlerin, hücre yüzeyinde konsantre olan demir ile etkileştiği, demiri çözünür hale getirerek mantarlar tarafından kullanıma uygun hale getirdiği düşünülmektedir (Winkleman, 1979; Guerinot ve ark., 1990). Benzer bir senaryo G56Y1 ve G33Y3 kod numaralı izolatlarımız için de geçerli olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızın son aşamasında moleküler tanımlamasını başarı ile yaptığımız 9 adet izolat *Firmucutes* (*Bacillus* sp., *Peribacillus* sp., *Staphylococcus* sp.), *Proteobacteria* (*Pseudomonas* sp.), ve *Bacteroidetes* (*Chryseobacterium* sp.) üç ana şubesi içinde gruplanmışlardır. G15S1 izolatu dışındaki izolatların 16S rRNA dizileme sonuçları %97'nin üzerinde benzerlik oranları vermektedir (Çizelge 4.4). 16S rRNA gen sekansları tek başına yeni bir türü tanımlamaya yetmeyebilir, ancak yeni bir türün izole edildiğine dair ilk ve güçlü bir indikatördür (Tindall ve ark., 2010). İki suşun aynı türe ait olmadığını doğrulamak için %97 16S rRNA gen dizisi benzerlik eşiği önerilmiş ve günümüzde hala bu yaklaşım geçerliğini korumaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). G15S1 kod numaralı izolatın verdiği %79,18 benzerlik oranı bu eşiğin çok altındır ve bu oran ile genbank veri tabanından erişim numarası almak mümkün olmamıştır. Dolayısı ile bu izolat ile ilgili 16s rRNA dizilemesinin tekrarlanması yanı sıra tüm genom sekanslaması, fenotipik karakterizasyonlar (morfoloji, fizyoloji, biyokimya vs.), hücresel yapısal elementlerin kimyasal karakterizasyonu (hücre duvarı peptidoglikanı, teikoik asitler, mikolik asitler, vb.) gibi çalışmalar ek olarak yapılmalıdır.

Bacteroidetes şubesine ait tek izolatımız %97.23 benzerlik oranı ile *Chryseobacterium shigense*'i gösteren G32S2 kodlu bakteridir. Bu cins Gram negatif, çubuk şeklinde, flexirubin tipi pigment üretmesi nedeniyle sarı-turuncu koloniler

oluşturan bakterilerdir ki bu oluşum izolatımızın oluşturduğu koloni rengi ile tutarlıdır. *Chryseobacterium* sp., cinsi toprak, tatlı su kaynakları, balıklar ve farklı hayvan konakları dahil olmak üzere çeşitli yaşam alanlarından izole edilmiş 100'den fazla tür içerir (Matu ve ark., 2019). *Chryseobacterium* cinsine ait bazı türlerin endofit bakteri olarak izole edildiği çalışmalar mevcuttur (Jeong ve ark., 2017; Lin ve ark., 2017). *Chryseobacterium shigense*'nin endofit olarak izolasyonunu gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak 16s rRNA dizilemesinin tek başına tür tayini yapmak için yetersiz olabileceğini unutmamak gerekmektedir.

G56Y1 ve G333Y3 izolatları sırası ile *Bacillus siamensis* ile sırası ile %99,03 ve %98,59 ile benzerlik oranı örtüşmüşlerdir (Çizelge 4.4). *Bacillus* cinsine ait farklı türler endofitik organizmalar olduğu bildirilmiştir (Egamberdieva ve ark., 2017). Sharma ve ark. (2020), domates tohumlarından *B. siamensis* de dahil olmak üzere *Bacillus*'un 16 farklı endofitik türünü izole etmiştir. 16S rDNA dizi homolojilerine dayalı olarak tanılaması yapılan *Bacillus siamensis* güçlü bir endofit bakteri suşu olarak nohuttan izole edilmiştir (Gorai ve ark., 2021). İzolat bu çalışmada, fosfat çözünürlüğü, IAA üretimi, nitrojen fiksasyonu, hidroksamat tipi siderofor üretimi ve ACC deaminaz aktiviteleri gibi bir dizi PGP özelliği göstermiştir. *Bacillus* cinsine ait olan bir diğer izolatımız, G105Y1BB, %99,91 benzerlik oranı ile *Bacillus halotolerans* ile örtüşmüştür. Bir çalışmada endofit bir izolat olarak patates bitkisinden izole edilen ve güçlü bir proteaz aktiviteye sahip olan suş, 16S ribozomal DNA dizi analizine göre *B. halotolerans* olarak tanımlanmıştır (Dorra ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada endofit *B. halotolerans* suşları *Fusarium*'a karşı biyolojik muhafızlar olarak belirlenmiş ve bu suşların siderofor üretimi dahil pek çok PGPR özellikleri aynı çalışmada ortaya konmuştur (Slama ve ark., 2019). bu çalışmadaki bir diğer olası *Bacillus* cinsine ait izolat G15S1 dir. Daha önce bahsedildiği gibi bu izolat 16s rRNA dizisi ile %79,18 benzerlik oranı göstermesine rağmen, bu benzerlik oranının düşük olmasından dolayı GenBank bu izolat için erişim numarası vermemiştir. Dolayısı ile bu izolat için moleküler tanımlama işlemleri devam ettirilecektir. *Bacillus* sp. cinslerinin çok farklı habitatlardaki yaşamları farklı ve oldukça geniş metabolik yeteneklerinin yansımasıdır. Bu çeşitlilikleri onları biyoteknolojik uygulamalar için yüksek değerlere sahip, potansiyel mikroorganizmalar haline getirir. Bu cins içerisinde, farklı endüstriler için çok önemli metabolitler sentezleyen, ekonomik değeri olan pek çok tür vardır

(Schallmey ve ark., 2004; Vary ve ark., 2007; Pérez-García ve ark., 2011; Yamashiro ve ark., 2011).

G115S1 ve G45Y1 izolatları sırası ile *Pseudomonas orientalis* (%99,36) ve *Pseudomonas kilonensis* (%99,91) ile örtüşmüşlerdir (Çizelge 4.4). *Pseudomonas* cinsi çok çeşitli metabolik aktiviteye sahip ve bu özelliklerinden dolayı çok çeşitli habitatları kolonize edebilen Gram negatif, “*Proteobacteria*” şubesine ait mikroorganizmalardır (Madigan, 2005). Antifungal kullanımları ve biyoremediasyon gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarını ortaya koymuş çeşitli çalışmalar mevcuttur (Yen ve ark., 1991; Haas ve Defago, 2005; Luque-Almagro ve ark., 2005). *Pseudomonas orientalis* türü, bitki mikrobiyomları ile sıklıkla ilişkilendirilmeyen bir bakteridir, ancak *Brassica napus* L. bitkisi kök bölgesinden endofit bakteri olarak izole edilip, tanımlandığını gösteren yakın zamanlı bir çalışma mevcuttur (Jiménez-Gómez ve ark., 2020). Diğer taraftan *P. kilonensis*’in endofit suşlar olarak izole edildiğini gösteren çalışma sayısı daha fazladır (Egamberdieva ve ark., 2020; Shurigin ve ark., 2021). Bu çalışmalarda *P. kilonensis*’in insan patojeni bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin yanısıra güçlü antifungal aktiviteye sahip ekstraselüler enzimler ürettiği gösterilmiştir.

%99,91 oranı ile *Staphylococcus pasteurii* ile benzerlik gösteren G111K1 tıpkı G105Y1 izolatı gibi LB+Co+Fe ve LB+Ni+Fe ortamlarında dahil güçlü siderofor üretim profili ortaya koymuştur (Çizelge 4.3). Moleküler tanımlama sonucunda *Staphylococcus pasteurii* ile örtüşen sonuçlar veren endofit bakteri izolasyon çalışmaları literatürde mevcuttur. Örneğin bu çalışmaların birinde izolasyonu yapılan ve siderofor üretim testlerinde pozitif sonuç veren 14 endofit izolat içerisinde en yüksek üretim değeri veren 3 izolattan birininin *Staphylococcus pasteurii* olarak tanımlanan suş olduğu bildirilmiştir (Haidar ve ark., 2018).

Moleküler tanımlama için seçtiğimiz, siderofor üretmeyen tek izolatımız %100 benzerlik oranı ile *Peribacillus simplex* ile örtüşen G53Y2 kod numaralı izolatımızdır. *P. simplex*’in (daha önceki adlandırma ile *Bacillus simplex*) endofit olarak izole edildiği pek çok çalışma mevcuttur (Martínez-Hidalgo ve ark., 2021). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada *Paenibacillus* ile birlikte *Peribacillus* izolatlarının umut verici biyogübreler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Martínez-Hidalgo ve ark., 2021). Eski adı ile *Bacillus simplex* bakterisinin endofit olarak siderofor üretimi dahil diğer bitki gelişimini teşvik eden özellikler barındırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur

(Schwartz ve ark., 2013). Ancak aynı bakteri türüne ait farklı suşların farklı fenotipik özelliklerinin de olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır ((Madigan, 2005). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1) Daha önce Van ilinin çeşitli bölgelerinden toplanmış çeşitli tek yıllık bitkilerin sağlıklı kök, yaprak ve gövde kısımlarından izolasyonu yapılan bakteri izolatlarından 30 adeti Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarından temin edilmiştir. Öncelikle bu izolatların siderofor üretim yetenekleri Fe^{+3} , Co^{+2} ve Ni^{+2} metalleri varlığında modifiye edilmiş evrensel CAS agar besi ortamı kullanılarak taranmıştır. Yapılan testler sonucunda, test edilen 30 izolatın 10 tanesinin hiç bir besi ortamında siderofor üretmediği, kalan 20 izolatın kayda değer siderofor ürettiği ve bunların her üç metale de bağlanma kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiştir.

2) İzolatların kobalt, nikel ve demir metal stresi altında siderofor üretim profilleri araştırılmıştır. İki izolat (G111K1 ve G105Y1B) CAS-LB+Fe ortamında CAS-siderofor reaksiyonu vermez iken, CAS-LB+Co+Fe ve CAS-LB+Ni+Fe besi ortamlarında kayda değer CAS reaksiyonu üretme kabiliyeti göstermişlerdir. Bu sonuçlar bu iki izolatın Co^{+2} ve Ni^{+2} ağır metalleri ile başa çıkma mekanizmalarından birinin siderofor sentezi olabileceğini düşündürmüştür.

3) Hesaplanan siderofor üretim indeksleri (SI) değerlerine göre seçilen en başarılı 8 izolat ile siderofor üretmeyen 1 izolat, 16S rRNA gen bölgesi dizileme yöntemi ile moleküler tanımlamaya tabi tutulmuştur.

4) Veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırmalı veri analiz sonucunda, 9 adet izolata ait 16S rRNA gen bölgesi dizisi, 2 adet *Pseudomonas sp.* (G115S1, G45Y1), 4 adet *Bacillus sp.* (G15S1, G56Y1, G33Y3, G105Y1BB), 1 adet *Chryseobacterium sp.* (G32S2), 1 adet *Staphylococcus sp.* (G111K1), 1 adet *Peribacillus sp.* (G53Y2) cinslerine ait sonuç vermiştir.

KAYNAKLAR

- Akafia, M., M., Harrington, J., M., Bargar, J., R., Duckworth, O., W., 2014. Metal Oxyhydroxide Dissolution As Promoted By Structurally Diverse Siderophores And Oxalate. ***Geochimica et Cosmochimica Acta***, **141**: 258-269.
- Arachevaleta, M., Bacon, C., W., Hoveland, C., S., & Radcliffe, D., E., 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. ***Agronomy journal***, **81**(1): 83-90.
- Arora, N., K., Verma, M., 2017. Modified Microplate Method For Rapid And Efficient Estimation Of Siderophore Produced By Bacteria. ***3 Biotech***, **7**(6): 1-9.
- Berg, G., Hallmann, J., 2006. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes, Chap. 4. ***Microbial Root Endophytes*** (Editor: B. J. E Schulz, C. J. C. Boyle, T. N. Sieber.) Springer, Berlin. 354.
- Boos, W., Eppler, T., 2001. Prokaryotic Binding Protein-Dependent ABC Transporters, in Microbial Transport Systems. ***G. Winkelmann, Wiley-VCH, Weinheim***, **77**: 114.
- Boukhalfa, H., Crumbliss, A., L., 2002. Chemical Aspects Of Siderophore Mediated Iron Transport. ***BioMetals***, **15**: 325-339.
- Braun, V., Hantke, K., 2011. Recent Insights Into Iron Import By Bacteria. ***Current Opinion in Chemical Biology***, **15**: 328-334.
- Cabaj, A., Kosakowska, A., 2009. Iron-Dependent Growth Of And Siderophore Production By Two Heterotrophic Bacteria Isolated From Brackish Water Of The Southern Baltic Sea. ***Microbiological Research***, **164**(5): 570-577.
- Carrim, A., J., I., Barbosa, E., C., Vieira, J., D., G., 2006. Enzymatic Activity Of Endophytic Bacterial Isolates Of *Jacaranda Decurrens* Cham.(Carobinha-Do-Campo). ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, **49**(3): 353-359.
- Chu, B., C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T., H., Krewulak, K., D., Lau, C., K., Peacock, R., S., 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. ***Biometals***, **23**: 601-611.
- Crosa, J., H., Walsh, C., T., 2002. Genetics And Assembly Line Enzymology Of Siderophore Biosynthesis In Bacteria. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, **66**: 223-249.
- Crowley, D., E., 2006. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms (pp. 169-198). Springer, Dordrecht.
- Dave, B., P., Dube, H., C., 2000, Regulation Of Siderophore Production By Fe(III) In Certain Fungi And Fluorescent Pseudomonas, ***Indian Journal of Experimental Bio-logy***, **38**: 297-299.
- Davidson, A., L., Nikaido, H., 1991. Purification And Characterization Of The Membraneassociated Components Of The Maltose Transport System From Escherichia Coli. ***Journal of Biological Chemistry***, **266**: 8946-8951.
- Dogan, G., Taskin, B., 2021. Hydrolytic enzymes producing bacterial endophytes of some poaceae plants. ***Polish journal of microbiology***, **70**(3): 297.
- Dorra, G., Ines, K., Imen, B., S., Laurent, C., Sana, A., Olfa, T., Ferid, L., 2018 Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline Protease produced by an endophytic bacillus halotolerans strain Ct2. ***International journal of biological macromolecules***, **111**: 342-351.
- Duffus, J., H., 2002. Heavy metals a meaningless term? ***Pure and Applied Chemistry***, **74**: 793-807.

- Egamberdieva, D., Shurigin, V., Alaylar, B., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S., D., 2020. Bacterial endophytes from horseradish (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) with antimicrobial efficacy against pathogens. ***Plant, Soil and Environment***, **66**(7): 309-316.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., J., Shurigin, V., V., Hashem, A., Abd_Allah, E., F., 2017. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. ***Frontiers in Microbiology***, **8**: 1887.
- Fraenkel, G., S., 1959, The raison d'Etre of secondary plant substances, ***Science***, **129**(3361): 1466-1470.
- Fukushima, T., Allred, B., E., Sia, A., K., Nichiporuk, R., Andersen, U., N., Raymond, K., N., 2013. Grampositive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fesiderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, **110**: 13821–13826.
- Gardiner, D., T., Miller, R., W., 2004. Soils In Our Environment. ***Environmental Soil Science Fall***, 126-165.
- Gasser, I., Cardinale, M., Müller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., Kaddor, C., Steinbüchel, A., Berg, G. 2011. Analysis of the endophytic life style and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. ***Plant and Soil***, **347**: 125-136.
- Gorai, P., S., Ghosh, R., Mandal, S., Ghosh, S., Chatterjee, S., Gond, S., K., & Mandal, N., C., 2021. *Bacillus siamensis* CNE6-a multifaceted plant growth promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad spectrum antifungal activities and host colonizing potential. ***Microbiological Research***, **252**: 126859.
- Gray, E., J., Smith, D., L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. ***Soil Biology and Biochemistry***, **37**: 395-412.
- Guerinot, M., L., Meidl, E., J., Plessner, O., 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. ***Journal of bacteriology***, **172**(6): 3298-3303.
- Haas, H., 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. ***Applied microbiology and biotechnology***, **62**(4): 316-330.
- Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil borne pathogens by *Pseudomonads fluorescent*. ***Nature Reviews Microbiology***, **3**: 307-319.
- Hallmann, J., Qualt-Hallmann, A., Mahaffee., W., F., Kloepper, J., W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. ***Canadian Journal Microbiology***, **43**: 895-914.
- Haidar, B., Ferdous, M., Fatema, B., Ferdous, A., S., Islam, M., R., Khan, H., 2018. Population diversity of bacterial endophytes from jute (*Corchorus olitorius*) and evaluation of their potential role as bioinoculants. ***Microbiological Research***, **208**: 43-53.
- Hernlem B., J., Vane L., M., Sayles G., D., 1996, Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. ***Inorganic Chimica Acta***, **244**: 179–184.
- Hersman L., Lloyd T., Sposito G., 1995. Siderophore promoted dissolution of Hematite. ***Geochimica Cosmochimica Acta***, **59**: 3327–3330.
- Hider, R., C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. ***Natural product reports***, **27**(5): 637-657.

- Hofmann, M., Heine, T., Malik, L., Hofmann, S., Joffroy, K., Senges, C., H., R., Tischler, D., 2021. Screening for microbial metal-chelating siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms*, **9**(1): 111.
- Hofmann, M., Heine, T., Schulz, V., Hofmann, S., Tischler, D., 2020. Draft genomes and initial characterization of siderophore producing pseudomonads isolated from mine dump and mine drainage. *Biotechnology Reports*, **25**: 00403.
- Hu, Q., P., Xu, J., G., 2011. A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(25): 4321-4327.
- Jena, S., K., Rath, C., C., 2013. Optimization of culture conditions of phosphate solubilizing activity of bacterial sp. isolated from Similipal biosphere reserve in solid-state cultivation by response surface methodology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2**(5): 47-59.
- Jeong, J. J., Lee, D., W., Park, B., Sang, M., K., Choi, I., G., Kim, K., D., 2017. *Chryseobacterium cucumeris* sp. nov., an endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root, and emended description of *Chryseobacterium arthrosphaerae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **67**(3): 610-616.
- Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Kostovcik, M., Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P., F., García-Fraile, P., 2020. Selection of the root endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as plant growth promoter for *Brassica napus* L. crops. *Agronomy*, **10**(11): 1788.
- Kalinowski, B., E., Liermann, L., J., Brantley, S., L., Barnes, A., Pantano, C., G., 2000. X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**(8): 1331-1343.
- Kerry, B., R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, **38**: 423-441.
- Kloepper, J., W., Schippers, B., Bakker, P., A., H., M., 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*, **82**: 726-727.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., Kümmerli, R., 2020. Topluluk ve konukçu etkileşimlerinde bakteriyel sideroforlar. *Nature Reviews Microbiology* **18**: 152-163.
- Krewulak, K., D., Vogel, H., J., 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta*, **1778**: 1781-1804.
- Kumar, L., Nagar, S., Mittal, A., Garg, N., Gupta, V., K., 2014. Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. *Journal of Food Science and Technology*, **51**: 1737-1749.
- Lane, D., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
- Lin, S., Y., Hameed, A., Liu, Y., C., Hsu, Y., H., Hsieh, Y., T., Lai, W., A., Young, C., C. (2017). *Chryseobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from a maize leaf. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**(3): 570-575.
- Lodewyckx, C., Taghavi, S., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Van Der Lelie, D., 2001. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic

- bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, **3**: 173-187.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E., R., B., Taghavi, S., Mezgeay, M., Lelie, D., V., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**: 586-606.
- Luque-Almagro, V., M., Blasco, R., Huertas, M., J., Martínez-Luque, M., Moreno Vivían, C., Castillo, F., Roldán, M., D., 2005. Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions*, **33**: 168-9.
- Machuca, A., Milagres, A., M., F., 2003. Use of CAS- agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in applied microbiology*, **36**(3): 177-181.
- Madigan, M., Martinko J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11. Prentice Hall. ISBN: 0-13-144329-1, Prentice Hall, USA. 992.
- Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Tikhonovich, I., Lugtenberg, B., 2011. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial Endophytic strain from giant hogweed. *Microbial Biotechnology*, **4**:523-532.
- Malfanova, N., Lugtenberg, B., Berg, G., 2013. Bacterial Endophytes: Who and Where, and What Are They Doing There?. Chap. 36. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, (Editor: Frans J. De Bruijn). Wiley-Blackwell, New Jersey. 1328.
- Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J., D., Sánchez-Juanes, F., Rivas, R., Mateos, P., F., Santa Regina, I., Velázquez, E., 2021. Identification of Canola Roots Endophytic Bacteria and Analysis of Their Potential as Biofertilizers for Canola Crops with Special Emphasis on Sporulating Bacteria. *Agronomy*, **11**(9): 1796.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., Mengel, K., 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, **30**: 433 – 439.
- Matu, A., Nde, A., L., Oosthuizen, L., Hitzeroth, A., Badenhorst, M., Duba, L., Gidaga, M., Klinck J., Kriek, I., Lekoma P., J., Nel L., Menende dos Ramos, S., Rossouw, J., Salomane, N., Segone, N., Serobe, S., Tiyan, T., Hugo, C., J., Newman, J., D., 2019. Draft genome sequences of seven *Chryseobacterium* type strains. *Microbiological Research*, **8**(1): e01518-18.
- Mehnert, M., Retamal-Morales, G., Schwabe, R., Vater, S., Heine, T., Levicán, G. J., Tischler, D., 2017. Revisiting the chrome azurol S assay for various metal ions. *In Solid State Phenomena*, (Vol. 262, pp. 509-512). Trans Tech Publications Ltd.
- Mengel, K., 1994. Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and soil*, **165**(2): 275-283.
- Miethke M., Marahiel M., A., 2007, Siderophore-based iron acquisition and patho-gen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **71**: 413-451.
- Modi P., Kaur A., Kaur M., V., K., Kapoor, 2012, Siderophores: A Novel Approach for Iron Removal, *International journal of universal pharmacy and bio sciences*, **2**: 628-636.
- Neilands, J., B., 1981. Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry*, **50**(1): 715-731.
- Neilands, J., B., 1993. Siderophores. *Archives of biochemistry and biophysics*, **302**(1): 1-3.

- Neilands, J., B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(45): 26723-26726.
- Neubauer U., Nowack B., Furrer G., Schulin R., 2000, Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B, *Environmental. Science and Technology*, **34**: 2749–2755.
- Newton, C.R., 1995. *PCR: Essential data*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Payne, S., M., 1994. [25] Detection, Isolation, and characterization of siderophores. *Methods in enzymology*, **235**: 329-344.
- Petrini, L., E., Petrini, O., Laflamme, G., 1989. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. *Phytoprotection*, **70**: 97-103.
- Pillay, V., J., J., Nowak., 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Seedlings inoculated with a *Pseudomonad* bacterium. *Canadian Journal Microbiology*, **43**: 354-361.
- Ping, L., Boland, W., 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **9**: 263-266.
- Ratul, S., Nabaneeta, S., Robert, S., D., Lorelle, L., B., 2012. Microbial Siderophores. *Journal of Basic Microbiology*, **52**: 1-15
- Raymond, K., N., Dertz, E., A., Kim, S., S., 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 3584–3588.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*, **6**: 139-144.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**: 435-443.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2004. Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, **181**: 337-344.
- Rosenblueth, M., Martinez-Romero. 2006. E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 827-37.
- Ryan, R., P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D., J., Dowling, D., N., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, **278**: 1-9.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiology Research*, **183**: 92-99.
- Schalk, I., J., Hannauer, M., Braud, A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology*, **13**(11): 2844-2854.
- Schultze, M., Kondorosi, M., 2002. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, **32**: 33-35.
- Schwabe, R., Anke, M., K., Szymańska, K., Wiche, O., Tischler, D., (2018). Analysis of desferrioxamine-like siderophores and their capability to selectively bind metals and metalloids: development of a robust analytical RP-HPLC method. *Research in microbiology*, **169**(10): 598-607.

- Schwartz, A., R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C., W., Fujishige, N., A., Vijanderan, J., A., Hirsch, A., M., 2013. *Bacillus simplex*—a little known PGPB with anti-fungal activity—alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. ***Agronomy***, **3**(4): 595-620.
- Schwyn, B., Neilands, J., B., 1987, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, ***Analytical biochemistry***, **160**(1): 47-56.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. ***Molecular Plant Microbe Interactions***, **25**: 28-36.
- Shi, P., Xing, Z., Zhang, Y., Chai, T., 2017. Effect of heavy-metal on synthesis of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa* ZGKD3. In ***IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*** (Vol. 52, No. 1, p. 012103). IOP Publishing.
- Shurigin, V., Alaylar, B., Davranov, K., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S., D., Egamberdieva, D., 2021. Diversity and biological activity of culturable endophytic bacteria associated with marigold (*Calendula officinalis* L.). ***AIMS microbiology***, **7**(3): 336–353.
- Siciliano, S., Fortin, N., Himoc, N., 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. ***Applied and Environmental Microbiology***, **67**: 2469-2475.
- Sigel, H., Sigel, A., 1998. Metal Ions in Biological Systems, 35, M. Iron Transport and Storage in Microorganisms, ***Plants and Animals***. **5**(5): 262-262.
- Singh, P., Khan, A., Kumar, R., Kumar, R., Singh, V. K., & Srivastava, A., 2020. Recent developments in siderotyping: procedure and application. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, **36**(12): 1-15.
- Sinha, A., K., Parli Venkateswaran, B., Tripathy, S., C., Sarkar, A., Prabhakaran, S., 2019. Effects of growth conditions on siderophore producing bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. ***Journal of basic microbiology***, **59**(4): 412-424.
- Stackebrandt, E., Goebel, B., M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, **44**: 846- 849.
- Sun, X., Guo, L., D., 2012. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. ***Mycology***, **3**(1): 65-76.
- Tindall, B., J., Rosselló-Móra, R., Busse, H., J., Ludwig, W., Kämpfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **60**(1): 249-266.
- Tseng T., T., Gratwick K., S., Kollman J., Park D., Nies D., H., Goffeau A., Saier M., H., 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. ***Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology***, **1**: 107-125.
- Van Aken, B., Peres, C., Doty, S., Yoon, J., Schnoor, J., 2004. *Methylobacterium populi* sp. Nov., a novel aerobic, pink pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilising bacterium isolated from poplar trees (*Populus Deltoides X Nigra* DN34). ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***. **54**: 1191-1196.

- Varma, A., Chincholkar, S., B., 2007. Soil biology, Volume 12:Microbial siderophores.
- Yen, K., M., Karl, M., R., Blatt, L., M., Simon, M., J., Winter, R., B., Fausset, P., R., Lu, H., S., Harcourt, A., A., Chen, K., K., 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. ***Journal of Bacteriology*, 173(17): 5315-5327.**
- Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R., and Berg, G., 2010. Strain-specific colonization pattern of Rhizoctonia antagonists in the root system of sugar beet. ***FEMS Microbiology Ecology*, 74: 124-35.**
- White, R., E., 2006. Principles and Practice of Soil Science: The Soil as a Natural Resource. **4th Edition, Wiley-Blackwell Scientific Publication, London, United Kingdom.**
- Wiche, O., Tischler, D., Fauser, C., Lodemann, J., Heilmeier, H., 2017. Effects of citric acid and the siderophore desferrioxamine B (DFO-B) on the mobility of germanium and rare earth elements in soil and uptake in *Phalaris arundinacea*. ***International journal of phytoremediation*, 19(8): 746-754.**
- Winkelmann, G., 1979. Surface iron polymers and hydroxy acids. A model of iron supply in sideramine-free fungi. ***Archives of Microbiology*, 121(1): 43-51.**



ÖZ GEÇMİŞ

Şilan ATBAŞ, ilk ve orta öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2014 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2017-2018 öğrenim döneminde aynı bölümden ziraat mühendisi olarak mezun oldu. 2018 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa kabul edildi.



VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 27/06 /2022

Tez Başlığı / Konusu: **ÇEŞİTLİ TEK YILLIK BİTKİLERDEN İZOLE EDİLMİŞ OLAN ENDOFİT BAKTERİLERDE SİDEROFOR ÜRETİM POTANSİYELLERİ**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 50 sayfalık kısmına ilişkin, 27/06/2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %11 (yüzde on bir) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Materyal ve yöntem hariç,
- Kaynaklar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Şilan ATBAŞ
27/06/2022

Adı Soyadı: Şilan ATBAŞ
Öğrenci No: 18910001092
Anabilim Dalı: Tarımsal Biyoteknoloji
Programı: Tarımsal Biyoteknoloji
Statüsü: ☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAY
UYGUNDUR

Dr.Öğr.Üyesi Bilgin TAŞKIN