T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AZOTU FİKSE EDEN *AZOTOBACTER* TÜRLERİNİN BUĞDAY RİZOSFERLERİNDEN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Sevda BİCEK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.1. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler (PGPR) 3
2.2. *Azotobacter*'in Azot Bağlaması 4
2.3. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Diğer Özellikler 6
2.4. *Azotobacter*'in Bitki Büyüme ve Verimine Etkileri 8
2.5. Buğdayın Önemi 8
2.6. Biyofilm 9
3.MATERYAL ve YÖNTEM 14
3.1. *Azotobacter* Türlerinin İzolasyonu ve Morfolojik Tanımlanması 14
3.2. Biyokimyasal Tanımlanması 14
3.2.1. Karbon kaynağının belirlenmesi 14
3.2.2. Oksidaz aktivitesinin belirlenmesi 15
3.2.3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi 15
3.2.4. Nitrat redüktaz aktivitesi 15
3.3. *Azotobacter* Türlerinin Moleküler Tanımlanması 15
3.3.1. Genomik DNA ekstraksiyonu 15
3.3.2. 16. S ribozomal RNA gen bölgesinin amplifikasyonu 16
3.3.3. Sekans analizi 17
3.3.4. Filogenetik analizler 17
3.4. *Azotobacter* Suşlarının Özellikleri 19
3.4.1. Tuza dayanıklılık testi 19
3.4.2. Azotu fikse edebilme aktivitesinin belirlenmesi 19
3.4.3. Biyofilm oluşumu 19
3.5. İstatistik Analizleri 20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 21
4.1. *Azotobacter* Türlerinin İzolasyonu, Biyokimyasal Tanımlanması 21
4.2. *Azotobacter* Türlerinin Moleküler Tanımlanması 22
4.3. *Azotobacter* Suşlarının Özellikleri 25
4.3.1. Tuza dayanıklılık 25
4.3.2. Azot fiksasyonu 26
4.3.3. Biyofilmin meydana gelmesi 27
4.3.3.1. Tuzun biyofilm üzerine etkisi 28
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 32
5.1. Sonuçlar 32
5.2. Öneriler 33
KAYNAKLAR 35
ÖZGEÇMİŞ 43

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AZOTU FİKSE EDEN *AZOTOBACTER* TÜRLERİNİN BUĞDAY RİZOSFERLERİNDEN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Sevda BİCEK

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sedat ÇAM
Yıl:2021, Sayfa:43

Şanlıurfa yöresinde yetişen buğday bitkisinin rizosferinde gelişen havada ki serbest azotu bağlayan Azotobacter türlerinin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlanması yapılarak tür çeşitliliğini araştırıldı ve invitro koşullarda izole edilen türlerin; bitki büyümesini teşvik eden özellikleri belirlendi ve biyogübre olarak kullanılabilme potansiyelleri incelendi. 2019-2020 yılları arasında Şanlıurfa bölgesinde üç farklı tarladan 35 buğday (*Triticum aestivum L.*) rizosferinden toprak örnekleri izole edilmiştir. Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler incelemeleri sonucunda 4 farklı *Azotobakter* türü ve 18 suş tespit edilmiştir. Maximum likelihood, maximum parsimony ve bayesian filogenetik analizleri sonucunda, bu 18 suşun, yedisi *A. chroococcum*, altısı *A. beijerinckii*, üçü *A. tropicalis* ve ikisi *A. vinelandii* türleri olarak tanımlanmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmalarında suşların tuza dayanıklılıkları, azotu bağlayabilme ve biyofilm oluşturma yetenekleri test edilmiştir. *Azotobacter* türlerinin farklı NaCl konsantrasyonlarına farklı seviyeler de tolerans göstermiştir. Bütün suşlar %2 tuz konsantrasyonuna dayanıklılık göstermiştir. En az dayanıklılığı *A. beijerinckii* suşları göstermiştir. En yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklılığı *A. chroococcum* suşları göstermiştir. Bütün suşlar azot fikse edebilme yeteneği sergilemiştir. En yüksek azot fiksasyonu *A. chroococcum* suşlarında gözlenmiştir. Test edilen suşlar farklı seviyelerde biyofilm oluşturmuşlardır. En yüksek biyofilm oluşumu *A. chroococcum* ve *A. vinelandii* suşları arasında gözlenirken, en düşük seviyede biyofilm oluşumu *A. beijerinckii* suşlarında gözlenmiştir. Yüksek düzeyde biyofilm oluşturan 8 suşun, farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu incelenmiştir. Çalışmamız da, rizobakterilerin artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı seviyelerde biyofilm oluşturdukları gözlenirken bazı suşlar da tuzun biyofilm oluşumuna bir etki göstermediği gözlemlenmiştir. *A. chroococcum* (SBS2, SBS4, SBS12) izolatlarında %8'e varan tuz konsantrasyonlarına bağlı biyofilm miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (tek yönlü ANOVA; $P<0.05$). Bazı suşların artan tuz konsantrasyonlarda yüksek seviyelerde biyofilm oluşturma özelliklerinden dolayı, bitkilerin gelişimini ve tuza karşı toleranslarını artırmak için diğer PGPR özellikleri test edildikten sonra aşılama yoluyla kullanılabilirler.

ANAHTAR KELİMELER: Rizobakteriler, PGPR, *Azotobakter, Triticum aestivum L,* biyofilm

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATİON AND MOLECULAR CHARACTERİZATİON OF NİTROGEN-FİXİNG *AZOTOBACTER* SPP. FROM WHEAT RHİZOSPHERE

Sevda BİCEK

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Dr.Öğr. Üyesi Sedat ÇAM
Yıl:2021, Sayfa:43

Nitrogen that can be reduced in the rhizosphere of the cultivation plant grown in Şanlıurfa region, Azotobacter traceable morphological, biochemical and analysis sample species were investigated and in vitro targeted species; He could examine those that had been identified as suitable for children and could be used as biofertilizers. Soil samples were isolated from 35 wheat (*Triticum aestivum L.)* rhizospheres from three different fields in Şanlıurfa region between 2019-2020. As a result of morphological, biochemical and molecular analyzes, 4 different *Azotobacter* species and 18 strains were identified. Maximum likelihood, maximum parsimony, and bayesian phylogenetic analyzes revealed that seven of these 18 strains were identified as *A. chroococcum*, six as *A. beijerinckii*, three as *A. tropicalis*, and two as *A. vinelandii.* In the laboratory studies, the salt resistance, nitrogen fixation and biofilm formation abilities of the strains were tested. *Azotobacter* species showed varying degree of tolerance to different NaCl concentrations. All strains were resistant to 2% salt concentration. *A. beijerinckii* strains showed the least resistance whereas *A. chroococcum* strains showed the highest resistance. All strains exhibited the ability to fix nitrogen. The highest nitrogen fixation was observed in *A. chroococcum* strains. The tested strains formed different levels of biofilms. While the highest biofilm formation was observed between *A. chroococcum* and *A. vinelandii* strains, the lowest biofilm formation was observed in *A. beijerinckii* strains. Biofilm formation of 8 strains exhibiting higher biofilm formation at different salt concentrations was investigated. In this study, it was observed that some rhizobacteria formed different levels of biofilms depending on increasing salt concentrations, while salt did not have an significant effect on biofilm formation in other strains. There was a statistically significant increase in the amount of biofilm due to salt concentrations up to 8% in *A. chroococcum* (SBS2, SBS4, SBS12) isolates (one-way ANOVA; $P<0.05$). Due to the high biofilm formation properties of some strains at increasing salt concentrations, they can be used by inoculation after testing other PGPR properties to increase plant growth and salt tolerance.

KEY WORDS: Rhizobacteria, PGPR, *Azotobacter*, *Triticum aestivum L*, biofilm

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, başlama kademesinde ve adım adım ilerleyen çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım gerekli ilgi ve desteğini gördüğüm değerli danışmanım Sedat ÇAM'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında beni cesaretlendiren, çalışmamda en büyük yardımı olan ve maneviyatını hiçbir zaman esirgemeyen Veteriner Hekim Halil AYHAN'a, emeği ve manevi olarak her an yanımda hissettiğim değerli dostum doktora öğrencisi Özge ALİM'e çabalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen isimlerini tek tek sayamadığım bütün destekleyenlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında cihaz ve laboratuvar olanaklarından faydalandığım edindiğim tüm mesleki tecrübe ve birikimleri bünyesinde kazandığım Harran Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na gerek vermiş oldukları manevi destek gerekse yardımlarıyla en verimli şekilde faydalanmamı sağlayan hocalarıma, yönetimine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca elini benden hiçbir zaman çekmeyen, bana vermiş oldukları eğitim ve anlayışla eğitimin en büyük sermaye olduğu bilinciyle beni yetiştiren ve hayatım boyunca hiçbir fedakarlığı benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Diazotroflarla azot fiksasyonu (*Azotobacter spp.)*……..6
Şekil 2.2. Biyofilm gelişim aşamaları…… 10
Şekil 3.1. Bazı *Azotobacter* türlerine ait amplifiye olmuş PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....17
Şekil 4.1. 16S rRNA gen dizilerine bağlı maximum likelihood filogenetik analiz. 23
Şekil 4.2. 16S rRNA gen dizilerine bağlı maximum parsimony filogenetik analiz. 23
Şekil 4.3. 16S rRNA gen dizilerine bağlı bayesian filogenetik analiz. 24
Şekil.4.4. Farklı NaCl konsantrasyonlarda *Azotobacter* suşları tarafından oluşturulan biyofilm oluşumu…….....29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Buğday rizosferinden izole *Azotobacter* türlerinin biyokimyasal analizleri…….....21
Çizelge 4.2. Buğday rizosferlerinden izole edilen *Azotobacter* türlerinin 16S ribozomal gen bölgesinin genetik çeşitliliği…….....25
Çizelge 4.3. Buğday rizosferlerinden izole edilen *Azotobacter* türlerinin tuza dayanıklılığı, azot fiksasyonu ve biyofilm yetenekleri…….....26

1. GİRİŞ

Plansız kentleşmeden kaynaklanan tarım arazilerin daraltılması, hızla büyüyen Dünya nüfusuna artan gıda talebi ve diğer kültürel zorluklardan dolayı tahıl üretim miktarlarında azalmalar meydana gelmektedir. Bitkisel olarak üretilen besinlerin ve biyosferin yapısını bozacak toksiklerin kontrol edilmesinde tecrübesiz olarak kimyasal gübre ve pestisit kullanılması sonucunda toprak yapısının, toprağın verimliliğinin bozulmasına, çevre kirlenmesine, patojen ve bitki gelişmesinde zararlı bitki popülasyonlarının meydana gelmesine neden olmaktadır (Saber, 2001; Bockman, 1997). Tarım ürünü olarak kullanılan kimyasal maddelerin ekosistemlerde zaruri olan miktardan fazlasının ya da sürekliliğinin olması durumunda türlerin biyotik toplumda sürdürülebilirliği sağlanamamaktadır. Bulunduğumuz çağda tarımsal ekosistemlerinde birçok zehirli madde ve tehlikeli kimyasal madde bulunmaktadır. Bu seçenekler bitkilerin yapısına, toprağın yapısına, yüzeydeki sulara ve yeraltı sularına ve gıdalara bulaşmaktadır. Yaşadığımız gezegende yeterli miktarda ve nitelikli besin temininin sömürücü ve kirletici tarımla sağlanamayacağı kaygısı ortaya çıkmaktadır. Tarım ürünlerinin yapısına katılım sağlayan kimyasal maddelerin kullanılmasıyla tarımda meydana gelen seri üretimdeki artış azalmaktadır (Çakmakçı, 2004). Bundan dolayı ürün miktarının artışıyla gıda güvenliliğinin sağlanması önem arz etmektedir. Ürün miktarının artışında ve toprağın verimliliğinin artırılmasında çok yaygın kullanılan metotların başında kimyasal gübreler yer almaktadır. Kimyasal gübreleme şüphesiz toprağın verimliliğini artırır ve bitkinin büyümesine katkı sağlar; fakat pahalı olmasının yanı sıra çevreye ve toprağa önemli kimyasal, biyolojik zararları olmasından dolayı biyolojik gübre kullanımı alternatif bir uygulama olmuştur (Boyd ve Massaut, 1999; Chen, 2006; Ahmad ve ark., 2008; Karthick Raja Namasivayam *ve* ark., 2014).

İran'da yapılan bir çalışmada, kimyasal gübrelemenin tarım arazilerinin ve su kaynaklarının tuzlanmasına ve kirliliğine sebep olduğu belirtilmiştir (Biari *ve ark.*, 2008). Diğer birçok çalışmalar da kimyasal gübrelemenin zararlarını vurgulamışlardır (Shamrukh ve ark., 2001; Li ve Wu, 2008; Savci, 2012; Wang ve ark., 2018; Savari ve Gharechaee, 2020). İlaveten, kimyasal gübrelerin çevreye, yer altı sularına ve hava kirliliğine sebep olduğundan dolayı, Dünya'nın farklı yerlerinde çok sayıda tarımcı

kimyasal gübrelemenin yerini biyolojik gübreye bırakmıştır (Cherif-Silinive ark., 2016). Biyolojik gübre içeren organik preparatlar özellikle besin arzı bakımından tarım için faydalıdır. Biyolojik gübreler N fiksasyonu ve kaya fosfatı çözündürme gibi biyolojik süreçlerden, N ve P gibi önemli elementleri kullanılabilir forma çevirebilme yeteneği olan farklı türde canlı hücreler içeren ürünlerdir. Tohum olarak veya fide kökü dibine uygulandığında, hızla çoğalırlar ve rizosferde yoğun bir popülasyon geliştirirler.

Rizosfer, bitkilerin köklerini çepeçevre saran bölgede topraktaki mikroorganizma popülasyonlarının yoğunlaştığı bölgedir. Rizosfer tanımında anlaşılacağı üzere mikroorganizma populasyonlarının yoğun olduğu bölgelerdir. Toprakta bulunan fizyokimyasal olaylar tamamen bu mikroorganizmalara sadık olarak meydana gelmektedir Bu kökleri çepeçevre saran rizosfer bölgesine koloni şeklinde organize olan bakterilere ise rizobakteri adı verilmektedir. Rizobakterilerde bulunan ufak moleküller rizosferde bulunan mikroorganizmalar aracılığı ile karbon ve azot kaynağı olarak metabolize olabilmektedir. Moleküler olarak büyümesi ve gelişimi için bitkinin yapısına geri alınabilmektedir. Bitkinin kökleri ile lişki halinde bulunan, bitkinin büyümesini ve gelişmesini pozitif doğrultuda etkileyebilen yapılar bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak bilinmektedir. PGPR'lerin en can alıcı kavramlarından birkaçı atmosferde bulunan serbest azotu elementini bağlaması organik halde bulunan fosforu çözmesi, bir takım sekonder(ikincil) metabolitleri meydana getirmesi, sistemik olarak bitkiye dayanıklık sağlar, yer ve gıdanın yarısı ile pestilential etmenleri baskılayabilmesidir. Literatür de PGPR'leri birtakım ayırt edici hususları karakterize edilmiştir. Bunlar; Kök yüzeyini kolonize edebilmelidirler, Popülasyonlarını devamlılığını sağlamalı, üremesini artırmalı ve öteki mikroorganizmalarla yarışarak bitkinin gelişmesini teşvik etmeli ya da bitkiyi zararlıların saldırısına benzer stres etmenlerine karsı koruyuculuk sağlayabilmeli, Bitkiyi olumlu yönde gelişmesini sağlamalıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakteriler (PGPR)

Bitki büyümesini destekleyen rizobakteriler, fosfat çözündürme, siderofor üretimi, biyolojik nitrojen fiksasyonu, rizosfer mühendisliği, quorum sensing (QS) sinyal interferansı ve zararlı biyofilm oluşumunun inhibisyonu, bitki hormonlarının üretimi, antifungal aktivite sergileme, uçucu yapısal bileşiklerin üretimi, sistemik direncin indüksiyonu, yararlı bitki-mikrop ortak yaşamlarının teşvik edilmesi, patojen zehir üretimine müdahale gibi çok çeşitli mekanizmalarla bitki büyümesini artırabilen rizosfer bakterileridir (Bhattacharyya ve Jha, 2012). PGPR'nin zirai potansiyeli, kimyasal yapıda gübre, böcek ilacı ve sair takviyelerin yerini almanın elverişli bir yolunu sunduğundan, giderek artmaktadır. Bitkilerin genel morfolojisini dolaylı olarak etkileyen bu rizosfer mikroorganizmalar tarafından büyümeyi teşvik eden maddelerin büyük miktarlarda üretilmesi muhtemeldir. PGPR izolatlarının çoğu, patates, domates, mısır, buğday vb. gibi çeşitli tarımsal ürünlerdeki bitki boyunu, kök uzunluğunu ve kuru madde üretimini önemli ölçüde artırır (Bhattacharyya ve Jha, 2012). Sürdürülebilir tarım sistemlerinde stabil antagonistik PGPR formülasyonlarının geliştirilmesi, kimyasal gübre kullanımının yerini alan başka bir umut verici yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Bitki kök hücreleriyle ilişki derecelerine göre, PGPR'ler hücre dışı bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (ePGPR) ile hücre içi bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (iPGPR) olarak bölümlendirebiliriz (Martínez-Viveros ve ark., 2010). EPGPR'ler rizosferde, rizoplanın üzerinde veya kök korteks hücreleri arasındaki boşluklarda mevcut olabilirlerken; iPGPR'ler genellikle kök hücrelerin özelleşmiş nodüller yapılarının içine yerleşirler.

Bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin daha çok *Azotobacter, Acinetobacter, Azospirillum, Bacillus, Rhizobium, Serratia, Micrococcus, Burkholderia, Enterobacteria, Xanthomonas ve Pseudomonas* cinslerine ait olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2008). *Azotobacter* türleri gram negatif, aerobik olarak toprakta serbest yaşayan kalın duvarlı kistler oluşturan oval veya küresel, heterotrofik serbest

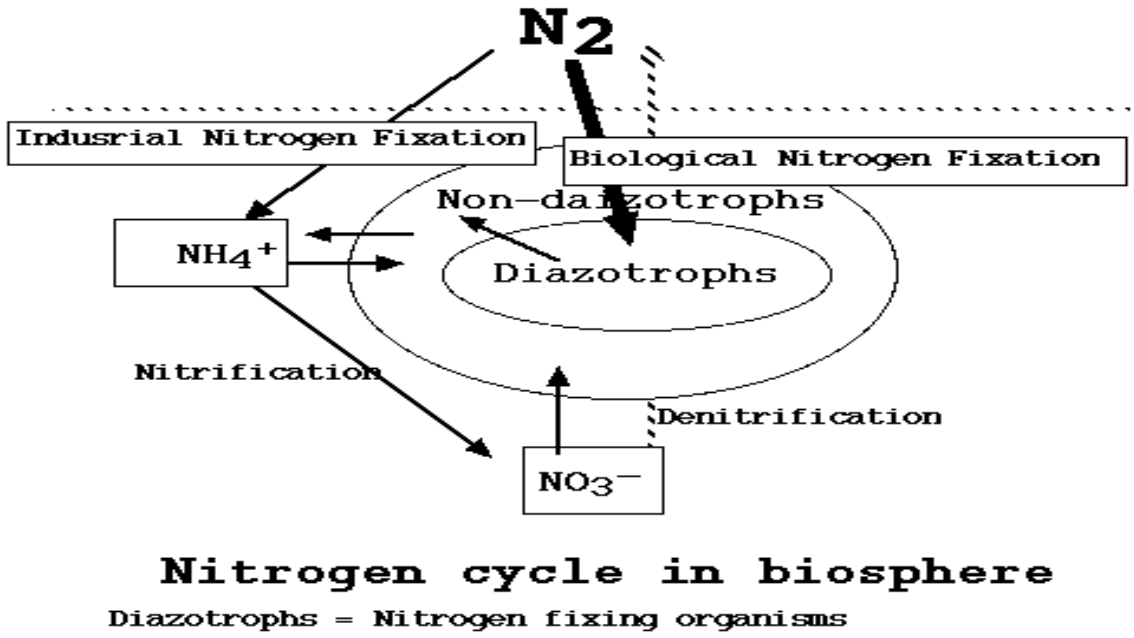
yaşayan nitrojen sabitleyen, esas olarak nötr veya alkali topraklarda yaşayan bakterilerdir. *Azotobacter*'ler hücre dışı bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler grubun içinde yer almaktadır. *Azotobacter* cinsi, 1901 yılında Hollandalı mikrobiyolog ve botanikçi Beijerinck tarafından keşfedilmiştir (Ojha ve Marahattha, 2015). Daha sonra ki yıllarda *A. vinelandii, A. chroococcum, A. armeniacus, A. beijerinckii, A. nigricans, A. paspali, A. salinestris* ve *A. tropicalis*gibi birkaç türü daha keşfedilmiştir (Jiménezveark., 2011; Özen ve Ussery, 2012; Chen ve ark, 2018). En yaygın türü *A. chroococcum*'dur (Mahato ve ark., 2009). Proteobacteria'nın γ-alt sınıfına ait olan bu azot bağlayıcı bakteriler ekoloji ve tarım için önemlidir.

2.2. *Azotobacter*'in Azot Bağlaması

Azotobacter, hücre protein sentezi için atmosferik nitrojen gazını kullanır. Bu hücre proteini daha sonra bu hücrelerinin ölümünden sonra toprakta mineralize edilir ve böylelikle mahsul bitkilerinin nitrojen mevcudiyetine katkıda bulunur (Ojha ve Marahattha, 2015). *Azotobacter* türleri topraktaki bitkiler üzerinde faydalı etkilere sahiptir, ancak bu bakterilerin bolluğu toprağın fiziko-kimyasal (örn. organik madde, pH, sıcaklık, toprak nemi) ve mikrobiyolojik özellikleri gibi birçok faktöre bağlıdır (Kizilkaya, 2009). Bolluğu toprak profilinin derinliğine göre de değişkenlik gösterir (Abd-el-Malek ve ark.,1979). *Azotobacter* türünün pirinç, mısır, buğday gibi birçok tahıl bitkilerinin rizosferinde yaşadığı ve havada ki serbest azotu bağladığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Yanni ve Abd El-Fattah, 1999; Ahmad ve ark., 2008; Chen ve ark, 2018). Bütün *Azotobacte*r türleri havada ki azotu fikse etme yeteneğine sahip değildirler ve her türün azot bağlama kapasitesi türden türe farklılık göstermektedir (Sahoo *ve ark.*, 2014; Chen ve ark., 2018; Nag ve ark., 2018). Pirinç bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, *Azotobacter*'in hektar başına 11-15 kg azot bağladığı gözlemlenmiştir ve böylece ürün hâsılatını %20' ye varan oranda artırdığı rapor edilmiştir (Yanni ve Abd El-Fattah, 1999). İlaveten, aşırı azot içeren kimyasal gübrelerin ürün kalitesi ve hâsılatı düşürücü ve çevreyi kirletici etkisinin azaltılması da mümkün olduğu vurgulanmıştır (Deng ve ark.,2014). *Azotobacter* türleri asidik pH, yüksek tuzlar ve sıcaklığa karşı duyarlıdır (Ojha ve Marahattha, 2015). *Azotobacter*, bitki büyümesi ve verimi üzerinde, biyolojik olarak aktif maddelerin biyosentezi,

rizosferik mikropların uyarılması, fitopatojenik inhibitörler üreterek faydalı etkilere sahiptir (Lenart-Boron, 2011) ve ayrıca besin alımının modifikasyonu ve nihayetinde biyolojik nitrojen fiksasyonunun artırılmasında önemli etkileri vardır (Somers ve ark., 2004).

Azot; protein, nükleik asitlerin ve klorofilin önemli bir bileşenidir. Böylece bitkiye azot verilmesi, oluşan protein, amino asit, protoplazma ve klorofil miktarını etkileyecektir. Bu nedenle, mahsulde yüksek verim potansiyeline ulaşmak için yeterli nitrojen kaynağı gereklidir (Ojha ve Marahattha, 2015). Atmosfer, bitkiler tarafından direkt olarak kullanılamayan formda, ~%78 nitrojenden oluşur. Bu nitrojenin mevcut forma dönüştürülebilmesi için endüstriyel işlem veya biyolojik azot fiksasyonu yoluyla sabitlenmesi gerekmektedir (Şekil 2.1.). Bu nitrojen sabitleyiciler olmadan, bu gezegende yaşam zor olabilir. Nitrojen (N) eksikliği, mahsul üretimi için sıklıkla önemli bir sınırlayıcı faktördür (Dong ve ark., 2012). Azot, tarımsal açıdan önemli mahsullerin verimini artırmak için genellikle N-gübresi olarak uygulanan temel bir bitki besin maddesidir. N-gübrelerin kullanımını önlemek veya azaltmak için önemli bir alternatif; birçoğu agronomik ve ekolojik öneme sahip birçok bitki türünün büyümesini ve verimini artırabilen bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin kullanılması olabilir.



Şekil 2. 1.Diazotroflarla azot fiksasyonu (*Azotobacter* spp.) (Wani *ve ark.,* 2016)

2.3. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Diğer Özellikler

Azotobacter'ler azot fiksasyonunun yanı sıra, büyüme hormonları, vitaminler, antibakteriyel ve antifungal bileşikler ve sideroforlar gibi çeşitli mekanizmalarla direkt veya dolaylı yollarla bitkilere ve rizobakterilere yarar sağlayabilirler.

Fosfor, bitkilerdeki en önemli besin gereksinimlerinden biridir. Topraklarda büyük fosfor (P) rezervuarı olabilir, ancak bitkiler için mevcut olan miktarlar genellikle bu toplamın küçük bir kısmıdır. Bitkiler için fosforun bu düşük mevcudiyeti, toprak P'nin büyük çoğunluğunun çözünmez formlarda bulunmasından kaynaklanır. Bitkiler fosfatı yalnızca iki çözünür formda, (monobazik ($H_2PO_4^-$) ve diyabazik (HPO_4^{2-}) iyonları absorbe edebilirler (Bhattacharyya ve Jha, 2012). Organik asitlerin ve enzimlerin üretimi için, *Azotobacter* gibi bazı yararlı rizobakteriler topraktaki fosfatı bitkinin kullanabileceği forma getirerek bitkinin fosfor ihtiyacını karşılamaktadırlar (Kumar ve Narula, 1999).

Azotobacter'ler bitki büyüme hormonlarından indol asetik asit (oksin), giberellin, etilen, sitokinin gibi hormonlar salgılayarak bitkinin büyümesini teşvik edici özelliklere sahiptirler (Ahmad ve ark., 2005; Hayat ve ark., 2010; Sahoo ve ark., 2014). Bir *A. chroococcum* suşunda giberellin benzeri üç madde tespit edilmiştir. Miktar, 14 günlük kültürde 0.1 ile 1 ug/mL arasındaydı (Brown ve Burlingham, 1968). Bu hormonlar kök yüzeyindeki rizosferden kaynaklanır ve bitkilerin büyümesini etkilerler. Hormonlar, fosfotaz aktivitesini artırarak besin alımını etkilerler (Höflich ve ark., 1994), su ve mineral alımını artırırlar (Bashan ve Levanony, 1991), amino asitlerin yanı sıra biyolojik olarak aktif maddeler olan vitaminlerin üretimini artırırlar. *Azotobacter* ayrıca B12 vitamini, tiamin, riboflavin, piridoksin, biyotin, siyanokobelamain, panthotenik asit ve folik asit gibi bazı ekstra hücresel maddeler de üretirler (Vikhe, 2014).

İz metallerin, özellikle de Fe'nin mevcudiyeti birçok ortamda mikrobiyal büyümeyi sınırlar. Bu sınırlamayla başa çıkmak için yaygın bir strateji; sideroforların, yani demirin üreten organizmaya verilmesine yardımcı olan küçük moleküllerin üretimidir (Hider ve Kong, 2010). *Azotobacter* spp. toprakta bulunan bitki patojenler ile savaşmak için demir molekülünü bağlayan sideroforlar oluşturmaktadır ve böylece zararlı mikroorganizmaların rizosferde barınmasını engelleyerek bitkinin daha sağlıklı gelişmesine katkı sağlamaktadır (Vessey, 2003). Ayrıca, birçok bitki patojenine karşı savaşmak için antifungal bileşikler de üretirler (Chen, 2006).

Birçok *Azotobacter* suşunun, mikrobiyal organizmaların metabolizmasında rol oynayan pigmentler ürettiği bildirilmiştir. Örneğin, *A. chroococcum* koyu kahverengi suda çözünür bir pigment melanin oluşturur. Bu süreç, nitrojenin sabitlenmesi sırasında yüksek metabolizma seviyelerinde meydana gelir ve nitrojen fiksasyon sistemini oksijenden koruduğu düşünülmektedir (Shivprasad ve Page, 1989).

Birçok *Azotobacter* suşu, farklı karbon ve azot kaynakları kültür ortamında yetiştirildiğinde amino asit oluşturma yeteneğine sahiptirler (Gonzalez-Lopez ve ark., 2005). Bu rizobakteriler tarafından üretilen amino asit gibi maddeler, bitkilerde üretilen büyümeye katkı sağlayan birçok işlemde yer alır. *Azotobacter* ile aşılanmış bitkilerde klorofil, nitrojen, fosfor, potasyum ve protein içeriğinin biyokimyasal

analizi, aşılanmamış kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur (Naseri ve ark., 2013).

2.4. *Azotobacter*'in Bitki Büyüme ve Verimine Etkileri

Azotobacter aşılanan bitkilerde, bitkiye bağlanan azot ve bitki büyüme düzenleyicisi benzeri maddeler tarafından yaprak, kök, dallanma, çiçeklenme ve meyve verme gelişimi uyarılır. *Azotobacter*'ler, hızlı çoğalabildiği ve yüksek seviyede azot fiksasyonu sağladığı için bitkilerin aşılanması ve azot fiksasyonu çalışmalarında kullanılırlar. *Azotobacter*'in tohum aşılaması sonucunda, mahsullere nitrojen sağlayarak verimin artmasına büyük katkıda bulunduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. *Azotobacter* ile aşılanan tohum, buğdayda Fe ve Zn gibi mikro besinlerle birlikte N, P alımına yardımcı olduğunu ve bu türlerin buğday beslenmesini iyileştirmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (S. Rajaee ve ark., 2007). Biyolojik gübre uygulaması, yaprak sayısını, bitki yaprak ağırlığını, kafa uzunluğu ve genişliğini, bitki başına brüt ve net ağırlığını, hektar başına düşen verimi önemli ölçüde artırmıştır (Wani ve ark., 2016). Azot eksikliği olan kumda tohum aşılaması, toprak nitrojeninde artışa ek olarak, bitki uzunluk, kuru ağırlık ve nitrojen içeriğinde de artışlar gözlenmiştir (Monib ve ark., 1979). *A. chroococcum*'un 10^8 CFU ml^{-1} konsantrasyonunda salatalıkta tohum çimlenmesini artırdığı gözlenmiştir (Salhia, 2013). *Azotobacter* türleri minimum 10 mg N/g karbonhidratı sabitleyebilir ve pirinçte toplam nitrojen ihtiyacının %19-47'sini karşılayabilirler (Choudhury ve Kennedy, 2004; Tejera ve ark., 2005). *A.chroococcum* suşları tarafından aşılanan buğday tohumunlarında, bütün suşların buğdayın verim ve nitrojen konsantrasyonunun üzerine pozitif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Kızılkaya, 2008). Bir başka çalışmada, biyolojik gübre olarak *Azotobacter*, domates tohum çimlenmesi ve belirtilen tüm bitki büyüme parametreleri ile ilgili olarak inorganik gübreden daha iyi verim sağladığı rapor edilmiştir (Mahato ve ark., 2009).

2.5. Buğdayın Önemi

Buğday Dünya genelinde gıda kaynağı olarak en fazla ekilen ve besin kaynağı olarak işlenen üründür (Atar, 2018). Özellikle ılıman iklime sahip bölgelerde buğday,

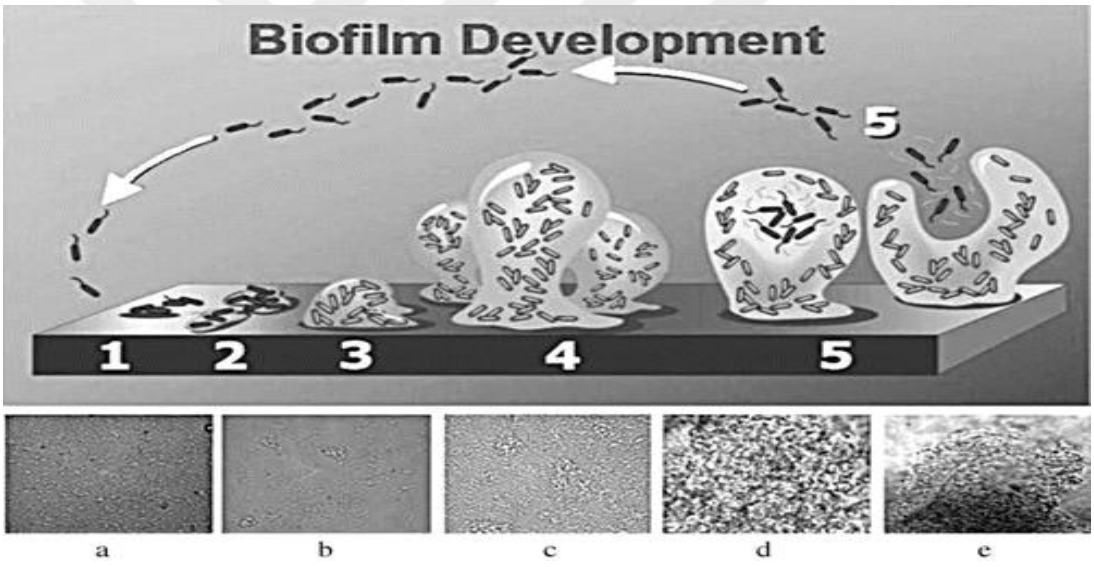
insanların ve çiftlik hayvanların temel besin kaynağıdır. Buğdayın temel besin kaynağı olma nedeni; kısmen adaptasyon yeteneği ve yüksek verimine bağlıdır. Günümüzde Hindistan'ın kuzeyi, Avrupa'nın batısı, Rusya, Mısır ve İskandinav ülkelerinin bulunduğu bölgelerde, yaşamını sürdüren insanlar tarafından değişmez besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Dünya'da canlı gıdası olarak buğdaya olan istek, iklimleri buğday üretmeye ve elverişli yetiştirme şekline sahip olmayan ülkeleri de içine aldığında giderek fazlalaşmaktadır. Bunda batı tarzı gıda alışkanlıklarının gün geçtikçe daha fazla benimsenmesi rol oynamaktadır. Mineral moleküller ve B vitamini de içinde olmak üzere buğday; mikro besin maddelerince oldukça bol olup küresel nüfusun enerji gereksiminin %20'sini karşılamaktadır (Cummins ve Roberts-Thomson, 2009).

2.6. Biyofilm

Bakteriyel biyofilmler, kendi ürettiği bir polimerik matris içine yerleştirilmiş ve cansız veya canlı bir yüzeye yapışan yapılandırılmış bir bakteri hücresi topluluğudur (Costerton ve ark., 1999). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, olumsuz şartlarda hayatta kalmak ve besin açısından zengin ortamlara dağılmak için yeni biyofilm mimarileri kurmaktadır. Biyofilmler; hem arke hem de bakteri soylarındaki çeşitli mikroorganizmaların koruyucu bir büyüme modudur (Hall-Stoodley ve ark 2004).

Bir biyofilm oluşturmanın ilk adımı, cansız veya canlı yüzeylere bakteriyel bağlanma işlemidir (Şekil 2.2.). Cansız yüzeylere yapışma genellikle spesifik olmayan etkileşimlerle (elektrostatik, hidrofobik) sağlanır. Mikroorganizmalar, yüzeylere gevşek bir şekilde bağlanmak için ya rastgele su akışı ya da kemotaksis ile yakın bir yerde mevcut bir yüzeye ulaşmalıdır, daha sonra yüzeylere bağlı mikrobiyal hücreler arasında ekzopolisakkarit üretimi ile geri dönüşü olmayan bağlanma gerçekleşir (Dunne, 2002). Mikrobiyal hücrelerin yüzeylere geri döndürülemez şekilde bağlanmasından sonra, biyofilm çoğalması ve mevcut besinleri kullanmak için en uygun şekilde yapılandırılmış mikrobiyal hücreleri saran hücre dışı dinamik polimerik matrisin oluşturulmasıyla olgunlaşır (Sutherland, 2001; Joo ve Otto, 2012). Bir biyofilmin ana matris bileşimi, mikrobiyal hücreler, su, ekzopolisakkaritler ve

salgılanan/salınan hücre dışı ürünlerden oluşur (Sutherland, 2001; Allison, 2003). Biyofilm matrisi, bakteriyel hücreler arasındaki karmaşık etkileşimleri kolaylaştırmak için hücrelerin yakın çevresinde toplanmasına aracılık eden hücre dışı polimerik maddeden oluşur. Bu madde EPS olarak bilinir ve bu EPS ayrıca biyofilmdeki tek tek hücrelerin mekanik stabilitesine ve yapışmasına da katılır, böylece biyofilmin çok katmanlı mimari yapısının oluşumunda temel faktör görevi görmektedir. (Allison, 2003; Flemming ve Wingender, 2010; Joo ve Otto, 2012). Ekzopolisakkaritlerin; nitrojen bağlayıcı bakterilerin bitki kökünü kolonize etmesi ve biyofilm oluşturması için önemli olduğu vurgulanmıştır (Hebbar ve ark., 1992; Meneses ve ark., 2011). Olgunlaşma süreci kritik bir kütleye ulaştıktan sonra, oluşturulan planktonik mikroorganizmalar biyofilmden ayrılır ve yeni biyofilm mimarilerinin kurulması için besin açısından zengin yeni ortamlara dağılmasıyla devam eder (Dunne, 2002).



Şekil 2. 2. Biyofilm gelişim aşamaları (P. Stoodley, et al., 2002). Aşama 1:Tersine çevrilebilir bağlantı; Aşama 2:Geri dönüşü olmayan bağlanma; Aşama 3 ve 4:Olgunlaşma süreci; Aşama 5:Yayılma.

Biyofilmler; oksijen radikallerinden, dezenfektanlardan, pH değişikliklerinden, düşük besin maddelerinden ve antibiyotiklerden korunmak için mikrobiyal toplulukların hayatta kalma stratejisi olarak kabul edilir (Jefferson, 2004). Biyofilm oluşumunun, besin mevcudiyeti, pH, tuzluluk, sıcaklık, demir konsantrasyonu, oksijen, çoğunluk algılama ve genetik gibi çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametrelere bağlı olduğunu gösteren çok sayıda veri vardır (Harjai ve ark., 2005; Di Bonaventura ve ark., 2007; Horswill ve ark., 2007; Hostacka ve ark.,

2007; Hostacka ve ark., 2010; Çam ve Brinkmeyer, 2020). Farklı bakteri türlerinin rastgele örneklenmiş izolatları ile yapılan bir çalışma, bireysel suşlar tarafından biyofilm gelişiminin değişken olabileceğini ve hem bakteri türüne hem de suşa bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Sanchez ve ark., 2013).

Çeşitli PGPR bakterilerinin abiyotik ve biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturduğu bilinmektedir. Biyofilm olarak bilinen çok hücreli mikroorganizma toplulukları, tarımsal ortamda yüksek öneme sahiptirler, ancak nitrojen bağlayan bakterilerin oluşturduğu biyofilm hakkında pek bir çalışmalara rastlanılmamaktadır. Bu nedenle, serbest yaşayan nitrojen sabitleyen bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmler hakkında pek bir bilgi bulunmamaktadır. Farklı stres koşulları altında biyofilm oluşumu, bitki rizosferinde başarılı bir şekilde hayatta kalmaları için bakteri suşları tarafından benimsenen önemli bir yaşamsal stratejidir (Kasim ve ark., 2016). Azotu fikse eden mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bitki kökleriyle ilişkili rizobakteriyel biyofilmler, kolonizasyon alanlarının korunmasına yardımcı olur ve rizosferdeki kök eksüdaları şeklindeki besinler için bir rezervuar görevi görür, bu da daha sonra besinlerin fitopatojenlere erişilebilirliğini azaltır (Weller ve Thomashow, 1994). Biyofilm oluşturan PGPR'lerin bitkiler için kaynak edinimini kolaylaştırmak, fitohormon seviyelerini modüle etmek ve biyotik ve abiyotik bitki stres faktörlerini azaltmak gibi bir dizi faydası vardır (Lugtenberg ve Kamilova, 2009; Ahemad ve Kibret, 2014; Kimani ve ark., 2016). Son yıllarda, doğal koşullar altında rizobakteriler tarafından biyofilm oluşumunun önemi, bitki-mikrop etkileşimleriyle ilişkili olarak artan ilgi görmüştür (Farrar *ve* ark., 2014; Altaf ve Ahmad, 2017). *Azotobacter* türlerinin de diğer rizobakteriler gibi bitki köklerinde biyofilm oluşturduğu ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin türden türe farklılık gösterdiği son zamanlar da yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Altaf ve Ahmad, 2017).

Tuz, agronomik olarak yararlı arazileri verimsiz alanlara dönüştürdükleri için tarım için büyük bir sorundur. Dünya'daki tarım arazilerinin yaklaşık %20'si ve mahsul arazilerin %50'si tuz streslidir (Flowers ve Yeo, 1995). Toprak tuzluluğu; su stresi, beslenme dengesizliği, spesifik iyon toksisitesi, hormonal dengesizlik ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur (Omar ve ark., 2009). Bu nedenle son yıllarda

çevre dostu ve sürdürülebilir tarım için faydalı mikroorganizmaların kullanımına büyük ilgi duyulmaktadır. Değişik stres koşulları altında biyofilm oluşumu, bitki rizosferinde başarılı bir şekilde hayatta kalmaları için mikroorganizmalar tarafından benimsenen önemli bir stratejidir (Kasim ve ark., 2016). Bitki ile ilişkili biyofilmler; dış stresten koruma sağlama, mikrobiyal rekabeti azaltma ve bitki büyümesini, verimini ve mahsul kalitesini destekleyen koruyucu etkiler sağlama gibi yararları vardır (Asari, 2015). Tuzun mikroorganizmaların biyofilm oluşumu üzerinde farklı etkiler oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014; Kasim ve ark., 2016; Marsden ve ark., 2017; Mizan ve ark., 2018; Moraes ve ark., 2019; Xu ve ark., 2010). Son yıllar da yapılan bir çalışmada, bitki büyümesini destekleyen rizobakterilerin biyofilm oluşum aktivitesi, farklı tuz konsantrasyonları altında belirlendi. Çalışmada, rizobakterilerin artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı derecelerde biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir (Kasim ve ark., 2016). Ayrıca, stresi altında biyofilm oluşumunun, arpanın tuz stresi toleransını iyileştirmeye yardımcı olduğunu da öne sürülmüştür. Literatürde, *Azotobacter* türlerinin farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma yetenekleri henüz bilinmemektedir. Bu nedenle, bu mikroorganizmanın farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma yeteneklerinin test edilmesi etkili biyo-kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve PGPR olarak kullanılması için önem arz etmektedir.

Biyolojik azot fiksasyonu yapma ve bitki gelişimini teşvik edici özelliklerinden dolayı *Azotobacter* üzerine çok sayıda farklı çalışmaların olması, bu mikroorganizmanın ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar farklı coğrafi bölgelerde farklı çevre şartları altında yapılmaktadır. Çevresel şartların bu mikroorganizmanın azotu fikse etme özelliğini ve diğer bitki gelişimini teşvik edici özelliklerini etkilediği ve bundan dolayı yöresel mikroorganizmaların yerel ekolojik ortamlara inokulant organizmalara göre çok daha iyi adapte olabileceğini ve böylece yerli türlerin bölgesel mahsullere biyolojik gübre olarak kullanılmasının daha uygun olacağını gösteren çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır (Kızılkaya., 2008; Chen ve ark., 2018; Kannan ve Ponmurugan, 2018). *A. chroococcum* ile yapılan bir çalışmada, yerli suşun diğer suşlara göre ürün verimliliği üzerine en fazla etki gösterdiği gözlenmiştir ve kontrol grubuna göre tarla denemelerinde %84, saksı deneylerinde %95 ürün artışı rapor edilmiştir (Kızılkaya, 2008). Bu nedenle, yerli suşların

izolasyonu ve yerli bitkilere biyolojik gübre olarak uygulanması önemlidir. Bütün *Azotobacter* türleri bitki gelişimini teşvik edici özelliğe (PGPR) sahip değildirler (Chen ve ark., 2018). Bundan dolayı, her türün PGPR özelliği test edilmesi gerekmektedir. Türkiye'de *Azotobacter* türlerinin çeşitliliği üzerine moleküler düzeyde çalışmalara pek rastlanılmamıştır. Ayrıca Şanlıurfa ve çevresi topraklarında da *Azotobacter* izolasyonu, biyolojik gübre potansiyelinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmamız da Şanlıurfa gibi tarıma elverişli bölgenin buğday rizosferinde yaşayan, azotu bağlayabilen *Azotobacter* türlerinin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlanması yapılmıştır ve sonrasında farklı tuz konsantrasyonları altında biyofilm oluşturma özellikleri test edilmiştir.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. *Azotobacter* Türlerinin İzolasyonu ve Morfolojik Tanımlanması

2019-2020 yılları arasında Şanlıurfa yöresinde üç farklı tarladan (37°08'53.5"K 38°53'10.3"D; 37°06'55.7"K 38°57'48.1"D; 37°04'54.0"K 38°56'14.2"D) 35 buğday bitkisi (*Triticum aestivum L.*) rizosferinden toprak örnekleri naylon torbalarla laboratuvara taşınmıştır ve 4℃'de muhafaza edilmiştir. 10 gram toprak örnekleri 90 ml steril su ile çalkalanmıştır. $10^{-1,}$ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, ve 10^{-5} seri dilüsyonları hazırlanan çözeltilerden, 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlarından mikroorganizmalar izole edilmiştir. Hedef mikroorganizmanın izolasyon işlemi, toprak partiküllerinin Ashby-Sucrose Agar besiyerine ekim tekniğiyle gerçekleştirilmiştir (Aquilanti ve ark., 2004; Jimenez ve ark., 2011). 28ºC'de 7 günlük inkübasyon sonrası; parlak, mukoid koloniler seçilerek Ashby-Sucrose Agar besiyerinde saflaştırılmıştır (Jimenez ve ark., 2011).

3.2. Biyokimyasal Tanımlanması

Agar besiyerinde saflaştırılan izolatların gram boyamaları ve koloni morfolojileri dikkate alınarak Bergeys Manuel of Determinati ve Bacteriology'e göre morfolojik ve biyokimyasal tanımlanması yapılmıştır. Seçilen izolatlar, daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere %30 gliserol içeren nutrient broth besiyerinde -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1. Karbon kaynağının belirlenmesi

Karbon kaynağı kullanım testinde 10 mL fenol red broth (10 g/L proteaz peptone, 1 g/L beef ekstrakt, 0.018 g/L fenol red, 5 g/L NaCl ve 1 L dH_2O) steril test tüplerine dağıtıldı. Ardından, her biri %0.5 (w/v) glukoz, mannitol,maltoz ve nişaşta ayrı ayrı tüplere aktarıldı ve 24 saatlik kültür bir öze yardımıyla inoküle edilmiştir. Tüpler 28°C'de 7 gün boyunca bir inkübatörde inkübe edildi. Sarı renk oluşumu *Azotobacter* türlerinin karbonu kullanabilme yeteneğini gösterir (Chen ve ark., 2018).

3.2.2. Oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Substrat tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür ile ıslatılmış bir filtre kâğıdı steril dH_2O ile nemlendirildi. Agar üzerindeki koloniler steril kürdan yardımıyla filtre kağıdına sürüldü ve 10-40 saniye içinde koyu mavi veya mora renk değişikliği oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (Shields ve Cathcart, 2010).

3.2.3. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz testi için 24 saatlik bakteri kolonileri üzerine bir damla %30'luk H_20_2 (hidrojen peroksit) eklendi. Gaz kabarcığının ortaya çıkması katalaz varlığını gösterdi (MacFaddin, 1980).

3.2.4. Nitrat redüktaz aktivitesi

Nutrient broth'a %0.1 oranında KNO_3 eklendi. Daha önce petrilerde büyütülen bakteri kültürleri öze yardımıyla KNO_3 içeren nutrient besiyerine aktarıldı ve 48 saat inkübe edildi. Üzerine 0.5 mL nessler ayıracı eklendi. Kahverenkten sarı renge dönüşüm nitrat redüktaz aktivitesinin pozitif olduğunu gösterdi (Macfarlane ve Herbert, 1984).

3.3. *Azotobacter* Türlerinin Moleküler Tanımlanması

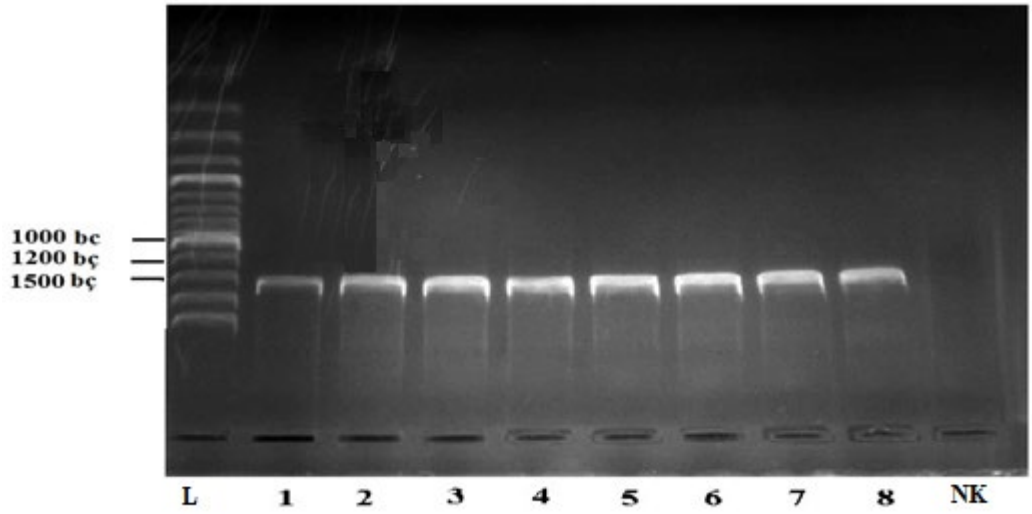
3.3.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyon işlemi için %2 Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) metodu kullanılmıştır (Çam ve ark., 2019). Dondurulmuş örnekler eritildikten sonra ve bir AccuSpin Micro R Santrifüjünde (Fisher Scientific) 4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüştür ve %2 CTAB (500 ul) eklenmiştir. Tüpler, bir saat boyunca 60°C'de bir dijital ısı bloğunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca, tüpler bakteri hücre duvarlarının parçalanmasını kolaylaştırmak için her 10 dakikada bir vortekslenmiştir. Daha sonra, 500 µL soğutulmuş 24:1 kloroform: izoamil alkol ilave edilerek vortekslenmiştir. Elde edilen emülsiyonlar 10000 rpm'de (4°C) 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sulu faz dikkatlice

yeni bir 2 mL'lik tüpe aktarıldıktan sonra 2/3 hacimde soğuk izopropanol eklenmiştir. DNA'nın gece boyunca çökelmesinden sonra, tüpler 4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir ve sonrasında süpernatant boşaltılmış tüpler hava ortamında 2-3 saat kurumaya maruz bırakılmıştır. Tuzları uzaklaştırmak için buz gibi etanol (%80; 0.2 mL) eklenmiştir ve hemen dökülmüştür. Tüplerin dibinde çöken DNA oda sıcaklığında 1-2 saat kurumaya bırakılmıştır. DNA, gece boyunca oda sıcaklığında, 10 mMTris, 10 mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren bir tamponla rehidre edilmiştir. DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop Spektrofotometre (Inpoler)'de 260/280 oranına göre belirlenmiştir.

3.3.2. 16. S ribozomal RNA gen bölgesinin amplifikasyonu

Hedef DNA bölgeleri amplifikasyonu için fD1 ''CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG'' ve rD1 ''CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC'' primerleri kullanılmıştır (Weisburg *ve ark.*, 1991; Chen ve ark., 2018). Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) amplifikasyonu, Thermal Cycler (BIO-RAD T100™) cihazında *Taq* DNA polimeraz (ThermoScientific, #EP0402) enzim üreticisinin geliştirdiği protokole göre yapılmıştır. PZR içeriği; 5µl 10X *Taq* buffer $(NH_4)_2SO_4$, 1 µL dNTPs (10mM), 1 µL primer (fD1 and rD1) (10 µM), 5 µl $MgCl_2$ (25mM), 1.25 U *Taq* DNA polimeraz, 3 µL DNA örnekleri (yaklaşık 50-70 ng/µL) ve totalde 50 µL tamamlamak içim 32.75 µL ultra saf PZR dH_2O' dan oluşturulmuştur. PZR koşulları; ilk denatürasyon aşaması 95ºC'de 3 dakika belirlenmiştir. Daha sonra 35 döngü olacak şekilde, 95ºC'de 30 saniye denatürasyon, 58ºC'de 30 saniye bağlanma, 72ºC'de 90 saniye uzama protokolü uygulanmıştır. Son uzama safhası ise 72ºC'de 10 dakika olarak uygulanarak program sonlandırılmıştır. Yaklaşık 1500 baz çiftine denk gelen amplifiye olmuş gen bölgesinin kontrolü %2' lik agaroz jelde 100 V elektrik akımında, 1XTAE (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA) buffer ortamında yürütülmüştür ve jel dokümantasyon cihazında (UVItec) UV ışık altında görselleştirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Bazı Azotobacter türlerine ait amplifiye olmuş PZR ürünlerinin jel görüntüsü (L: ladder, NK: negatif kontrol, bç: baz çifti)

3.3.3. Sekans analizi

16S ribozomal RNA genin fD1 ve rD1 primerleriyle çoğaltılmış bölgelerinin dizi analizleri MEDSANTEK/iSTANBUL tarafından yapılmıştır. Örnekler pürifiye edildikten sonra genler çift yönlü olarak 3500XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) cihazında okutulmuştur. MEDSANTEK tarafından gelen sekanslar, FinchTV sürüm 1.4.0 programı kullanılarak incelenmiştir ve temizlenmiştir. BioEdit yazılım versiyon 7.0.5.3 programı kullanılarak sekanslar hizalanmıştır ve düzeltilmiştir. Çoklu dizi hizalamarı için Clustal Omega sürüm 1.2.4 kullanılmıştır ve diziler FASTA formatında kaydedilmiştir.

3.3.4. Filogenetik analizler

Filogenetik analizlerden önce, haplotip sayılarını, polimorfik bölgeleri, haplotip ve nükleotid çeşitliliklerini belirlemek için DnaSP sürüm 6.12.03 programı kullanılmıştır (Librado ve Rozas, 2009). Filogenetik analizler için, maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) ve bayesian analizleri yapılmıştır. Maximum likelihood ve maximum parsimony analizi, MEGA X sürüm 10.1.8 yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Kumar ve ark., 2018).

Maximum likelihood analizinde en uygun nükleotid yer değiştirilme modeli olarak Tamura-Nei (TrN) modeli belirlenmiştir (Tamura ve ark., 2013). Sezgisel arama için ilk ağaçlar, Neighbor-Join ve BioNJ algoritmaları Tamura-Nei modeli kullanılarak tahmin edilen bir ikili mesafe matrisine uygulanarak otomatik olarak elde edilmiştir. Her bir alt kuşak için en az 1 dizide en az 1 kesin bazın bulunduğu yerlerin oranı ağaçtaki her bir iç düğümün yanında gösterilmiştir.

Maximum parsimony ağacı, ilk ağaçların dizilerinin rastgele eklenmesiyle elde edildiği arama seviyesi 1 ile Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algoritması kullanılarak elde edildi (Nei ve Kumar, 2000). Filogenetik ağaç, ortalama yol kullanılarak hesaplanan dal uzunlukları ölçeğe göre çizildi. ML and MP analizleriyle oluşturulan filogenetik ağaçlarının güvenirliğinin test edilmesinde 1000 tekrarlı bootstrap testi kullanılmıştır.

Bayesian analizi için MrBayes sürüm 3.2.6 yazılımı kullanılmıştır (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003). MrBayes, model parametrelerinin posterior dağılımını tahmin etmek için Markov zinciri Monte Carlo (MCMC) yöntemlerini kullanır. Yer değiştirme modeli olarak ‘‘4by4’’ ile bölgeler arasında oran varyasyonu ‘‘invariable+gamma’’ tercih edilmiştir. Markov zinciri Monte Carlo parametreleri için 4 zincirli 100000 generasyon çalıştırılmış olup, her 100 generasyonda örneklendirilmiştir. Düşük olasılıklı ilk 1000 ağaç ‘‘burn-in’’ olarak atılmıştır. Newick formatında olan sonuçlar MEGA X sürüm 10.1.8 yazılımı kullanarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Kumar ve ark., 2018).

Bu üç analize ilave olarak, türlerin tanımlanmasında NCBI-BLAST’tan yararlanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için referans türlerin gen dizileri NCBI Blast’tan elde edilmiştir. Elde edilen referans suşlar; *A. chroococcum* NBRC 102613 (NR_114167.1), *A. beijerinckii* ICMP 8673 (NR_042071.1), *A. tropicalis* FAR2 (LC496627.1), *A. vinelandii* NBRC 102612 (NR_114166.1), *A. paspali* NBRC 102228 (NR_114054.1), *A. nigricans* IAM 15005 (NR_041033.1), *A. armeniacus* DSM 2284 (NR_041037.1), *A. salinestris* ATCC 49674 (NR_041038.1) ve dış grup olarak *Pseudomonas fluorescens* JCM 13058 (LC507955.1) tercih edilmiştir.

3.4. *Azotobacter* Suşlarının Özellikleri

3.4.1. Tuza dayanıklılık testi

Tuza dayanıklılık testinde nutrient agar kullanılmıştır. %2, %4, %6 ve %8 NaCl oranında nutrient agar petri kutularına hazırlandı. Agar petri kutularında 24 saat önce hazırlanan kültürler çizgi ekim yöntemiyle farklı tuz konsantrasyonlarda ki nutrient agara ekildi ve 28°C'de 48 saat inkübe edildi. Koloni oluşturan izolatlar pozitif olarak değerlendirildi (Nag ve ark., 2018).

3.4.2. Azotu fikse edebilme aktivitesinin belirlenmesi

Biyokimyasal olarak tanımlanan *Azotobacter* türlerinin azotu fiske etme yetenekleri nitrojenden yoksun malat besiyerinde 28ºC'de 7 gün büyütülerek test edilmiştir (Weselowski ve ark., 2016). Nitrojenden yoksun malat besiyeri; 0.1 g/L NaCl, 0.02 g/L $CaCl_2$, 0.4 g/L KH_2PO_4, 0.5 g/L K_2HPO_4, 0.2 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0.01 g/L $FeCl_3$, 0.002 g/L $Na_2MoO_4.2H_2O$, 5 g/L sodium malate, 15 g/L agar, pH 7.2-7.4) ve 50 mg/L maya ekstraktından oluşur. Daha önce izole edilen tekli koloniler malat besiyerine nokta ekim yöntemiyle ekilmiştir. Ortaya çıkan tek bir koloni daha sonra azotu fikse etme yeteneğini doğrulamak için malat besiyerine yeniden nokta ekim yöntemiyle ekildi. Malat besiyerinde oluşan kolonilerin büyüklükleri metrik hesaplamalara göre ölçülmüştür.

3.4.3. Biyofilm oluşumu

Agar petriler de tutulan suşların tekli kolonilerinden nutrient broth'a ekim yapıldı ve gece boyunca inkübe edildi. Büyüyen kültürden 50 µL (~1×10^6 CFU/ml) *Azotobacter* alikot, 1:1 oranında otoklav edilmiş gölet suyuyla karıştırılan nutrient broth'a inoküle edildi (500 µL;pH:7) ve 28°C'de 48 saat borosilikat cam tüplerde sabit şekilde inkübe edildi. Yüksek düzeyde biyofilm oluşumu (optik yoğunluk> 8) gözlenen türler daha sonra %2, %4, %6 ve %8 NaCl ilave edilmiş gölet suyuyla 1:1 oranında karıştırılmış nutrient broth'a inoküle edildi ve biyofilm oluşumu sağlandı. Belirtilmedikçe biyofilm oluşum aşamaları aynı şekilde devam etmiştir.

Azotobacter suşlarının biyofilm üretimi, modifiye edilmiş bir kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak belirlendi (Çam ve Brinkmeyer, 2020). İstenilen koşullar altında 48 saat inkübasyondan sonra, borosilikat cam tüplerdeki kültür ortamı, biyofilmleri bozmamak için nazikçe döküldü. Her bir tüp, yapışmayan hücreleri çıkarmak için %2 NaCl ile dört kez nazikçe yıkandı. Tüplere kristal viyole (%0.1; 600 uL) ilave edildi ve oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildi. Daha sonra, bağlanmamış kristal viyole dikkatlice boşaltıldı ve tüpler, bağlanmamış boyayı çıkarmak için %2 NaCl ile 3-4 kez iyice durulandı. Biyofilm bağlı kristal viyole, 10 dakika boyunca 600 uL %98 etanol ile ayrıştırıldı. Ayrıştırılan boyanın alikotları (20-100 uL), 96 oyuklu plakalara aktarıldı ve optik yoğunluk bir UV-Vis spectrophotometer kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Biyofilm deneyi 3'er replikeden iki tekrarlı yapılmış olup sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.5. İstatistik Analizleri

Verilerdeki istatistiksel önemi değerlendirmek için SPSS sürüm 24.0 kullanılmıştır. Bartlett testi, eşit varyansları sağlamak için tek yönlü ANOVA'ya öncelikli olarak yapıldı ve grup ortalamalardaki farklılıkları belirlemek için Bonferroni *post hoc* testi uygulandı; $P < 0.05$.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *Azotobacter* Türlerinin İzolasyonu, Biyokimyasal Tanımlanması

Buğday rizosferinden 35 toprak örnekleri toplanmıştır. Bu toprak örneklerden izole edilen *Azotobacter* suşları, morfolojik, biyokimyasal ve bakteriyel 16S ribozomal RNA dizilerine göre moleküler olarak tanımlanmıştır.

Biyokimyasal analizlerinde bütün suşların oksidaz, katalaz ve nitrat redüktaz aktivitesi pozitif çıkmıştır (Çizelge 4.1.). Bütün suşlar gram negatif olarak bulunmuş ve hiçbir suş nişastayı hidrolize edememiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz, mannitol ve maltoz kullanılmıştır. Bütün suşlar glukozu karbon kaynağı olarak kullanmıştır. SBS7 ve SBS14 suşları dışında ki suşlar mannitolü; SBS7 ve SBS15 suşları dışında ki suşlar ise maltozu karbon kaynağı olarak kullanmıştır (Çizelge 4.1.). *Azotobacter* suşlarının glukozu, mannitolü ve maltozu karbon kaynağı olarak kullandığı ve oksidaz, katalaz ve nitrat redüktaz aktivitesi gösterdiği diğer çalışmalarda da mevcuttur (Chen ve ark., 2018; Jimenez ve ark., 2011; Rojas-Tapias ve ark., 2012).

Çizelge 4.1. Buğday rizosferinden izole edilen *Azotobacter* türlerinin biyokimyasal analizleri

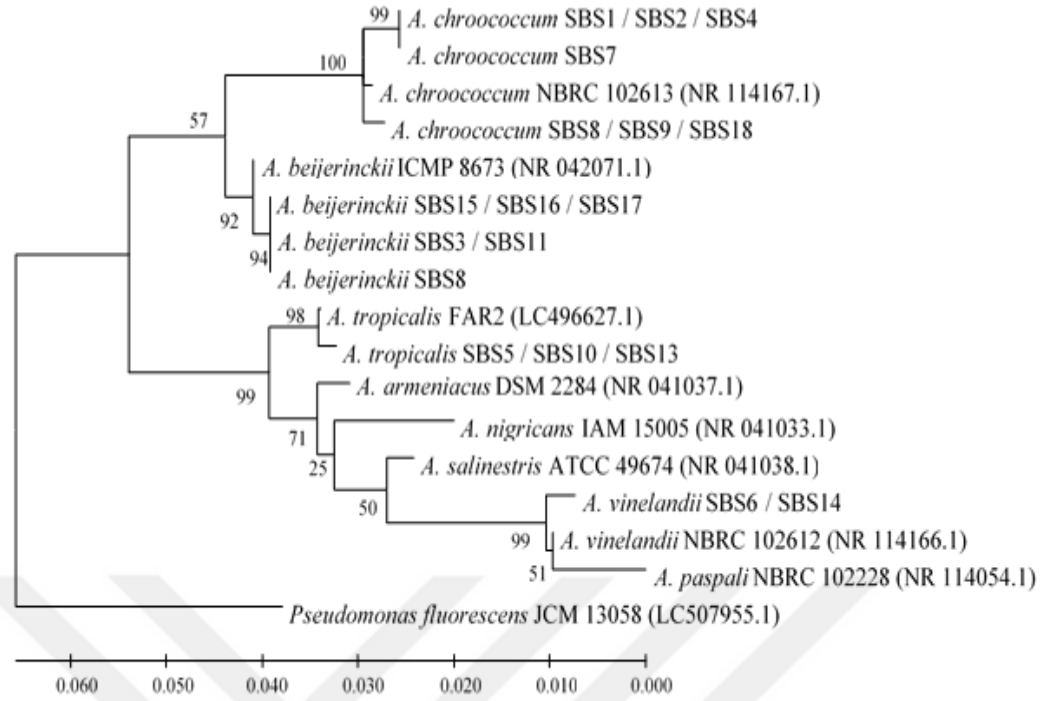
Suşlar	Gram boyama	Glukoz	Mannitol	Maltoz	Nişasta hidrolizi	Oksidaz	Katalaz	Nitrat redüktaz
SBS1	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS2	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS3	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS4	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS5	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS6	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS7	-	+	-	-	-	+	+	+
SBS8	-	+	+	+	-	+	+	+

Çizelge 4.1. (devam)

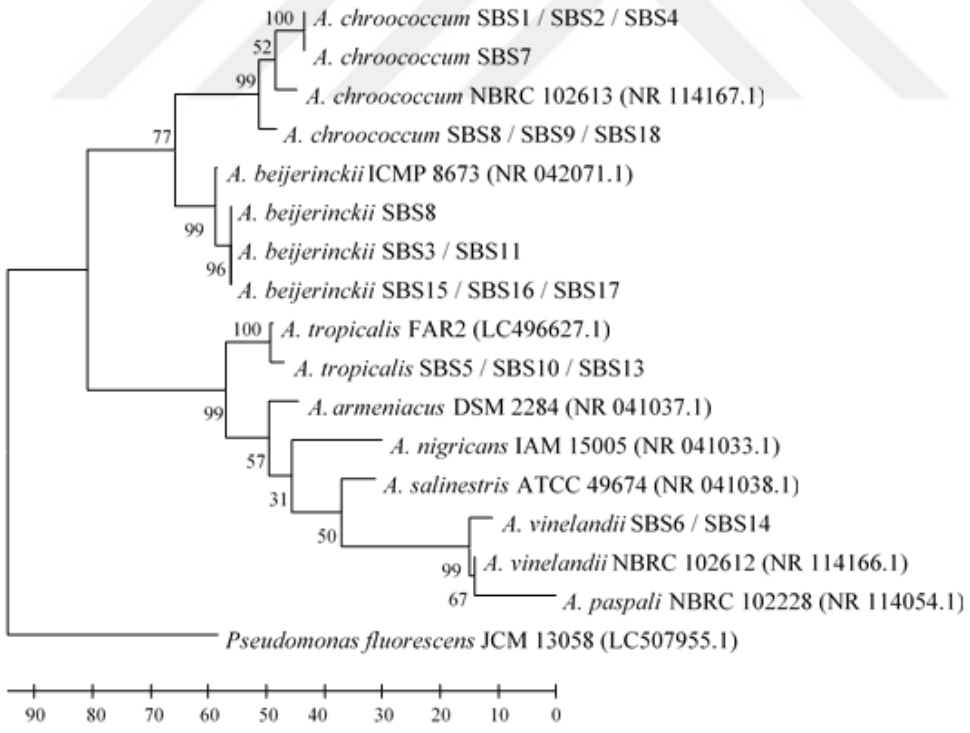
SBS9	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS10	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS11	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS12	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS13	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS14	-	+	-	+	-	+	+	+
SBS15	-	+	+	-	-	+	+	+
SBS16	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS17	-	+	+	+	-	+	+	+
SBS18	-	+	+	+	-	+	+	+

4.2. *Azotobacter* Türlerinin Moleküler Tanımlanması

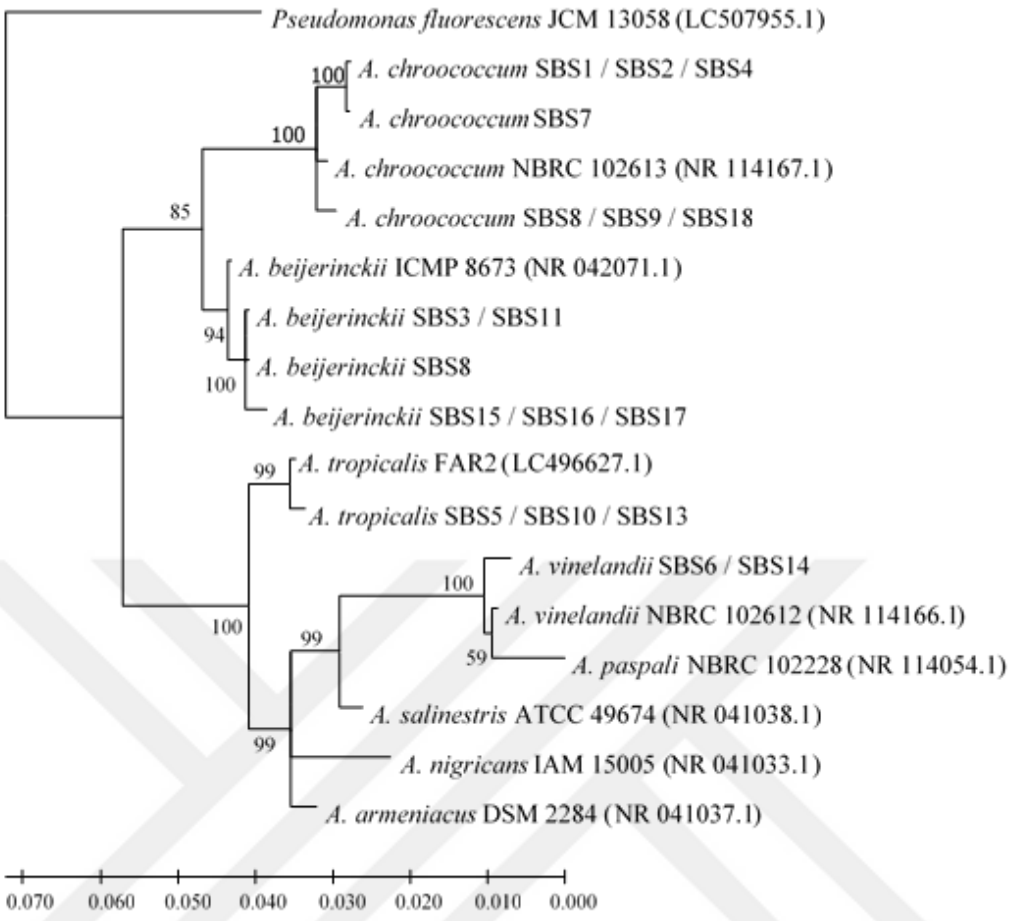
Türkiye'nin Şanlıurfa bölgesi buğday yetiştirilen tarlalardan 4 farklı *Azotobacter* türü ve toplamda 18 suş bulunmuştur. Maximum likelihood, maximum parsimony ve bayesian filogenetik analizleri sonucunda, bu 18 suşun, yedisi *A. chroococcum*, altısı *A. beijerinckii*, üçü *A. tropicalis* ve ikisi *A. vinelandii* türleri olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.). Suşlara ait FASTA dizileri NCBI'a yüklenmiştir ve gen erişim numaraları Çizelge 4.3'e eklenmiştir.



Şekil 4.1. 16S rRNA gen dizilerine bağlı maximum likelihood filogenetik analiz



Şekil 4.2. 16S rRNA gen dizilerine bağlı maximum parsimony filogenetik analiz



Şekil 4.3. 16SrRNA gendizilerine bağlı bayesian filogenetik analiz

16S rRNA gen bölgesine ait *Azotobacter* türlerinin genetik çeşitliliği Çizelge 4.2' te verilmiştir. *A. chroococcum* ve *A. beijerinckii* türlerine ait 2 haplotip tespit edilmiştir ve haplotip çeşitlilikleri sırasıyla 0.571 ve 0.600 olarak bulunmuştur. *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* türlerinde farklı haplotip tespit edilememiştir. Buğday rizosferlerinden izole edilen *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* türlerinde haplotip ve nükleotid çeşitliliğine rastlanılmamıştır. Tayvan'daki pirinç rizosfer topraklarında izole edilen *Azotobacter* türleri arasında, en yüksek haplotip sayısı *A. beijerinckii* izolatlarında görülmüştür (Chen ve ark., 2018). Chen ve arkadaşlarının çalışmasında (2018) *A. beijerinckii*, önemli polimorfik varyasyon ve en yüksek nükleotid çeşitliliği gösterirken mevcut çalışmada ise *A. chroococcum* suşları göstermiştir.

Çizelge 4.2. Buğday rizosferlerinden izole edilen *Azotobacter* türlerinin 16S ribozomal gen bölgesinin genetik çeşitliliği

Türler	Suşların sayısı	Haplotip	Polimorfik bölgeler	Haplotip çeşitliliği	Nükleotid çeşitliliği
A. chroococcum	7	2	8	0.571	0.00344
A. beijerinckii	6	2	3	0.600	0.00135
A. tropicalis	3	0	0	0	0.00000
A. vinelandii	2	0	0	0	0.00000

4.3. *Azotobacter* Suşlarının Özellikleri

4.3.1. Tuza dayanıklılık

Azotobacter türlerinin farklı NaCl konsantrasyonlarına dayanıklılıkları test edilmiştir (Çizelge 4.3.). Bütün suşlar %2 tuz konsantrasyonuna dayanıklılık göstermiştir. En az dayanıklılığı *A. beijerinckii* suşları göstermiştir ve suşlarının maksimum %4 tuz konsantrasyona dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bütün *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* suşları %4'e kadar tuz konsantrasyonuna dayanıklılık göstermiştir. Farklı NaCl konsantrasyon seviyelerinde *Azotobacter* izolatlarının tuza toleranslarını test etmek için başka bir çalışmada da, mevcut çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde bütün suşlar %2 NaCl seviyelerinde büyüme göstermiştir (Nag ve ark., 2018). Fakat çalışmamızın aksine, dört suşun sadece biri %5 NaCl konsantrasyonuna tolerans gösterebilmiştir. Mevcut çalışmamızda *A. chroococcum* suşlarının 5'i, %8 tuz konsantrasyonuna kadar tolerans sergilemiştir. Bu farklılık çalışmada kullanılan *Azotobacter* türlerinin farklı bölgelerden izole edilmesiyle açıklanabilir. İzolatların farklı iklim koşulları altında toprağın fiziki ve kimyasal yapılarına bağlı olarak farklı adaptasyon yetenekleri geliştirmiş olabilirler (Bhatia ve ark., 2008).

4.3.2. Azot fiksasyonu

En yüksek azot fiksasyonu *A. chroococcum* suşlarında gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Bütün suşlar azot fikse edebilme yeteneği sergilemiştir ve azot fiksasyonu testinde koloni çapları 1-3 mm arasında değişkenlik göstermektedir. *A. chroococcum* SBS1 ve SBS4 suşlarının azot fiksasyonu sonucunda en yüksek düzeyde büyüme sağlamıştır ve kolonilerin çapı 3 mm olarak kaydedilmiştir. *A. chroococcum'*nın diğer suşları ise 1-2 mm koloni çapına ulaşmıştır. *A. beijerinckii* SBS17 ve *A. vinelandii* SBS14 suşu 2 mm'lik koloni çapı gösterirken, diğer *A. beijerinckii, A. tropicalis* ve *A. vinelandii* suşlarının azot fiksasyonu sonucunda koloni çapları 1 mm olarak kaydedilmiştir.

Çalışmamız da *Azotobacter* türlerinin azot fiksasyonu, türler ve suşlar arasında farklılık göstermiştir. *Azotobacter* suşlarının farklı seviyelerde azot bağladığını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (Sahoo ve ark., 2014; Chen ve ark., 2018; Nag ve ark., 2018). Chen ve ark. (2018)'de yaptıkları çalışma da en yüksek azot fiksasyonu gösteren suşların çoğu mevcut çalışmada ki gibi *A. chroococcum* türü iken; Sahoo ve ark. (2014)'de yaptıkları çalışmada ise en fazla azot bağlayan tür *A. vinelandii* olarak bulunmuştur. *Azotobacter* türlerinde gözlemlenen bu farklılıklar, muhtemelen iklim koşulları, mikro habitat ve toprak özellikleri gibi belirli bölgelerde ki adaptasyonlarına ve performanslarına atfedilebilir (Bhatia ve ark., 2008; Rubio ve ark., 2013).

Çizelge 4.3. Buğday rizosferlerinden izole edilen *Azotobacter* türlerinin tuza dayanıklılığı, azot fiksasyonu ve biyofilm oluşturma yetenekleri

Suşlar (GenBank Erişim numarası)	NaCl konsantrasyonu				Azot bağlama (mm)	Biyofilm oluşumu
	%2	%4	%6	%8		
A. chroococcum SBS1 (MW037223)	+	+	+	+	3	Y
A. chroococcum SBS2 (MW037224)	+	+	+	+	2	Y
A. beijerinckii SBS3 (MW037217)	+	-	-	-	1	D
A. chroococcum SBS4 (MW037225)	+	+	-	-	3	Y
A. tropicalis SBS5 (MW037230)	+	+	-	-	1	O
A. vinelandii SBS6 (MW037233)	+	+	-	-	1	Y

Çizelge 4.3. (devam)

A. chroococcum SBS7 (MW037226)	+	+	+	-	2	O
A. beijerinckii SBS8 (MW037218)	+	+	-	-	1	D
A. chroococcum SBS9 (MW037227)	+	+	+	+	2	Y
A. tropicalis SBS10 (MW037231)	+	+	-	-	1	O
A. beijerinckii SBS11 (MW037219)	+	-	-	-	1	O
A. chroococcum SBS12 (MW037228)	+	+	+	+	1	Y
A. tropicalis SBS13 (MW037232)	+	+	-	-	1	O
A. vinelandii SBS14 (MW037234)	+	+	-	-	2	Y
A. beijerinckii SBS15 (MW037220)	+	+	-	-	1	-
A. beijerinckii SBS16 (MW037221)	+	+	-	-	1	D
A. beijerinckii SBS17 (MW037222)	+	+	-	-	2	-
A. chroococcum SBS18 (MW037229)	+	+	+	+	2	Y

(570 nm'de optik yoğunluk; 1<Düşük (D)<4<Orta (O)<8<Yüksek (Y)<12)

4.3.3. Biyofilmin meydana gelmesi

Azotobacter türlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Spektrofotometreden elde edilen optik yoğunluklarına göre Yüksek (Y), Orta (O) ve Düşük (D) olarak simgelenmiştir. En yüksek biyofilm oluşumu *A. chroococcum* ve *A. vinelandii* suşları arasında gözlenmiştir. *A. chroococcum* SBS7 suşu hariç diğer bütün *A. chroococcum* ve *A. vinelandii* suşları yüksek düzeyde biyofilm oluşturmuştur. *A. tropicalis* suşları orta düzeyde biyofilm oluşturmuştur. En düşük seviyede biyofilm oluşumu *A. beijerinckii* suşlarında gözlenmiştir. Sadece *A. beijerinckii* SBS11 orta düzeyde biyofilm oluşturmuştur. *A. beijerinckii* SBS15 ve SBS17 suşlarında biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Aynı türün farklı suşları arasında farklı seviyelerde biyofilm oluşumu birçok çalışma da farklı mikroorganizmalar üzerinde gösterilmiştir (Hostacka ve ark., 2010; Çam ve Brinkmeyer, 2020). *Azotobacter* biyofilmleri üzerinde pek bir çalışma bulunmamaktadır.12 farklı *Azotobacter* izolatları üzerinde yapılan bir çalışma da;

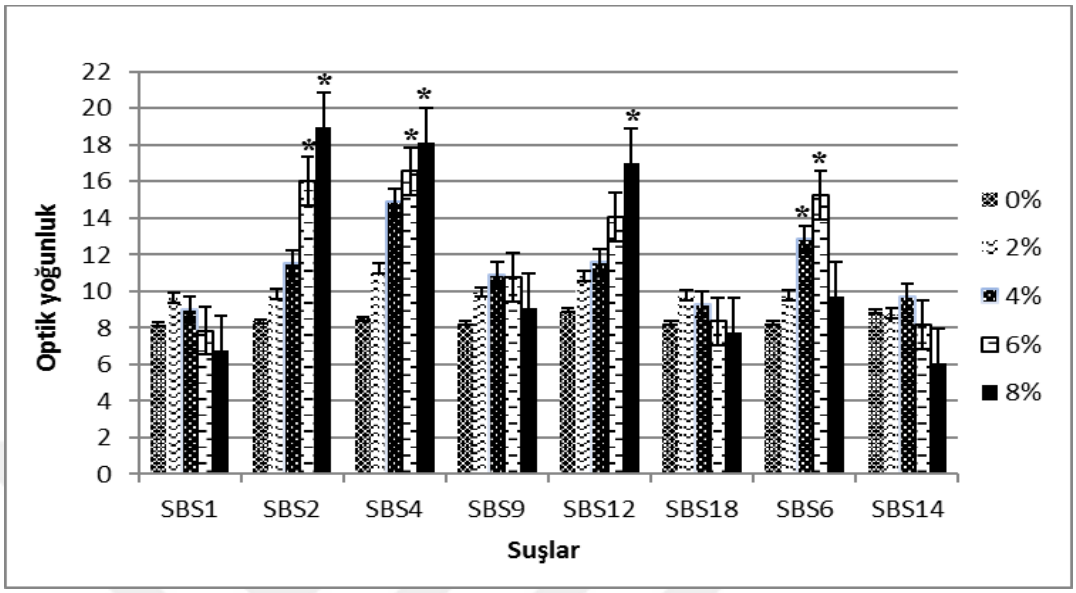
çalışmamızın sonucuna benzer şekilde *Azotobacter* türlerinin farklı seviyelerde biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (Altaf ve Ahmad, 2017). Bu çalışma da 16S rRNA gen dizileme analizi sonucunda en etkili biyofilm oluşturan tür *A. vinelandii* olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızda ise, *A. vinelandii* izolatlarının yanısıra *A. chroococcum*'nun izolatlarında da yüksek düzeyde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu farklılık farklı deney koşulları altında farklı izolatların kullanılmasıyla açıklanabilir.

Biyofilm aşılamasının; bitki büyümesinde, toprak besin maddesi mevcudiyetinde, bitki savunma enzimlerinde ve gelişmiş kök kolonizasyon davranışında önemli katkıları bulunmaktadır (Altaf ve Ahmad, 2016; Velmourougane ve ark., 2017; Velmourougane ve ark., 2019). Bu nedenle, *Azotobacter*'in bitki kökleri üzerinde güçlü biyofilm oluşturma yeteneği, gelişmiş kök kolonizasyonu için etkili izolatların seçiminde önemli bir kriter olarak düşünülmelidir. Birçok çalışmada *Trichoderma-Azotobacter chroococcum* kombinasyonlarının biyofilm aşılaması kullanılmıştır ve çalışmalar bu iki tür üzerinde yoğunlaşmıştır (Triveni ve ark., 2013; Velmourougane ve ark., 2017; Velmourougane ve ark., 2019). *Azotobacter*'lerin diğer türleri göz ardı edilmiştir. Çalışmamızda bütün *A. chroococcum* suşları yüksek düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği göstermemiştir ve bu nedenle çalışmaların tür düzeyinden ziyade suş düzeyinde ele alınması çalışmaların doğruluğuna katkı sağlayacaktır. İlaveten, *A. vinelandii* suşları da etkili biyofilmler geliştirmiştir. Kök kolonizasyonuna biyofilm aşılaması için izolat seçimlerinde *A. vinelandii* suşlarının da dikkate alınması önem arz etmektedir.

4.3.3.1. Tuzun biyofilm üzerine etkisi

Yüksek düzeyde biyofilm oluşturan 8 suşun, farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu Şekil 4.4'de gösterilmiştir. *A. chroococcum* SBS1, *A. chroococcum* SBS9, *A. chroococcum* SBS18 ve *A. vinelandii* SBS14 suşlarında tuzun biyofilm oluşumuna bir etki göstermediği gözlemlenmiştir. *A. chroococcum* (SBS2, SBS4, SBS12) izolatlarında %8'e varan tuz konsantrasyonlarına bağlı biyofilm miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (tek yönlü ANOVA; $P<0.05$). *A. vinelandii* SBS6 suşunda ise %6'a varan tuz konsantrasyonunda biyofilm

oluşumunda artış gözlemlenirken, %8 NaCl konsantrasyonunda büyük bir azalma görülmüştür.



Şekil 4.4. Farklı NaCl konsantrasyonlarda *Azotobacter* suşları tarafından oluşturulan biyofilm oluşumu; Bonferroni post hoc testi, ortalama ± standart hata; P<0.05. * İstatistik olarak anlamlı

Çalışmamız, bazı *Azotobacter* suşlarının artan NaCl konsantrasyonu ile biyofilm oluşum aktivitesinin arttığını göstermiştir. Çalışmamızın sonuçlarını destekleyen bir çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Kasim ve ark., 2016). Bu çalışmada da rizobakterilerin artan tuz konsantrasyonlarına bağlı bir şekilde biyofilm oluşumunda artışlar gözlenmiştir. Bazı rizobakteriler de artan tuz konsantrasyonuyla yüksek seviyeler de biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Kasim ve ark., 2016). Artan biyofilm oluşumunun suşların tuza dayanıklılığı arasında bir ilişki bulunamamıştır. *A. chroococcum* (SBS2 ve SBS12) izolatlarında %8'e varan tuz konsantrasyonlarında büyüme görülmüşken, *A. chroococcum* SBS4 ve *A. vinelandii* SBS6 suşlarında %4 NaCl konsantrasyonlarına kadar gelişme gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). *A. chroococcum* SBS1, SBS9 ve SBS18 suşları %8 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterirken, artan tuz konsantrasyonlarında biyofilm üretiminde bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.4.). Sonuç olarak biyofilm üretiminde ki artış, suşların artan tuz konsantrasyonlarında büyüme hızlarından kaynaklanmamıştır. Artan tuz miktarı mikroorganizmaları biyofilm üretmeye yönlendirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli stres koşulları altında biyofilm oluşumu, bitki rizosferinde

başarılı bir şekilde hayatta kalmaları için bakteri suşları tarafından benimsenen önemli bir stratejidir. Çünkü biyofilm gelişimi, bakteri hücrelerini artan zamanla artan besin ve tuz stresinde karşı korumaktadır (Qurashi ve Sabri, 2012; Kasim ve ark., 2016). Besinler ve ozmotik stres gibi çevresel stresler, mevcut besinler için bakteriyel rekabeti artırır ve bu nedenle bakteriler, hayatta kalabilmek için çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde planktonik yaşam biçiminden sabit topluluklara yani biyofilm gibi oluşumlara geçiş yapmaktadır (Fujishige ve ark., 2006; Fujishige ve ark., 2006; Qurashi ve Sabri, 2012).

Tuz stresine karşı biyofilm oluşumunda artışın bir başka sebebi de, artan ekzopolisakkarit üretimine atfedilmiştir (Qurashi ve Sabri, 2012). Daha yüksek tuz stresine karşı ekzopolisakkarit üretiminin artması ayrıca biyofilm oluşumunu desteklediğini ve hücrelerin etrafında bir su tabakası tutarak bu mini düzeneği koruduğunu öne sürülmüştür (Fujıshıge ve ark., 2006; Qurashi ve Sabri, 2012). Ekzopolisakkaritler besin ve su tutmayı kolaylaştırır (Dımkpa ve ark., 2009) ve sodyum alımını kısıtlar (Ashraf ve ark., 2004) ve dolayısıyla olumsuz çevre koşulları altında mikrobiyal hücrelerin korunmasına ve bitki büyümesine yardımcı olmaktadır. Ekzopolisakkaritler ile biyofilm oluşumu arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Meneses ve ark., 2011). Ekzopolisakkaritler biyofilm matris çerçevesinin önemli bir bölümünü oluşturur ve kohezif ve yapışkan özelliği sayesinde çeşitli yüzeylere bağlanmasından sorumludur (Sutherland, 2001; Flemming ve Wingender, 2010). İlaveten, biyofilm mimarisinin mekanik stabilitesi ve oluşumu büyük ölçüde ekzopolisakkarit üretimi ile sağlanmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010).

Tuzluluk stresi, mahsul üretkenliğini engellemenin yanı sıra küresel sosyo-ekonomik etkilere neden olan en önemli çevresel streslerden biridir (Yasmeen *ve* ark., 2020). Tuz stresi altında, yararlı rizobakterileri korumak ve bitki gelişimini artırmak için biyofilm üreten PGPR'ların bitki köklerine aşılanması son yıllarda ilgi gören bir uygulama olmuştur (Qurashi ve Sabri, 2012; Kasim ve ark., 2016; Yasmeen ve ark., 2020). Mevcut çalışmamız da; üç *A. chroococcum* suşunda %8'e ve bir *A. vinelandii* suşunda ise %6'a varan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak in vitro biyofilm üretiminde artışlar gözlenmiştir (Şekil 4.4.). *A. chroococcum* SBS2, SBS4, SBS12 ve *A. vinelandii* SBS6 suşlarının artan tuz konsantrasyonlarda yüksek seviyelerde

biyofilm oluşturma özelliklerinden dolayı, bitkilerin gelişimini ve tuza karşı toleranslarını artırmak için diğer PGPR özellikleri test edildikten sonra aşılama yoluyla kullanılabilmeleri çalışmamızda mümkün görülmüştür.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Türkiye'nin Şanlıurfa yöresinde üç farklı tarladan, buğday (*Triticum aestivum L.*) rizosferinde yaşayan azotu bağlayabilen *Azotobacter* türleri izole edilmiştir. İzolatların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlanması yapılmıştır. Suşların tuza dayanıklılıkları, azotu bağlayabilme ve biyofilm oluşturma yetenekleri test edilmiştir. En iyi biyofilm oluşturan suşların farklı tuz konsantrasyonları altında biyofilm oluşturması test edilmiştir.

Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlanması sonrasında buğday rizosferlerinden 4 farklı *Azotobacter* türü ve toplamda 18 suş bulunmuştur. Maximum likelihood, maximum parsimony ve bayesian posterior filogenetik analizleri sonucunda, bu toplam18 suşun, 7'si *A. chroococcum*, 6'sı *A. beijerinckii*, 3'ü *A. tropicalis* ve 2'si *A. vinelandii* türleri olarak tanımlanmıştır.

A. chroococcum ve *A. beijerinckii* türlerine ait 2 haplotip tespit edilirken, *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* türlerinde farklı haplotip tespit edilememiştir. Buğday rizosferlerinden izole edilen *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* türlerinde haplotip ve nükleotid çeşitliliğine de rastlanılmamıştır. Önemli polimorfik varyasyon ve en yüksek nükleotid çeşitliliği *A. chroococcum* suşları arasında görülmüştür.

İzole edilen izolatların tuza dayanıklılıkları da test edilmiştir. Bütün suşlar %2 tuz konsantrasyonu altında büyüme göstermiştir. *A. tropicalis* ve *A. vinelandii* suşları %4'e kadar tuz konsantrasyonuna dayanıklılık gösterirken, en az dayanıklılığı *A. beijerinckii* suşları göstermiştir ve suşlarının maksimum %4 tuz konsantrasyona kadar dayanıklılık gösterdiği kaydedilmiştir.

Azotobacter türlerinin azot fiksasyonu, türler ve suşlar arasında farklılık göstermiştir. Suşların azot fiksasyonu testinde koloni çapları 1 ile 3 mm arasında değişkenlik göstermiştir. *A. chroococcum* SBS1 ve SBS4 suşlarının azot fiksasyonu sonucunda büyümelerinin çapı 3 mm olarak kaydedilmiştir. *A. beijerinckii* SBS17 ve

A. vinelandii SBS14suşu hariç (2 mm), diğer *A. beijerinckii, A. tropicalis* ve *A. vinelandii* suşlarının azot fiksasyonu sonucunda koloni çapları 1 mm olarak kaydedilmiştir.

İzole edilen 4 farklı türün farklı suşları arasında farklı seviyelerde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. En yüksek seviyede biyofilm oluşumu *A. chroococcum* ve *A. vinelandii* suşlarında görülmüştür. *A. chroococcum* SBS7 suşu hariç diğer bütün *A. chroococcum* ve *A. vinelandii* suşları yüksek düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği sergilemişlerdir. En düşük seviyede biyofilm oluşumu ise *A. beijerinckii* suşları arasında gözlenmiştir. Sadece *A. beijerinckii* (SBS11) orta düzeyde biyofilm oluşturmuştur. *A. beijerinckii* (SBS15 ve SBS17) suşlarında biyofilm oluşumu kaydedilememiştir. *A. tropicalis* suşlarında orta seviyede biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

En yüksek seviyede biyofilm oluşturan 8 suşun, farklı tuz konsantrasyonları altında biyofilm oluşturabilmeleri incelenmiştir. *A. chroococcum* (SBS2, SBS4, SBS12) ve *A. vinelandii* (SBS6) izolatlarında artan tuz miktarına bağlı olarak biyofilm üretiminde istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana gelmiştir. *A. chroococcum* suşları %8'e, *A. vinelandii* SBS6 suşunda ise %6'a varan tuz konsantrasyonuna kadar biyofilm üretiminde artışlar gözlenmiştir. *A. chroococcum* SBS1, SBS9 ve SBS18 ile *A. vinelandii* SBS14 suşlarında NaCl'nın biyofilm oluşumuna bir etki göstermediği izlenmiştir. *A. tropicalis* ve *A. beijerinckii* türleri orta ve düşük seviyelerde biyofilm oluşturdukları için farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşturmaları test edilmemiştir.

5.2. Öneriler

Toprak tuzluluğu, agronomik olarak yararlı arazileri verimsiz alanlara dönüştürdükleri için tarım için büyük sorunlardan biridir. Tuz stresi, mahsul üretkenliğini azaltmanın yanı sıra sosyo-ekonomik etkilere de neden olan en önemli çevresel streslerden biridir. Değişik stres koşulları altında biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların bitki rizosferinde başarılı bir şekilde hayatta kalmaları için benimsenen önemli bir yaşamsal stratejidir. Bu nedenle tuz stresi altında, yararlı rizobakterileri korumak ve bitki gelişimini artırmak için biyofilm üreten PGPR etki

gösteren mikroorganizmaların bitki köklerine aşılanması son yıllarda ilgi gören bir uygulama olmuştur. Bu mikroorganizmanın farklı tuz konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma yetilerinin belirlenmesi, etkili biyo-kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve PGPR olarak kullanılması sürdürülebilir sağlıklı bir tarım için önemlidir.

Çalışmamızda, rizobakterilerin artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı seviyelerde biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. 3 *A. chroococcum* suşunda %8'e ve 1 *A. vinelandii* suşunda ise %6'a varan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak in vitro biyofilm üretiminde önemli artışlar görülmüştür. *A. chroococcum* SBS2, SBS4, SBS12 ve *A. vinelandii* SBS6 suşlarının artan tuz konsantrasyonlarda yüksek seviyelerde biyofilm oluşturma özelliklerinden dolayı, bitkilerin gelişimini ve tuza karşı toleranslarını artırmak için diğer PGPR özellikleri test edildikten sonra aşılama yoluyla kullanılabilirler. Ayrıca farklı iklim koşullarında PGPR'nin farklı tür ve suşlarının özellikleri incelendikten sonra biyogübre olarak kullanımı tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR

ABD-EL-MALEK, Y., HOSNY, I., and SHAWKY, B. T. 1979. Nitrogen-fixing capacity of *Azotobacter* as affected by the type and depth of substrate. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes, 134: 390-397.

AHEMAD, M. and KIBRET, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting Rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science, 26: 1-20.

AHMAD, F., AHMAD, I., and KHAN, M. S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology, 29: 29-34.

AHMAD, F., AHMAD, I., and KHAN, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research, 163: 173-181.

ALLISON, D. G. 2003. The biofilm matrix. Biofouling, 19: 139-150.

ALTAF, M. and AHMAD, I. 2016. Biofilm formation on plant surfaces by Rhizobacteria: Impact on plant growth and ecological significance, p. 81-95.

ALTAF, M. M. and AHMAD, I. 2017. In vitro and in vivo biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization. Rhizosphere, 3: 138-142.

AQUILANTI, L., FAVILLI, F., and CLEMENTI, F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Soil Biology and Biochemistry, 36: 1475-1483.

ASARI, S. Y. 2015. Studies on plant-microbe interaction to improve stress tolerance in plants for sustainable agriculture. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 76 : 21-22.

ASHRAF, M., HASNAIN, S., BERGE, O., and MAHMOOD, T. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. Biology and Fertility of Soils, 40: 157-162.

ATAR, B. 2018. Gıdamız buğdayın, geçmişten geleceğe yolculuğu.Süleyman Demirel Üniversitesi Yalvaç Akademi Dergisi, 2(1):1-12.

Bashan, Y. and Levanony, H. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. Plant and Soil, 137: 99-103.

BHATIA, R., RUPPEL, S., and NARULA, N. 2008. Diversity studies of *Azotobacter* spp. From cotton-wheat cropping systems of india. Journal of Basic Microbiology, 48: 455-463.

BHATTACHARYYA, P. N. and JHA, D. K. 2012. Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 1327-1350.

BIARI, A., GHOLAMI, A., and RAHMANI, H. 2008. Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays L.*) by application of plant growth promoting Rhizobacteria in arid region of Iran. Journal of Biological Sciences, 8: 1015-1020.

BOYD, C. E. and MASSAUT, L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering, 20: 113-132.

BROWN, M. E. and BURLINGHAM, S. K. 1968. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococcum*. Microbiology, 53: 135.

ÇAKMAKÇI, R. 2004. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı. Atatürk Üniv. Zir.Fak.Dergisi, 36 (1): 97-107.

ÇAM, S. and BRINKMEYER, R. 2020. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus*. Folia Microbiologica, 65: 557-566.

ÇAM, S., BRINKMEYER, R., and SCHWARZ, J. R. 2019. Quantitative PCR enumeration of *vcgC* and 16S rRNA type A and B genes as virulence indicators for environmental and clinical strains of *Vibrio vulnificus* in Galveston bay oysters. Canadian Journal of Microbiology, 65: 613-621.

CHEN, J.-H. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok, 1-11.

CHEN, S.-L., TSAI, M.-K., HUANG, Y.-M., and HUANG, C.-H. 2018. Diversity and characterization of *Azotobacter* isolates obtained from rice rhizosphere soils in Taiwan. Annals of Microbiology, 68: 17-26.

CHERIF-SILINI, H., SILINI, A., YAHIAOUI, B., OUZARI, I., and BOUDABOUS, A. 2016. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. Annals of Microbiology, 66: 1087-1097.

CHOUDHURY, A. T. M. A. and KENNEDY, I. R. 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. Biology and Fertility of Soils, 39: 219-227.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., and GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science, 284: 1318-1322.

CUMMINS, A. G. and ROBERTS-THOMSON, I. C. 2009. Prevalence of celiac disease in the asia-pacific region. J Gastroenterol Hepatol, 24: 1347-1351.

DENG, F., WANG, L., REN, W.-J., and MEI, X.-F. 2014. Enhancing nitrogen utilization and soil nitrogen balance in paddy fields by optimizing nitrogen management and using polyaspartic acid urea. Field Crops Research, 169: 30-38.

DI BONAVENTURA, G., STEPANOVIC, S., PICCIANI, C., POMPILIO, A., and PICCOLOMINI, R. 2007. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia Microbiologica, 52: 86.

DIMKPA, C., WEINAND, T., and ASCH, F. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell and Environment, 32: 1682-1694.

DONG, H., LI, W., ENEJI, A. E., and ZHANG, D. 2012. Nitrogen rate and plant density effects on yield and late-season leaf senescence of cotton raised on a saline field. Field Crops Research, 126: 137-144.

DUNNE, W. M., JR. 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev, 15: 155-166.

FARRAR, K., BRYANT, D., and COPE-SELBY, N. 2014. Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: Plant growth promotion in energy crops. Plant Biotechnology Journal, 12: 1193-1206.

FLEMMING, H.-C. and WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. Nat Rev Micro, 8: 623-633.
FLEMMING, H.-C. and WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8: 623-633.
FLOWERS, T. and YEO, A. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? Functional Plant Biology, 22: 875-884.
FUJISHIGE, N. A., KAPADIA, N. N., and HIRSCH, A. M. 2006. A feeling for the micro-organism: Structure on a small scale. Biofilms on plant roots. Botanical Journal of the Linnean Society, 150: 79-88.
FUJISHIGE, N. A., KAPADIA, N. N., DE HOFF, P. L., and HIRSCH, A. M. 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology, 56: 195-206.
GONZALEZ-LOPEZ, J., RODELAS, B., POZO, C., SALMERÓN-LÓPEZ, V., MARTINEZ-TOLEDO, M., and SALMERÓN, V. 2005. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. Amino acids, 28: 363-367.
HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., and STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2: 95.
HARJAI, K., KHANDWAHA, R. K., MITTAL, R., YADAV, V., GUPTA, V., and SHARMA, S. 2005. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiologica, 50: 99-102.
HAYAT, R., ALI, S., AMARA, U., KHALID, R., and AHMED, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. Annals of Microbiology, 60: 579-598.
HEBBAR, K. P., GUENIOT, B., HEYRAUD, A., COLIN-MOREL, P., HEULIN, T., BALANDREAU, J., and RINAUDO, M. 1992. Characterization of exopolysaccharides produced by *Rhizobacteria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 38: 248-253.
HIDER, R. and KONG, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. Natural product reports, 27: 637-657.
HÖFLICH, G., WIEHE, W., and KÜHN, G. 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. Experientia, 50: 897-905.
HORSWILL, A. R., STOODLEY, P., STEWART, P. S., and PARSEK, M. R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387: 371-380.
HOSTACKA, A, and I., C. 2007. Biofilm formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 depending on culture media, 56:2-4
HOSTACKA, A., CIZNAR, I., and STEFKOVICOVA, M. 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. Folia Microbiologica, 55: 75-78.
JEFFERSON, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters, 236: 163-173.
JIMENEZ, D. J., MONTANA, J. S., and MARTINEZ, M. M. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown colombian soils. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 846-858.

JOO, H.-S. and OTTO, M. 2012. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chemistry & Biology, 19: 1503-1513.
KANNAN, T. and PONMURUGAN, P. 2018. Response of paddy (*Oryza sativa* L.) varieties to *Azospirillum brasilense* inoculation, 18: 8-13.
KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM, S., LAKSHMI SAIKIA, S., and R.S, A. 2014. Evaluation of persistence and plant growth promoting effect of bioencapsulated formulation of suitable bacterial biofertilizers, 11: 1-2.
KASIM, W. A., GAAFAR, R. M., ABOU-ALI, R. M., OMAR, M. N., and HEWAIT, H. M. 2016. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. Annals of Agricultural Sciences, 61: 217-227.
KIMANI, V. N., CHEN, L., LIU, Y., RAZA, W., ZHANG, N., MUNGAI, L. K., SHEN, Q., and ZHANG, R. 2016. Characterization of extracellular polymeric substances of *Bacillus amyloliquefaciens* sqr9 induced by root exudates of cucumber. Journal of Basic Microbiology, 56: 1183-1193.
KIZILKAYA, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering, 33: 150-156.
KIZILKAYA, R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter spp*. Strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India, 30: 73-82.
KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., and TAMURA, K. 2018. Mega x: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol, 35: 1547-1549.
KUMAR, V. and NARULA, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biology and Fertility of Soils, 28: 301-305.
LEE, S., CHOI, K.-H., and YOON, Y. 2014. Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. Korean journal for food science of animal resources, 34: 257-261.
LENART-BORON, A. 2011. Occurrence, characteristics, and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of southern Poland. Polish Journal of Environmental Studies, 21: 415-424.
LI, D.-P. and WU, Z.-J. 2008. Impact of chemical fertilizers application on soil ecological environment. The journal of applied ecology, 19: 1158-1165.
LIBRADO, P. and ROZAS, J. 2009. Dnasp v5: A software for comprehensive analysis of dna polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451-1452.
LUGTENBERG, B. and KAMILOVA, F. 2009. Plant-growth-promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541-556.
MACFADDIN. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. , p. Pages. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 912: 486-495.
MACFARLANE, G. T. and HERBERT, R. A. 1984. Dissimilatory nitrate reduction and nitrification in estuarine sediments. Microbiology, 130: 2301-2308.
MARSDEN, A. E., GRUDZINSKI, K., ONDREY, J. M., DELONEY-MARINO, C. R., and VISICK, K. L. 2017. Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri.*PLOS ONE, 12: 0169521.
MARTINEZ-VIVEROS, O., JORQUERA, M. A., CROWLEY, D. E., GAJARDO, G., and MORA, M. L. 2010. Mechanisms and practical considerations

involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. Journal of soil science and plant nutrition, 10: 293-319.

MENESES, C. H. S. G., ROUWS, L. F. M., SIMÕES-ARAÚJO, J. L., VIDAL, M. S., AND BALDANI, J. I. 2011. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24: 1448-1458.

MIZAN, M. F. R., ASHRAFUDOULLA, M., SADEKUZZAMAN, M., KANG, I., and HA, S.-D. 2018. Effects of NaCl, glucose, and their combinations on biofilm formation on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) surfaces by *Vibrio parahaemolyticus.* Food Control, 89: 203-209.

MONIB, M., ABD-EL-MALEK, Y., HOSNY, I., and FAYEZ, M. 1979. Seed inoculation with *Azotobacter chroococcum* in sand cultures and its effect on nitrogen balance. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes, 134: 243-248.

MORAES, J. O., CRUZ, E. A., PINHEIRO, I., OLIVEIRA, T. C. M., ALVARENGA, V., SANT'ANA, A. S., and MAGNANI, M. 2019. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by ph, temperature and nacl. Food Microbiology, 83: 95-103.

NAG, N., DASH, B., GUPTA, S., KHOKHER, D., and SONI, R. 2018. Evaluation of stress tolerance of *Azotobacter* isolates. Biologija, 64.

NASERI, R., MOGHADAM, A., DARABI, F., HATAMI, A., and TAHMASEBEI, G. 2013. The Effect of deficit irrigation and *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on grain yield, yield components of maize (S.C. 704) as a second cropping in western Iran. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci., 2(10):104-112

NEI, M. and KUMAR, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics, p. 126. Oxford University Press, New York

OJHA, R. B. and MARAHATTHA, A. 2015. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability–a review. 2(6):250–253

OMAR, M. N. A., OSMAN, M. E. H., KASIM, W. A., and ABD EL-DAIM, I. A. 2009. Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasilense*, p. 133-147. *In* M. Ashraf, M. Ozturk and H. R. Athar (eds.), Salinity and water stress: Improving crop efficiency, Springer Netherlands, Dordrecht.

ÖZEN, A. I. and USSERY, D. W. 2012. Defining the *Pseudomonas* genus: Where do we draw the line with *Azotobacter.*Microb Ecol*,* 63: 239-248

P. STOODLEY, K. SAUER, D. G. DAVIES, and COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology, 56: 187-209.

QURASHI, A. W. and SABRI, A. N. 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. Brazilian Journal of Microbiology, 43: 1183-1191.

ROJAS-TAPIAS, D., MORENO-GALVAN, A., PARDO-DIAZ, S., OBANDO, M., RIVERA, D., and BONILLA, R. 2012. Effect of inoculation with plant growth-

promoting bacteria (pgpb) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). Applied Soil Ecology, 61: 264-272.
RONQUIST, F. and HUELSENBECK, J. P. 2003. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19: 1572-1574.
RUBIO, E. J., MONTECCHIA, M. S., TOSI, M., CASSÁN, F. D., PERTICARI, A., and CORREA, O. S. 2013. Genotypic characterization of Azotobacteria isolated from argentinean soils and plant-growth-promoting traits of selected strains with prospects for biofertilizer production. The Scientific World Journal, 519603: 1-4.
S. RAJAEE, H. A. ALIKHANI, and F. RAIESI. 2007. Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. Journal of Crop production and processing, 11: 285-297.
SABER, M.S.M., 2001. Clean Biotechnology for sustainable farming. Eng. Life Sci., 1: 217-223.
SAHOO, R. K., ANSARI, M. W., DANGAR, T. K., MOHANTY, S., and TUTEJA, N. 2014. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. Protoplasm, 251: 511-523.
SALHIA, B. 2013. The effect of *Azotobacter chrococcum as* nitrogen biofertilizer on the growth and yield of *Cucumis sativus.* The Islamic University Gaza, Deanery of Higher Education Faculty of Science, Master of Biological Sciences, Botany, 21551: 26-38.
SANCHEZ, C. J., MENDE, K., BECKIUS, M. L., AKERS, K. S., ROMANO, D. R., WENKE, J. C., and MURRAY, C. K. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases, 13: 47.
SAVARI, M. and GHARECHAEE, H. 2020. Application of the extended theory of planned behavior to predict iranian farmers' intention for safe use of chemical fertilizers. Journal of Cleaner Production, 263: 12-15.
SAVCI, S. 2012. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. APCBEE Procedia, 1: 287-292.
SHAMRUKH, M., CORAPCIOGLU, M. Y., and HASSONA, F. A. A. 2001. Modeling the effect of chemical fertilizers on ground water quality in the nile valley aquifer, Egypt. Groundwater, 39: 59-67.
SHIELDS, P. and CATHCART, L. 2010. Oxidase test protocol. American Society for Microbiology, 12:
SHIVPRASAD, S. and PAGE, W. J. 1989. Catechol formation and melanization by Na^+-dependent *Azotobacter chroococcum*: A protective mechanism for aeroadaptation? Applied and Environmental Microbiology, 55: 1811-1817.
SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J., and SRINIVASAN, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. Critical reviews in microbiology, 30: 205-240.
SUTHERLAND, I. W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology, 9: 222-227.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., and KUMAR, S. 2013. Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

TEJERA, N., LLUCH, C., MARTINEZ-TOLEDO, M. V., and GONZALEZ-LOPEZ, J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the Sugarcane rhizosphere. Plant and Soil, 270: 223-232.

TRIVENI, S., PRASANNA, R., SHUKLA, L., AND SAXENA, A. K. 2013. Evaluating the biochemical traits of novel trichoderma-based biofilms for use as plant growth-promoting inoculants. Annals of Microbiology, 63: 1147-1156.

VELMOUROUGANE, K., PRASANNA, R., CHAWLA, G., NAIN, L., KUMAR, A., and SAXENA, A. K. 2019. *Trichoderma–Azotobacter* biofilm inoculation improves soil nutrient availability and plant growth in wheat and cotton. Journal of Basic Microbiology, 59: 632-644.

VELMOUROUGANE, K., PRASANNA, R., SINGH, S. B., KUMAR, R., and SAHA, S. 2017. Sequence of inoculation influences the nature of extracellular polymeric substances and biofilm formation in *Azotobacter chroococcum* and *Trichoderma viride*. FEMS Microbiology Ecology, 93: 13-17.

VELMOUROUGANE, K., PRASANNA, R., SINGH, S., CHAWLA, G., KUMAR, A., and SAXENA, A. K. 2017. Modulating rhizosphere colonisation, plant growth, soil nutrient availability and plant defense enzyme activity through *Trichoderma viride-Azotobacter chroococcum* biofilm inoculation in chickpea. Plant and Soil, 421: 157-174.

VELMOUROUGANE, K., PRASANNA, R., SUPRIYA, P., RAMAKRISHNAN, B., THAPA, S., and SAXENA, A. K. 2019. Transcriptome profiling provides insights into regulatory factors involved in *Trichoderma viride-Azotobacter chroococcum* biofilm formation. Microbiological Research, 227: 126-292.

VESSEY, J. K. 2003. Plant growth promoting Rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255: 571-586.

VIKHE, P. S. 2014. *Azotobacter* species as a natural plant hormone synthesizer, p. 59–63. vol. 3. Research Journal of Recent Sciences.

WANG, Y., ZHU, Y., ZHANG, S., and WANG, Y. 2018. What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers? Journal of Cleaner Production, 199: 882-890.

WANI, S., CHAND, S., WANI, M., RAMZAN, M., and HAKEEM, K. 2016. *Azotobacter chroococcum* a potential biofertilizer in agriculture: An overview, p. 333-348.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., and LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal dna amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697-703.

WELLER, D. M. and THOMASHOW, L. S. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere, p. 1-18. *In* F. O'Gara, D. N. Dowling and B. Boesten (eds.), VCH, New York,.

WESELOWSKI, B., NATHOO, N., EASTMAN, A. W., MACDONALD, J., and YUAN, Z.-C. 2016. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* cr1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. BMC Microbiology, 16: 244.

XU, H., ZOU, Y., LEE, H.-Y., and AHN, J. 2010. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. Journal of Food Science. 75, M580-M585.
YANNI, Y. and ABD EL-FATTAH, F. K. 1999. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta, p. Pages.
YASMEEN, T., AHMAD, A., ARIF, M. S., MUBIN, M., REHMAN, K., SHAHZAD, S. M., IQBAL, S., RIZWAN, M., ALI, S., ALYEMENI, M. N., and WIJAYA, L. 2020. Biofilm forming Rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity. Plant Physiology and Biochemistry, 156: 242-256.