



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAZI
BAKTERİLERİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM
YAPILARININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE
KARAKTERİZASYONU**

Tacettin ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2022



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAZI
BAKTERİLERİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM
YAPILARININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE
KARAKTERİZASYONU**

Tacettin ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ERDOĞAN

KIRŞEHİR / 2022

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 bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin ZRT.A4.21.036 ve ZRT.A4.20.002 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

Tacettin ÇİFTÇİ



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Çalışmamın tamamlanmasındaki bilgi, birikim, yardım ve desteklerinden dolayı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ERDOĞAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat ÇINARLI'ya, Öğr. Gör. Dr. Ayşe ÇANDAR ile sabır ve destekleri için aileme teşekkür ediyorum.

Bakteri stok kültürlerinin yanında bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşarak biyofilm çalışmaları için bize laboratuvarını açan başta Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK olmak üzere tüm Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Prokaryot Genetiği Laboratuvarı öğrenci ve çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2022

Tacettin ÇİFTÇİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE ve KISALTIMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyofilm Oluşumu ve Yapısı	4
2.2. Biyofilmlerin Tarımsal Açıdan Önemi	5
2.2.1. Biyofilm Üreten PGPR'ler	8
2.3. Biyofilm Analizinde Kullanılan Yöntemler	9
2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	11
2.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi	12
2.3.3. Raman Spektroskopisi.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Bakteri Suşları ve Gelişme Koşulları.....	15
3.2. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi	15
3.3. MS (Murashige ve Skoog) Besiyeri Hazırlanışı	16
3.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> Tohumlarının Çimlendirilmesi.....	16
3.5. Bakteri İnokülasyonu ve SEM (Scanning Electron Microscopy) İçin Fiksasyon	16
3.6. Biyofilm Yapılarının SEM İle Görüntülenmesi.....	16
3.7. Biyofilm Yapılarının FT-IR Spektroskopisi İle Analizi	17
3.8. Biyofilm Yapılarının Raman Spektroskopisi İle Analizi.....	18
4. BULGULAR	21
4.1. Polistren Yüzeylerde Biyofilm Oluşum Miktarları	21
4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia Ekotipi Kök Uzunlukları	21
4.3. Bakterilerin Bitki Köklerindeki Kolonizasyonunun Görüntülenmesi (SEM)	23
4.3. Biyofilm Yapılarının FT-IR Spektrumları	28

4.4. Biyofilm Yapılarının Raman Spektrumları.....	32
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	36
KAYNAKLAR.....	40
EKLER	48
ÖZGEÇMİŞ	49



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Bakterilerin yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu	4
Şekil 2.2. Biyofilmlerin kanal bağlantıları ve metabolit alışverişi.....	5
Şekil 2.3. Biyofilmlili biyogübrelerin yararları ve uygulama alanları (Pandit vd., 2020).....	9
Şekil 2.4. Biyofilm bileşenleri üzerinde kullanılan analiz yöntemlerinin şekilsel gösterimi.....	11
Şekil 2.5. Elektron mikroskobu çalışma prensibi (http://nukbilimler.ankara.edu.tr/elektron-mikroskobu/).....	11
Şekil 2.6. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	12
Şekil 3.1. Zeiss Evo 40 taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	16
Şekil 3.2. Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spektrometresi.....	17
Şekil 3.3. JASCO NRS4500 Konfokal Mikroskoplu Raman Spektrometresi.....	19
Şekil 4.1 <i>Bacillus drentensis</i> , <i>Bacillus mojavensis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> ve <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterilerinin biyofilm oluşturma miktarları	21
Şekil 4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia bitkileri (2 haftalık büyüme sonundaki durumu).....	22
Şekil 4.3. <i>Bacillus drentensis</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	23
Şekil 4.4. <i>Bacillus drentensis</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	24
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	24
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	25
Şekil 4.7. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	26

Şekil 4.8. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	27
Şekil 4.9. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü.....	28
Şekil 4.10. <i>Bacillus drentensis</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu.....	29
Şekil 4.11. <i>Pseudomonas fluorescens</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu.....	29
Şekil 4.12. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu.....	30
Şekil 4.13. <i>Pseudomonas putida</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu.....	30
Şekil 4.14. <i>Bacillus mojavensis</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu.....	31
Şekil 4.15. <i>Bacillus drentensis</i> (K6-1), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (K4-1), <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> (KH3-1), <i>Pseudomonas putida</i> (Ç1-1), <i>Bacillus mojavensis</i> (P5-1) bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının karşılaştırılmalı FT-IR spektrumları.....	31
Şekil 4.16. <i>Bacillus drentensis</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu.....	32
Şekil 4.17. <i>Pseudomonas fluorescens</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu.....	33
Şekil 4.18. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu.....	33
Şekil 4.19. <i>Pseudomonas putida</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu.....	34
Şekil 4.20. <i>Bacillus mojavensis</i> bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu.....	34
Şekil 4.21. <i>Pseudomonas fluorescens</i> (K4-1), <i>Bacillus drentensis</i> (K6-1), <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> (KH3-1), <i>Bacillus mojavensis</i> (P5-1), <i>Pseudomonas putida</i> (Ç1-1) bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının karşılaştırılmalı Raman spektrumları.....	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Belirli atanmış bileşenlerle FT-IR titreşim tipinde elde edilen en önemli bantlar. Biyofilm numunelerinin spektrumları ve belirli atanmış bileşenlere sahip titreşim türleri (Gieroba ve ark., 2020).....18

Tablo 3.2. Biyofilm örneklerinin Raman spektrumlarında elde edilen en önemli bantlar ve belirli atanmış bileşenlere sahip titreşim türleri. (Gieroba ve ark., 2020).....20



SİMGE ve KISALTMA LİSTESİ

Simgeler ve Kısaltmalar Açıklama

AAS	Atomik absorpsiyon spektroskopisi
AFS	Atomik floresans spektrometrisi
CLSM	Konfokal lazer taramalı mikroskobu
EBL	Elektrotsuz boşalım lambaları
EPS	Hücre dışı polimerik madde
ETAAS	Elektrotermal atomik absorpsiyon spektrometrisi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GF-AAS	Grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometrisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICP-OES	İndüktif olarak eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometrisi
IR	Kızılötesi spektroskopisi
NAA	Nötron aktivasyon analiz
OKL	Oyuk katot lambası
PGPR	Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Surface-enhanced raman spectroscopy
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDİCİ BAZI BAKTERİLERİN OLUŞTURDUĞU BİYOFİLM YAPILARININ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE KARAKTERİZASYONU

Tacettin ÇİFTÇİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ERDOĞAN

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), bitki rizosferinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bakteriler bitki kök gelişimini arttırmakta ve bitkilere daha iyi büyümeleri için maksimum besin maddesi alma fırsatları sağlamaktadır. Büyüme teşvik etmenin yanı sıra, PGPR'lerin stres toleransı (ısı, kuraklık, tuzluluk ve hastalık), ağır metallerin biyoremediasyonu, karmaşık toksik organik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması, biyo-kontrol ajanları ve biyofilm oluşumu gibi bir dizi işlevi vardır. Çeşitli bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler arasındaki etkileşim, esas olarak planktonik büyüme modu altında araştırılmıştır. Bununla birlikte, PGPR'nin biyofilm modunda kök yüzeyi ve toprak üzerindeki davranışının anlaşılması için yapılan çalışmalar çok yenidir ve bu alanla ilgili daha fazla araştırmaya gerek olduğu aşikârdır. Bu nedenle, bitki-mikroorganizma etkileşiminin anlaşılmasına katkı sağlamak için kök yüzeyi ve rizosfer kolonizasyonu üzerindeki biyofilm gelişiminin derinlemesine araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Kızılötesi ve Raman spektroskopileri, biyofilmlerin moleküler yapısı hakkında spektral bilgi elde etmek için birbirini tamamlayıcı olarak kullanılan titreşim spektroskopisi

teknikleridir. Kızılötesi spektroskopisi (IR) biyofilmleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sudan kaynaklanan müdahale hidratlı biyofilmlerin bileşiminde kullanımını sınırlandırmıştır. Dağınık fotonların frekansları moleküldeki bağların türlerine bağlı olduğundan, her molekülün Raman spektrumu benzersizdir ve bu molekülün parmak izi olarak düşünülebilir. Raman spektroskopisinin kırınım ile sınırlı uzamsal çözünürlüğü yaklaşık 1 µm'dir ve bu, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküller ve moleküler gruplar içeren karmaşık yapıların ayrıntılı analizini sağlamaktadır.

Bu çalışmada; bitki büyümesini teşvik edici özellikleri olan *Bacillus drentensis*, *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının Raman ve FT-IR Spektroskopisi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole deneyi ile belirlenmiş ve *Bacillus drentensis*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterilerinin ise *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipi köklerindeki kolonizasyonları Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi ile belirlenmiştir.

Mayıs 2022 – 64 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, PGPR, SEM, Raman Spektroskopisi, FT-IR

ABSTRACT

M. Sc. THESIS

Characterization of Biofilm Structures Produced by Some Bacteria that Promote Plant Growth by Raman Spectroscopy

Tacettin ÇİFTÇİ

Kirsehir Ahi Evran University, Faculty of Agriculture

Department of Agricultural Biotechnology

Plant Biotechnology Division

Supervisor: Asst. Prof. Ibrahim ERDOGAN

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are common in the rhizosphere. These bacteria increase plant root development and provide plants with maximum nutrient uptake opportunities for better growth. Besides promoting growth, PGPRs have a number of functions including stress tolerance (heat, drought, salinity and disease), bioremediation of heavy metals, biodegradation of complex toxic organic compounds, biocontrol agents and biofilm formation. The interaction between various plant growth promoting rhizobacteria was mainly investigated under the planktonic growth mode. However, studies to understand the behavior of PGPR on root surface and soil in biofilm mode are very recent and it is clear that more research is needed in this area. Therefore, in-depth investigation of biofilm development on root surface and rhizosphere colonization is needed to improve understanding of plant-microorganism interaction.

Infrared and Raman spectroscopy are vibration spectroscopy techniques that are used complementary to each other to obtain spectral information about the molecular structure of biofilms. Although infrared spectroscopy (IR) is widely used to characterize biofilms, interference from water has limited its use in the composition of hydrated biofilms. Since the frequencies of scattered photons depend on the types of bonds in the molecule, the Raman spectrum of each molecule is unique and can be thought of as that molecule's

fingerprint. The diffraction-limited spatial resolution of Raman spectroscopy is about 1 μm , enabling detailed analysis of complex structures containing various molecules and molecular groups such as proteins, carbohydrates, lipids, and nucleic acids.

In this study; The biofilm structures formed by *Bacillus drentensis*, *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Arthrobacter nitroguajacolicus* bacteria, which have plant growth promoting properties, were characterized by Raman and FT-IR Spectroscopy. In addition, the biofilm formation capacity of these bacteria on polystyrene surfaces was determined by the crystal violet test, and the colonization of *Bacillus drentensis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Arthrobacter nitroguajacolicus* bacteria on *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype roots was determined by Scanning Electron Microscope (SEM) analysis.

May 2022 - 64 Pages

Keywords: Biofilm, PGPR, SEM, Raman Spectroscopy, FT-IR

1. GİRİŞ

Günümüz şartlarında tarım; hayvancılığa olan talebin artması ve giderek artan insan nüfusunun gıda ihtiyacına karşılık verebilmek için sürdürülebilir tarımsal üretim, sınırlı kaynakların kullanılması (verimli topraklar gibi), geleneksel tarım uygulamalarından kaynaklanan yoğun çevresel sorunların giderilmesi gibi farklı zorluklarla karşı karşıyadır. Bu sorunlar, gıda verimliliğini arttırmak için kimyasal gübre yerine mikroorganizma içerikli organik gübrelerin kullanımı yoluyla ve bu amaçla yerli toprak mikroorganizmalarının keşfi ve kullanılması ile minimize edilebilir (Küçük, 2019). Zengin toprak mikroflorası arasında, bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (PGPR), bir dizi yararlı etki yoluyla bitki büyümesini artırmada önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bu genellikle, rizosferdeki planktonik bakteri varlığına göre avantajları olan biyofilmler oluşturarak elde edilmektedir. Ancak, bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri geçmişte yapılan araştırmalarda ihmal edilmiştir. Geleneksel olarak, bakteri hücreleri serbest yaşayan hücreler olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir, ancak farklı çevresel koşullar altında biyofilm oluşturma yetenekleri vardır (Omar ve ark. 2017). Biyofilm oluşumu ve yayılımının çok iyi tanımlanmış ve aşağıdaki aşamaları içerdiği bilinmektedir: ilk bağlanma, hücreler arası bağlanma, desorpsiyon, biyofilm olgunlaşması ve biyofilm dağılımı (Achinas ve ark., 2019). Biyofilmlerin ayrıca azot ve fosfor gibi kompleks besin maddeleri içeren farklı bileşikler parçaladığı bildirilmiştir (Ikuma ve ark. 2013). Biyotik yüzeylerle biyofilm ilişkilendirmeleri hakkındaki araştırmalar önem kazanmaya başlamış ve bu, tarımda bakteriyel biyofilmlerin kullanımına ivme kazandırmıştır (Singh ve Chauhan 2017). PGPR tarafından gerçekleştirilen biyofilm yapıları, doğal koşullar altında ortak bir yaşam tarzı olarak kabul edilir ve bitkiler için biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı koruma sağlamaktadır (Angus ve Hirsch, 2013). Bitki büyümesini teşvik eden çeşitli rizobakteriler arasındaki etkileşim, esas olarak bakterilerin planktonik büyüme modu altında araştırılmıştır (Vardharajula ve ark., 2011; Jung ve ark., 2018). Bununla birlikte, PGPR'nin bitkilerin kök yüzeyleri ve topraktaki biyofilm modundaki davranışları hakkında daha çok araştırmaya ve bilgiye ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ana amaçlarından biri de bu alana katkı sunmaktır. Yapılan araştırmalarda tarım sektörüne odaklanan biyofilimli biyogübrelerin önemli potansiyel faydalarının olabileceği belirtilmiştir. Bu tür ürünlerin, bitkiyi sadece çeşitli çevre ve toprak kaynaklı hastalıklara karşı değil, aynı zamanda tuzluluk, kuraklık, inorganik ve organik kirleticiler gibi abiyotik streslere karşı

koruyabileceği ve potansiyel olarak ürün verimliliğini artıracakı belirtilmiştir (Malus ve ark. 2012).

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), rizosferde yaygın olarak bulunmakta, kök gelişimini artırmakta ve bitkiye daha iyi büyümeleri için maksimum besin maddesi alma fırsatları sağlamaktadır (Bloemberg ve Lugtenberg 2004). Büyüme teşvik etmenin yanı sıra, PGPR'lerin stres toleransı (ısı, kuraklık, tuzluluk ve hastalık), ağır metallerin biyoremediasyonu, karmaşık toksik organik bileşiklerin biyolojik olarak parçalanması, biyo-kontrol ajanları ve biyofilm oluşumu gibi bir dizi işlevi vardır (Kasim ve ark., 2016). Kızılötesi ve Raman spektroskopileri, biyofilmlerin moleküler yapısı hakkında spektral bilgi elde etmek için birbirini tamamlayıcı olarak kullanılan titreşim spektroskopi teknikleridir. Kızılötesi spektroskopi (IR) biyofilmleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sudan kaynaklanan müdahale hidratlı biyofilmlerin bileşiminde kullanımını sınırlandırmıştır (Suci ve ark., 1997). Suya atfedilen spektral -OH bandı, bir biyofilmdeki bileşenlerin diğer karakteristik bantlarını bastırır. Raman spektroskopisi, fotonlar gelen ışığın frekansından daha düşük veya daha yüksek frekansla molekülden saçıldıklarında meydana gelen Raman saçılımına dayanmaktadır (Lohumi ve ark., 2017). Dağınık fotonların frekansları moleküldeki bağların türlerine bağlı olduğundan, her molekülün Raman spektrumu benzersizdir ve bu molekülün parmak izi olarak düşünülebilir. Raman spektroskopisinin kırınımla sınırlı uzamsal çözünürlüğü yaklaşık 1 µm'dir ve bu, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküller ve moleküler gruplar içeren karmaşık yapıların ayrıntılı analizini sağlamaktadır. Bu dikkat çekici özelliğinin yanı sıra tahribatsız bir tekniktir; bu nedenle numune hazırlama diğer tekniklere göre daha kolaydır. Numunelerin boyanmasına ve kurutulmasına da gerek yoktur çünkü suyun Raman saçılması diğer moleküllere göre çok zayıftır (örneğin, Raman spektroskopisinde sudan herhangi bir etkileşim yoktur) (Lohumi ve ark., 2017).

Çeşitli bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler arasındaki etkileşim, esas olarak planktonik büyüme modu altında araştırılmıştır. Bununla birlikte, PGPR'nin biyofilm modunda kök yüzeyi ve toprak üzerindeki davranışının anlaşılması için yapılan çalışmalar çok yenidir ve bu alanla ilgili daha fazla araştırmaya gerek olduğu aşikârdır. Rizobakterilerin çoğu in - vitro biyofilm oluşturabilir, ancak toprak-bitki kök sistemindeki koşullar farklı olduğundan kökle ilişkili biyofilm in situ olarak henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle, bitki-mikroorganizma etkileşiminin anlaşılmasını artırmak için kök yüzeyi ve

rizosfer kolonizasyonu üzerindeki biyofilm gelişiminin derinlemesine araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada; bitki büyümesini teşvik edici özellikleri olan *Bacillus drentensis*, *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının Raman ve FT-IR Spektroskopisi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole deneyi ile belirlenmiş ve *Bacillus drentensis*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterilerinin ise *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipi köklerindeki kolonizasyonları SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi ile belirlenmiştir.

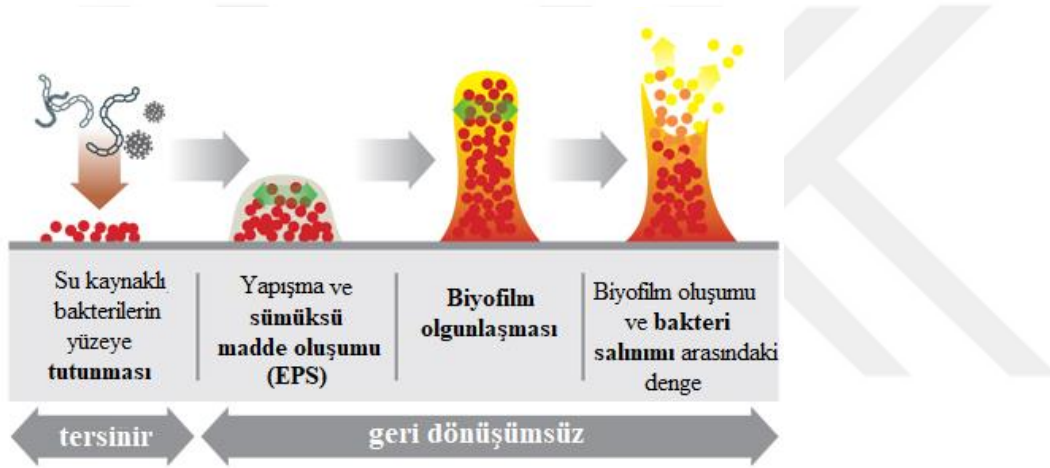


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm Oluşumu ve Yapısı

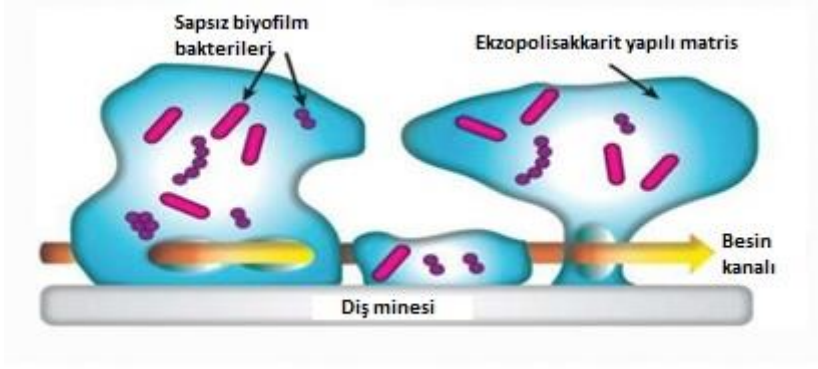
Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin ve polisakkaritler, lipitler, proteinler, genetik materyaller, hümit benzeri maddelerden oluşan hücre dışı polimerik maddelerin EPS (Extracellular Polymeric Substances) bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (Costerton et al., 1995; Keleştemur et al., 2018).

EPS, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye geri dönüşü olmayan bir şekilde tutunmasını sağlamak ve onları çevresel stres koşullarına karşı korumaktadır (Vu et al., 2009; Keleştemur et al., 2018).



Şekil 2.1. Bakterilerin yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu

Mikroorganizmalar tarafından geliştirilen biyofilm su oranı yüksek vizkozumsu (sümüksü yapıda) bir maddedir. Farklı kalınlıklarda oluşabilen biyofilmin yapısı karmaşıktır ve birbirine kanallarla bağlanmaktadır (Archer et al., 2011). Sözü edilen kanallar, sulu faz ve mikroorganizmalar arasında besin maddesi ve metabolitlerin alışverişini sağlamaktadır (Costerton et al., 1995).



Şekil 2.2. Biyofilmlerin kanal bağlantıları ve metabolit alışverişi

EPS'nin bileşimi mikroorganizmanın doğasına bağlı olarak değişmektedir. Gram-negatif bakterilerde EPS, nötr ve polianyonik polisakkaritlerden oluşurken, Gram-pozitif bakterilerde EPS oluşumu katyoniktir. Öte yandan pH, sıcaklık, oksijen ve nitrojen seviyeleri gibi çevresel koşullar ve ayrıca yüzey özellikleri de bir biyofilmin bileşimini etkilemektedir (Costerton ve ark., 1981; Ahimou ve ark., 2007).

Rizobakterilerin biyofilm gelişimi, doğal koşullar altında ortak bir yaşam tarzı olarak kabul edilmekte ve bir dizi biyotik ve abiyotik stres durumuna karşı koruma sağlamaktadır. Biyofilmler, kendi kendine üretilen hücre dışı polimerik maddeler (EPS) içinde bulunan bakteri topluluklarıdır. Doğada biyofilm, bakterilerin doğal ortamda hayatta kalmasına izin veren korumalı bir büyüme yöntemi oluşturmaktadır. Biyofilm gelişimiyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkilendirilen çeşitli özellikler arasında EPS üretimi, kümelenme ve yüzme hareketliliği, hücre yüzeyi hidrofobikliği ve *Pseudomonas* sp. ve diğer bakterilerde aljinat üretimi yer almaktadır (Angus ve Hirsch, 2013).

2.2. Biyofilmlerin Tarımsal Açıldan Önemi

Günümüz koşullarında tarım; hayvancılığa olan talebin artması ve giderek yükselen insan nüfusunun gıda ihtiyacına karşılık verebilmek için sürdürülebilir tarımsal üretim, sınırlı kaynakların kullanılması (verimli topraklar gibi), geleneksel tarım uygulamalarından kaynaklanan yoğun çevresel sorunların giderilmesi gibi çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Bu sorunlar, gıda verimliliğini arttırmak için kimyasal gübre yerine mikroorganizma içerikli organik gübrelerin kullanımı yoluyla ve bu amaçla yerli toprak mikroorganizmalarının keşfi ve kullanılması ile minimize edilebilmektedir (Küçük, 2019).

Bitki ile ilişkili toprak mikrobiyal toplulukları arasında, bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak bilinen bitki köklerinde kolonize olmuş yararlı bakteriler bitki

büyümesini güçlendirmede bir dizi yararlı etkiyi kullanan baskın gruplardan biri olarak kabul edilmektedir (Lugtenberg ve Kamilova 2009). Bitki büyümesine olumlu etkisi olan bakterilerin; kökleri çevreleyen toprak bölgesine yerleşmek, topraktaki diğer mikroorganizmalar ile rekabet halinde gelişmek, çoğalmak, hayatta kalmak ve bitki büyümesini, gelişmesini desteklemek gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Kloepper, 1994).

Biyofilm, kaynak rekabetini veya inhibe edici bileşiklerin üretimini etkileyebilmekte ve abiyotik streslere direnci artırabilmektedir (Rao ve ark. 2005). Bitki kök yüzeyleriyle ilişkili faydalı PGPR'lerin bitki verimindeki artışa katkıda bulunduğu bilinmektedir (Ryu ve ark., 2007). Çeşitli PGPR ile bitki büyümesini teşvik etme mekanizmaları, hem doğrudan (bitki hormonlarının üretimi, nitrojen fiksasyonu, fosfat çözündürme ve demiri ayırma) hem de dolaylı (antibiyotikler ve litik enzimler, indüklenmiş direnç, HCN üretimi ve rekabet) mekanizmalarıyla iyi bir şekilde araştırılmıştır (Kloepper ve ark., 1980; Ahmad ve ark., 2008; Bernard, 2012). Bununla birlikte, hayatta kalma ve rizosfer kolonizasyonunu etkileyen çevresel faktörler, PGPR performansında tutarlılığın sağlanmasında anahtar bir rol oynamaktadır. Biyofilmin doğal toprakta ekolojik dengeyi ve bitki büyümesini korumadaki rolü aydınlatılmış (Burmölle ve ark. 2012) ve planktonik modla karşılaştırıldığında antibakteriyel bileşiklere karşı artan direnç, kurumaya ve protozoan avlanmasına karşı gelişmiş koruma ve yüksek yatay gen transfer oranları gibi faydalar sağladığı belirlenmiştir (Davey ve O'toole, 2000; Jefferson, 2004; Sørensen ve ark., 2005).

PGPR 'nin rizosfere tutunduğu veya kolonize olduğu, bitkilerin büyümesini uyardığı ve bitki hastalıklarını baskıladığı bilinmektedir (Normander ve Prosser, 2000). Biyofilm oluşturan PGPR ile aşılamanın, biyofilm içermeyen aşılama yöntemlerine kıyasla daha iyi bitki büyümesi teşvikine sahip olduğunu gösteren kanıtlar vardır (Bianciotto ve ark., 2001). Başka bir çalışmada, biyofilm büyüme modu ile sağlanan direnç mekanizmasının bitkiyi stres durumundan koruduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014).

Genetik olarak çeşitlilik gösteren toprak kaynaklı bir patojen olan *Ralstonia solanacearum*'un meydana getirdiği vasküler bitki iletim demeti hasarı sonucu bakteriyel solgunluk hastalığı gelişmektedir (Hayward, 1991). Bu hastalık nedeniyle, bir bütün olarak tarım ve bahçe bitkileri özellikle dünya çapında risk altındadır. *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. gibi doğal rizobakteriler ve *Pseudomonas* spp. bu hastalığın biyolojik kontrolü için kullanılmaktadır (Lemessa ve Zeller, 2007; Xue ve ark., 2009). Önemli olarak *Bacillus*

subtilis, fitopatojenlere karşı geniş bir aktivite yelpazesine sahip bir dizi biyolojik aktif bileşik üretmektedir (Butcher ve ark., 2007; Ongena ve Jacques., 2008). *B.subtilis* biyofilm oluşturarak patojenik bakterilerle savaşmakta, ayrıca günümüzde ticari olarak biyolojik kontrol aktivitesi için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *B.subtilis* suşlarının Ralstonia solgunluk hastalığını etkili bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (Ji ve ark., 2008). Benzer şekilde, bir PGPR bakterisi olan *Paenibacillus polymyxa*, biyofilm benzeri yapılar oluşturarak ve ayrıca bitkileri bulaşıcı patojenlere karşı koruyarak bitki kök uçlarını kolonize etmektedir (Haggag ve Timmusk, 2008). *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir deneyde, *Bacillus subtilis* suşu (ATCC 6051) köklerde biyofilm benzeri yapılar oluşturmuş ve *Arabidopsis*'i *Pseudomonas syringae* enfeksiyonundan korumuştur (Bais ve Vivanco, 2004).

Temelde kök ile ilişkili *Pseudomonas* sp. biyokontrol ajanları olarak kullanılmakta ve oldukça yoğun bir biyofilm oluşturması nedeniyle *Pseudomonas* biyofilm çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır (Butcher ve ark., 2007). *Pseudomonas putida*, rizosferde kök eksüdatalarının varlığında hızlı yanıt verme kabiliyetine sahiptir ve biyofilm oluşturmak için kök yüzeyinde kolonileşmektedir (Ongena ve Jacques., 2008). Epidermal çatlaklar boyunca, bitki büyümesini teşvik eden *Pseudomonas*, kök yüzeyinde küçük biyofilmler ve büyük biyofilm oluşturmak için kesintili olarak kolonileşmektedir (Bais ve Vivanco, 2004). Bunun yanı sıra, bazı patojenik *Pseudomonas* sp. türleri kök yüzeyinde de biyofilmler oluşturmaktadır (Lugtenberg ve ark., 2001; Espinosa-Urgel ve ark., 2002). *Pseudomonas* sp. türleri çok çeşitli, çok hücreli kümeler ve çok kapsamlı biyofilm ağları oluşturmaktadır.

Mısır, buğday ve tahıllarda, kök yüzeyinde biyofilm oluşturan bitki büyüme destekleyicileri olarak *A.brasilense* ve diğer *Azospirillum* sp. türleri bulunmaktadır (Bloemberg ve ark., 2000). Doğası gereği *Azospirillum brasilense*, bitkiye hazır nitrojen sağlamak yerine bitki büyümesini destekleyen ve kök çoğalmasını uyaran, serbest yaşayan bir nitrojen sabitleyicidir. Bakteriler kolonizasyonla kök bölgesinde yoğun biyofilm oluşturmaktadır (Walker ve ark. 2004).

2.2.1.Biyofilm Üreten PGPR'ler

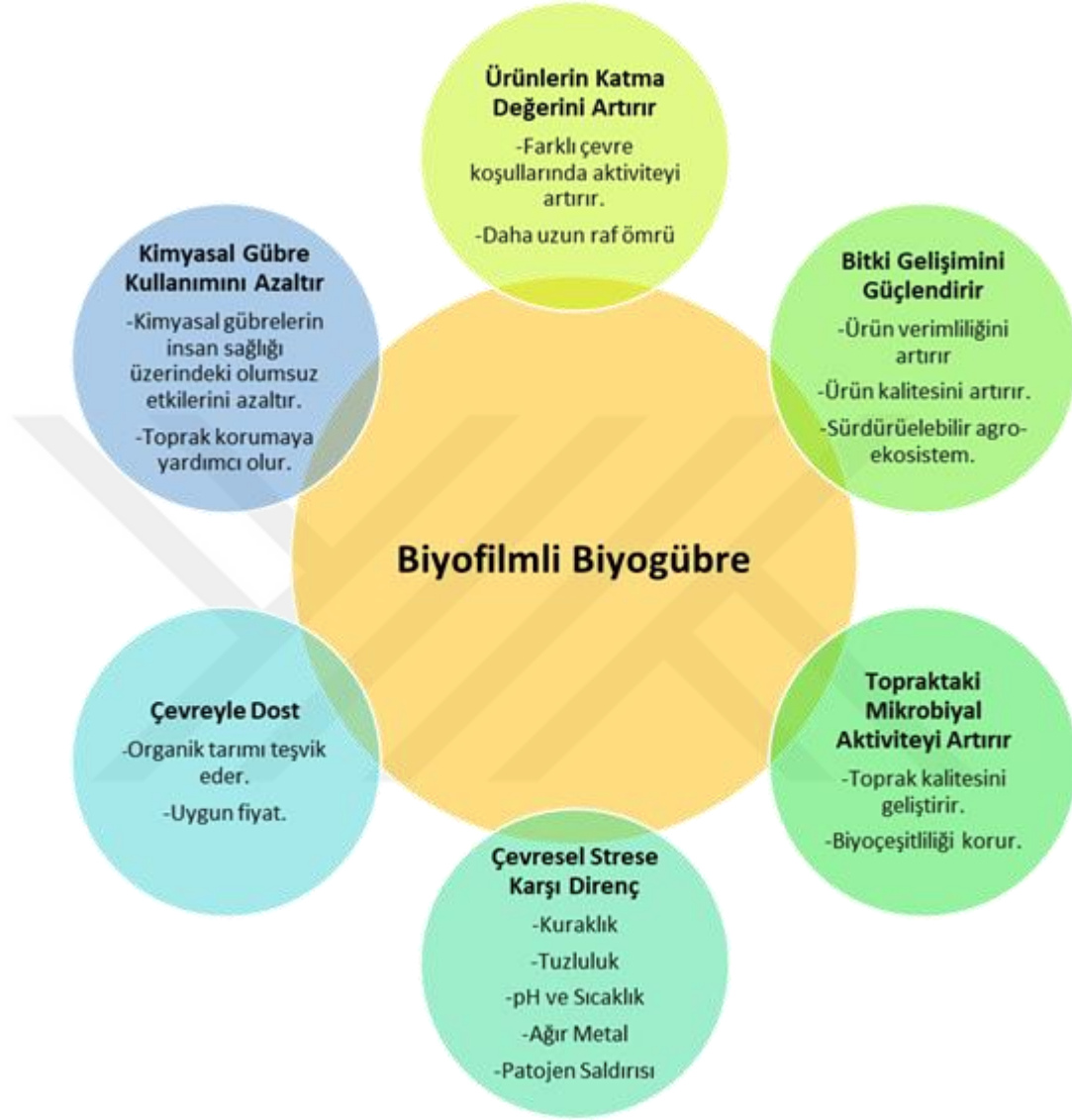
Genel olarak, PGPR, biyofilm oluşumu sürecinde dört aşamada yer almaktadır:

- 1) Tek bir bakterinin bir yüzeye başlangıçta tersine çevrilebilir bağlanması, bakteriler tarafından daha güçlü, geri döndürülemez bir bağlanmaya yol açmaktadır.
- 2) Biyofilm mimarisinin erken aşama gelişimi ile mikrokoloni oluşumu
- 3) Biyofilm olgunlaşması
- 4) Biyofilmden tek hücrelerin nihai dağılımı (Schuster ve Markx, 2013). PGPR genellikle bir yüzeye bağlanmakta ve bir biyofilmin özelliği olan polimerik bir madde ile kaplanmaktadır (Mann ve Wozniak, 2012).

Pseudomonas türleri, polisakaritler, nükleik asitler ve biyofilm matrisleri oluşturmak için kullanılan proteinler dâhil olmak üzere çeşitli organik moleküller üretmektedir. *Rhizobium* tarafından salınan EPS, bitki büyümesini artıran ve patojenlerden koruma sağlayan biyofilm oluşumuna yardımcı olmaktadır (Arora ve ark., 2013).

İn vitro olarak geliştirilebilen ve biyogübre olarak kullanılabilen faydalı biyofilmlere biyofilmlenmiş biyogübreler denmektedir. Bazı mahsullerin bitki köklerine bağlanan faydalı biyofilmlerin, besin döngüsüne ve ayrıca zararlıların ve hastalıkların biyolojik kontrolüne yardımcı olduğu ve sonuç olarak üretkenliği ve mahsul verimini iyileştirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, rizobiyal polisakaritler, bitki büyümesini teşvik etmede oldukça önemlidir, faydalı etkileşimler sırasında aktif bir sinyal molekülü olarak çalışmakta ve enfeksiyon sürecinde savunma yanıtı sağlamaktadırlar (Parada ve ark., 2006). Bazı PGPR-EPS yani PGPR'lerin ürettiği EPS'ler, Na⁺ dahil katyonları da bağlayabilmekte, bu da bitkinin topraktan aldığı mevcut Na⁺ içeriğini azaltarak tuzluluk stresinin azaltılmasında bir rol oynamaktadır (Upadhyay ve ark., 2011). Biyofilmlenmiş aşuların birlikte aşılınması, hastalıkların biyolojik kontrolü için bitkilere faydalı mikroorganizmaların tanıtılmasında başarılı bir şekilde kullanılabilir (Jayasinghachchi ve Seneviratne, 2010). Bitkilere ikili (bir yerine) bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriyel biyofilm biyogübresi uygulandığında, fotosentezin artması yönünde bir eğilim olduğu belirlenmiştir. Önerilen gübrelerin %50'sinin PGPR biyofilm biyogübreleri ile birlikte aşılınması, sırasıyla PGPR biyofilm biyogübreleri ile önerilen gübre uygulamasının %100'üne kıyasla yaprak büyümesinin artmasına yardımcı olduğu

gösterilmiştir (Seneviratne ve ark., 2009). Bitkilerin büyümesinin desteklenmesine yönelik bu entegre yaklaşım, daha sürdürülebilir tarımın yanı sıra toprağın verimliliğini de artıracığı belirtilmektedir.



Şekil 2.3. Biyofilmlili biyogübrelerin yararları ve uygulama alanları (Pandit vd., 2020).

2.3.Biyofilm Analizinde Kullanılan Yöntemler

Mikroskopi, biyofilm yapısını analiz etmek için kullanılan öncü tekniklerden biriydi. Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM), birikim aşamasında biyofilm yapısını ve dinamiklerini izleme fırsatı sağlamaktadır. (Mueller ve ark., 2006). Biyofilm bileşiminin üç boyutlu mimarisinin karakterizasyonu, spesifik floresan boyalar kullanılarak mümkündür

(Neu ve ark., 2004). Epifloresan mikroskopisini CLSM ile birleştiren ve hücre dışı bir matrikste karbonhidrat dağılımını izleyen Strathmann ve ark., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada gösterildiği gibi, mikroskopi tekniklerinin kombinasyonu ayrıntılı bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Öte yandan, bu tekniklerde numune hazırlama kapsamlı ve karmaşıktır. Bu tekniklerde yapılan boyama ek maliyet getirmekte ve boyama nedeniyle, biyofilmlerdeki birden çok bileşenin eş zamanlı analizi kolay bir iş olmaktan çıkmaktadır. Katı bir yüzey üzerinde bir biyofilm yapısının toplanması, bir fiksasyon prosedürünün ardından taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenebilmektedir. Hücrelerin ve polimerik matrisin dağılımı mükemmel bir şekilde izlenebilmesine rağmen, bu mikroskopi teknikleri ile canlı biyofilm yapıları izlenememektedir (Cortizo ve De Mele, 2003).

Yukarıda bahsedilen tekniklere ek olarak, moleküler düzeyde biyofilm yapısı hakkında bilgi elde etmek için titreşimli spektroskopik teknikler kullanılmıştır. Kızılötesi ve Raman spektroskopileri, biyofilmlerin moleküler yapısı hakkında spektral bilgi elde etmek için birbirini tamamlayıcı olarak kullanılan titreşim spektroskopik teknikleridir. Kızılötesi spektroskopisi (IR) biyofilmleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sudan kaynaklanan müdahale hidratlı biyofilmlerin bileşiminde kullanımını sınırlandırmıştır (Suci ve ark., 1997). Suyu atfedilen spektral -OH bandı, bir biyofilmdeki bileşenlerin diğer karakteristik bantlarını bastırmaktadır.

Biyofilm bileşiminin tanımlanması, çevre ve mikrobiyal büyüme arasındaki etkileşimleri netleştirmek ve ayrıca biyofilmin kendi kaotik sisteminin moleküler dinamiklerini anlamak için çok önemlidir. Biyofilm analizi mikroskobik, spektroskopik ve moleküler tekniklerle yapılabilmektedir (Denkhaus ve ark. 2007). Analitik tekniklerdeki gelişmeler, biyofilmlerin yapısının aydınlatılmasına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Raman spektroskopisi ve SERS (Surface-enhanced raman spectroscopy), moleküler düzeyde bir biyofilmin kaotik bileşimini tanımlamak için umut verici tekniklerdir. Biyofilm bileşenlerine ve mikroorganizmalara özgü spektral özelliklerin keşfi ile tekniklerin klinik, gıda ve denizcilik endüstrileri gibi farklı alanlarda kullanımını genişletebilmektedir. Her iki teknik de kısa analiz süreleri ve bu alanlarda kullanılan diğer geleneksel tekniklere göre kolay uygulanabilirliği ile biyofilmleri tespit ve karakterize etmek için uygundur. Dünya genelinde laboratuvarlar arasındaki raporlar ve iş birlikleri arttıkça, bant atamaları için kapsamlı bir veri tabanının oluşturulması, daha güvenilir sonuçlar elde etmek için yeni fırsatlar sağlayacaktır. Bu tekniklerin diğer mikroskobik, spektroskopik ve moleküler

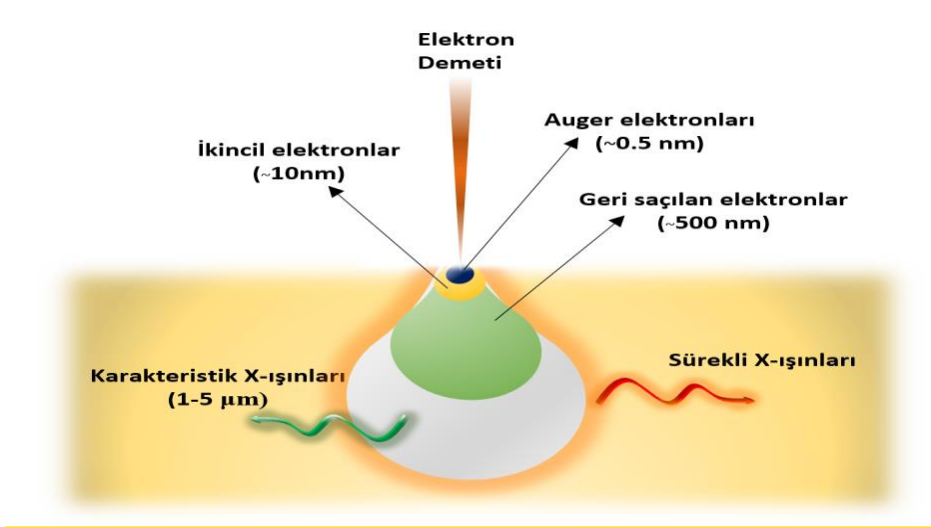
biyofilm karakterizasyon teknikleriyle kombinasyonu, biyofilmlerin karmaşık doğasının daha iyi anlaşılmasına da yol açacaktır.



Şekil 2.4. Biyofilm bileşenleri üzerinde kullanılan analiz yöntemlerinin şekilsel gösterimi

2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

SEM bir yüzey görüntüleme tekniği olup, malzeme üzerine yüksek enerjili elektron ışınları gönderilmektedir. Elektron demetinin çarptığı noktada düşük enerjili ikincil elektronlar yüzeyden koparılmakta ve bu elektronların emisyonu ölçülmektedir. Görüntüler çok yüksek çözünürlüğe sahiptir ve 3 boyutludur (Çankaya ve Sökmen., 2021).



Şekil 2.5. Elektron mikroskobu çalışma prensibi (<http://nukbilimler.ankara.edu.tr/elektron-mikroskobu/>)

Elektro-optik prensipler çerçevesinde tasarlanmış taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüksek enerjili elektronların malzeme ile etkileşerek örnek yüzeyinden görüntü alınmasını sağlayan sistemlerdir. SEM ile yapılan çalışmalar özellikle biyofilmlerin yüzey özelliklerini incelemek üzere yapılmaktadır.



Şekil 2.6. *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterisinin *Arabidopsis thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

Özel olarak tasarlanmış bir akış hücresi ile geleneksel bir optik mikroskobun kombinasyonu, basit invazif olmayan bir yolla opak ince biyomateryaller üzerinde şekillenen biyofilmleri doğal ortamında görüntülemek için kullanılmıştır (Cortizo and Lorenzo, 2003). İnce biyofilmlerin optik mikroskopisi ile SEM görüntüleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca Stewart ve ark. (1995) SEM, CLSM ve mikroskobik araştırmaları takiben yaptıkları kriyo-yerleştirme ile mikrobiyal bir biyofilmin yapısal heterojenliğini göstermiştir. Araştırmacılar, farklı mikroskobik metodları karşılaştırarak biyofilmlerin yapısal heterojenliği hakkında bilgi sağlamışlardır.

2.3.2. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi, biyofilmlerdeki EPS birikmesini zaman çözömlü izleyebilmek için kullanılan diğer bir popüler yıkıcı olmayan tekniktir. Bu teknikte EPS ile ilişkili çeşitli fonksiyonel grupların birikimi ve EPS polimerlerindeki konformasyonel değişiklikler ya zayıflatılmış toplam yansıma kristali ya da çelik ve plastik gibi ilgilenilen yüzey üzerinde gelişen biyofilmler vasıtasıyla görüntülenebilmektedir (Delille et al. 2007; Quilès et al. 2010). FT-IR'a bağlanan bir mikroskop (mikro-FTIR), EPS yapısı içeren biyofilmler içindeki mikro-domainlerin analizinde de yardımcı olabilmektedir (Geoghegan et al.

2008). Konumsal EPS dağılımı konusunda CLSM tekniği ile yansımali micro-FTIR'a göre daha detaylı görseller elde edilebilmesine rağmen, hala FTIR, biyofilm topluluklarında adhesif ve korosif rol oynayan EPS'lerdeki fonksiyonel gruplar hakkında kullanışlı bilgiler sunabilmektedir (Geoghegan et al. 2008). Bozulmuş biyofilmlerden ekstrakte edilen EPS'lerin FT-IR spektroskopisi de birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Tapia et al. 2009; Liang et al.2010; Karunakaran and Biggs 2011).

Biyofilmler son derece karmaşık bir sistemi temsil ettiğinden, genel FT-IR spektrumlarına katkıda bulunabilen ekstraselüler polimerik maddeler, hücre zarı ve sitoplazmadaki moleküllerin titreşiminden bazı farklı sinyaller meydana gelmektedir. FT-IR spektrumları, biyolojik makro moleküller için karakteristik pikler vermekte ve biyofilm örnekleri ile onların planktonik benzerleri arasındaki karşılaştırma, karbonhidratlar ve proteinlerle ilişkili gruplarda değişiklik görülmesine yol açmaktadır (Karunakaran et al., 2011).

Biyofilm analizlerinde FT-IR kullanmanın en büyük dezavantajı, analizden önce örneğin kurutulmak zorunda olmasıdır. Raman spektroskopisi ise hidratlı (sulu) bir ortamda bile örneğin kimyasal kompozisyonu hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu yüzden FTIR'a göre avantaj sağlamakta; doku, biyo akışkanlar ve bakteriyel hücre çalışmaları gibi biyolojik analizlerde yoğun şekilde kullanılmaktadır. Raman ve Yüzeyce Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi, içinde mikroorganizmalar da barındıran EPS bileşeni de içeren sulu biyofilm örneklerinin analizine imkan sağlamaktadır (Ivleva et al. 2009).

2.3.3.Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, fotonlar gelen ışığın frekansından daha düşük veya daha yüksek frekansla molekülden saçıldıklarında meydana gelen Raman saçılımına dayanmaktadır (Lohumi ve ark., 2017). Dağınık fotonların frekansları moleküldeki bağların türlerine bağlı olduğundan, her molekülün Raman spektrumu benzersizdir ve bu molekülün parmak izi olarak düşünülebilir. Raman spektroskopisinin kırınımla sınırlı uzamsal çözünürlüğü yaklaşık 1 µm'dir ve bu, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler gibi çeşitli moleküller ve moleküler gruplar içeren karmaşık yapıların ayrıntılı analizini sağlamaktadır. Bu dikkat çekici özelliğinin yanı sıra tahribatsız bir tekniktir; bu nedenle numune hazırlama diğer tekniklere göre daha kolaydır. Numunelerin boyanmasına ve kurutulmasına da gerek yoktur çünkü suyun Raman saçılması diğer moleküllere göre çok zayıftır (örneğin, Raman spektroskopisinde sudan herhangi bir etkileşim yoktur).

Biyofilm araştırmalarında Raman spektroskopisinin kullanımına ilişkin ilk raporlar, biyofilm yapısındaki belirli moleküllerin difüzyon ve dağılım süreçlerinin araştırılmasına odaklanmıştır. Yaklaşık yirmi yıl önce Suci ve ark. (2001), *Candida albicans* biyofilmlerinde bir antibakteriyel ve antifungal ajan olan klorheksidinin spatiotemporal dağılımını incelemişlerdir. Hem zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) -Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi hem de Raman spektroskopisi sonuçları, klorheksidinin 200 µm kalınlığındaki biyofilmler içinden taşınması için difüzyon katsayısının, sudaki klorheksidin difüzyon katsayısından daha düşük olduğunu göstermiştir. Kalın biyofilmlerin dış bölgelerinde adsorptif davranışı nedeniyle klorheksidin konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Başka bir araştırmada, *Streptococcus mutans* biyofilmlerinde polietilen glikol ve hidrojen-döteryum oksidin (HOD) difüzyonu izlenmiştir (Marcotte ve ark. 2004). Hidratlanmış biyofilmler x, y ve z yönlerinde haritalanmıştır. HOD'un, biyofilmin her yerine yayılabildiği gösterilmiştir. Öte yandan, biyokütlenin heterojen yapısı nedeniyle biyofilmin farklı bölümlerinde polietilen glikol difüzyon hızının farklı olduğu belirlenmiştir.

Raman ve Yüzeysel Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi, içinde mikroorganizmalar da barındıran EPS bileşeni de içeren sulu biyofilm örneklerinin analizine imkan sağlamaktadır (Ivleva et al. 2009).

CLSM ve Raman mikrospektroskopisinin kombine edilmesiyle, *Streptococcus sanguinis* ve *Streptococcus* mutantları arasındaki biyofilmlerde gelişen farklı bakteri türlerinin ayırımını sağladığı gibi, bağımsız gelişen farklı türlerin (*P. aeruginosa* yabani türü ve onun mutantları gibi) biyofilm oluşturmasının yerinde incelenmesi ve karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Sandt et al. 2009; Beier et al. 2010).

Raman spektroskopisi ve CLSM kombinasyonu, sulu yapıya sahip ortamlarda çok farklı biyofilm yüzeylelerinin karakterizasyonu için mükemmel bir şekilde kullanılmakta, çalışmalara ışık tutucu sonuçlar ortaya koymaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşları ve Gelişme Koşulları

Ankara ili topraklarından izolasyonu ve 16s rDNA sekans sonuçlarına göre sınıflandırmaları yapılmış *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus drentensis* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* suşları çalışmamızda kullanılmak üzere Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı stok kültürlerinden temin edilmiştir.

İlk aşamada suşlar Nutrient Broth (NB) besiyerinde 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 18-24 saat süre ile geliştirilmiştir. Çalışma süresince tüm kültürler steril mikrofij tüplerine %60'luk gliserol ile -20°C ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi

Biyofilm oluşum denemeleri ve optimizasyonu sürekli besin akışının sağlandığı biyofilm reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bakteri biyofilmlerin optimum biyofilm üretim kapasiteleri polisistren yüzeyler üzerinde saptanmıştır. Bu yöntemde, denemeye alınan izolatlar Nutrient Broth (NB) ortamına %1 oranında inoküle edilip, 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 18 saat aktive edilmiştir. Daha sonra, bakteri kültürleri OD595=0,2 olacak şekilde ayarlanarak, bu dilüsyonlardan 100 µL NB içeren 96 kuyuluk mikrotitrasyon plak kuyucuklarına 30 µL aktarılmıştır. Plaklar 24, 48 ve 72 saat süresince, 20°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Vestby ve ark., 2009). İnkübasyon süreci sonunda kuyular 3 defa serum fizyolojik uygulanarak yıkanmış ve bu yolla planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığında kurumaya sağlanan kuyulara 130 µL %95' lik (v/v) metanol ilave edilerek 10 dakika inkübasyon ile oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda metanol uzaklaştırılmış ve bu ortamlar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra biyofilm yapısının boyanması amacı ile kuyulara 130 µL %1 kristal viyole ilave edilmiş ve 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda kuyular distile su ile 3 kez yıkanmış ve ardından biyofilm yapısına bağlanan boyayı çözmek amacı ile 130 µL %33'lük (v/v) glasiyal asetik asit eklenip oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiştir (Stepanovic ve ark., 2000). Bu deneme de 3 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Boya yoğunluğu, Elisa okuyucusu ile OD595 'te ölçülüp ve elde edilen değerlerin ortalamasından kontrol olarak kullanılan sadece NB içeren kuyulardan elde edilen değerler çıkarılarak biyofilm üretim miktarları belirlenmiştir.

3.3. MS (Murashige ve Skoog) Besiyeri Hazırlanışı

Çalışmamızda tohum çimlendirme amacı ile Sigma-Aldrich MS bazal besiyeri kullanılmıştır. 500 ml MS besiyeri için; 2,2 g MS besiyeri, 4 g mikrobiyolojik agar (%0,8) karıştırılarak pH=5,8'e ayarlanmıştır. Ardından besiyeri çözeltisi, 121°C'de 15 dakika olacak şekilde otoklavda sterilize edilmiştir. Sonrasında petrilere dökülen besiyerleri oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır.

3.4. *Arabidopsis thaliana* Tohumlarının Çimlendirilmesi

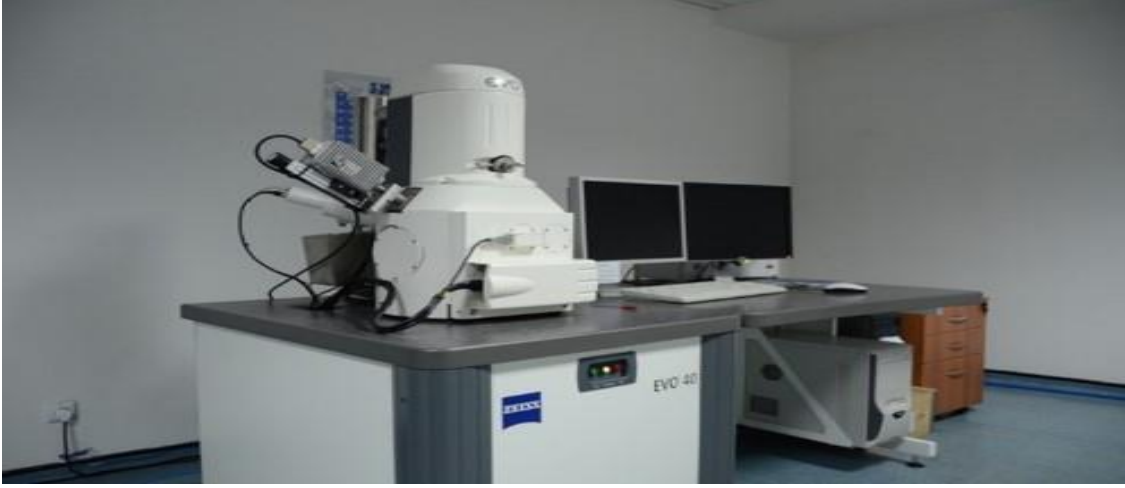
Arabidopsis thaliana Columbia ekotipi tohumları sterilizasyon için 2 dakika %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilmiştir. Sonrasında 5 kez steril distile su ile tohumlar yıkanmış, ardından kurutulan tohumların hazırlanmış olan MS besiyeri petrilere ekimi gerçekleştirilmiş ve 2 haftalık büyümeleri için büyütme kabinine bırakılmıştır (25°C, %70 nem, 20000 lux ışık, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık). Tüm bu işlemler süresince sterilizasyona çok dikkat edilmiştir (Timmusk ve ark., 2005).

3.5. Bakteri İnokülasyonu ve SEM (Scanning Electron Microscopy) İçin Fiksasyon

Bakteri suşları 30°C'de 100 ml'lik şişelerde geç log fazına kadar büyütülmüştür. 2 haftalık bitki büyümesinden sonra, bitki kökleri 10 ml seyreltilmiş bakteri kültürleri içinde ıslatılarak aşılansmış ve 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerleri tüplerden çekilmiş ve %0,5 glutaraldehit-%4 paraformaldehitlik fiksasyon çözeltisi tüplere eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası kökler, PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmış ve ardından %20, %30, %50, %70, %90 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek fiksasyon işlemi tamamlanmıştır ve örnekler SEM için hazır hale getirilmiştir (Vaikuntapu ve ark., 2014).

3.6. Biyofilm Yapılarının SEM İle Görüntülenmesi

Fiksasyon işlemleri sonucunda köklerdeki bakteri kolonizasyonu, Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan Zeiss Evo 40 taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. Zeiss Evo 40 taramalı elektron mikroskobu (SEM)

3.7. Biyofilm Yapılarının FT-IR Spektroskopisi İle Analizi

Bakterilerin geliştirilen biyofilm formlarının FT-IR spektrumları, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda bulunan bir Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spektrometre kullanılarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.2. Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spektrometresi

Uygun FT-IR parmak izi spektral aralıkları lipidler için $1500\text{--}1175\text{ cm}^{-1}$, proteinler için $1700\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ ve şekerler için $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ seçilmiştir (Gieroba ve ark., 2020).

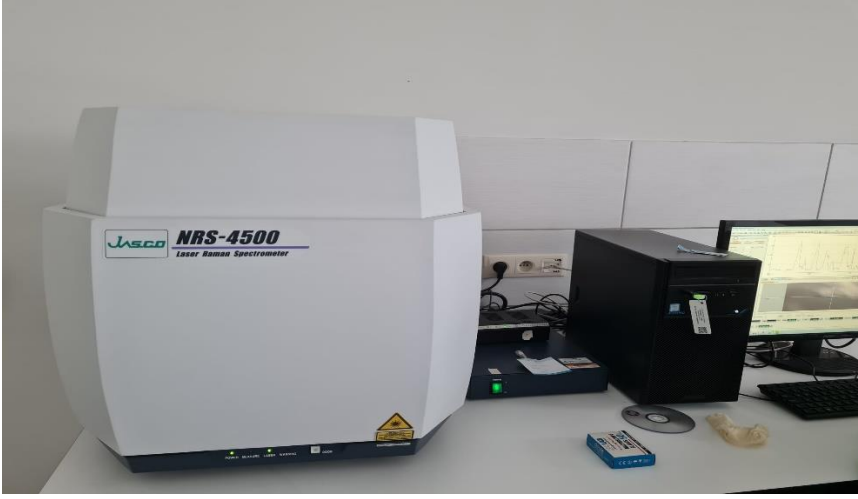
Tablo 3.1. Belirli atanmış bileşenlerle FT-IR titreşim tipinde elde edilen en önemli bantlar. Biyofilm numunelerinin spektrumları ve belirli atanmış bileşenlere sahip titreşim türleri (Gieroba ve ark., 2020).

Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Atama ve Titreşim Türü *
3200–3350	v (N–H), v (O–H), Amid A, su
2950–2960	v _{gibi} (CH ₃), lipitler
2920–2940	v _{gibi} (CH ₂), lipitler
2850–2860	v _s (CH ₂), lipitler
1730–1740	v (C=O), fosfolipitler
1700–1600	%80 v (C=O), %20 v (C–N), τ (HOH), Amid I, su
1600–1500	%60 τ (N–H), %30 v (C–N), %10 v (C–C), Amid II
1441–1462	prolin ve hidroksprolinin pirolidin halka titreşimi
1450–1400	δ _{gibi} (CH ₃), δ _{gibi} (CH ₂), proteinler, lipitler
1400–1350	δ _s (CH ₃), δ _s (CH ₂), v _s (C=O), proteinler, lipitler
1350–1200	τ (N–H), v (C–N), τ (C=O), v (C–C), v (CH ₃), Amid III,
1242–1230	v _{gibi} (PO ₂ ⁻), DNA, RNA, fosfolipitler, fosforile proteinler
1144–1137	Oligosakkaritler
~ 1086	v _s (PO ₂ ⁻), DNA, RNA, fosfolipitler, fosforile proteinler
1080–1070	v (C–C), β-glukan bağları
1046–999	D-glukozun anomerik yapısına bağlı iskelet titreşimi
1009–1016	v (C–C), RNA, riboz
~972	v (C–C), v (C–O), DNA, deoksiriboz
900–700	triptofan, tirozin ve fenilalanin için anomerik halka titreşimleri
929	(1→3)-A-D-GLUKAN
860–852	(1→3),(1→6)-A-D-GLUKAN

* Titreşim türleri: germe (v), deformasyonel (δ), bükülme (τ), simetrik (s) ve asimetrik (as) modları.

3.8. Biyofilm Yapılarının Raman Spektroskopisi İle Analizi

Bakterilerin geliştirilen biyofilm formlarının Raman spektrumları, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda bulunan bir JASCO NRS4500 Konfokal Mikroskoplu Raman Spektrometre kullanılarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. JASCO NRS4500 Konfokal Mikroskoplu Raman Spektrometresi

Eksitasyon lazer dalga boyu 532 nm olarak seçilmiştir. Uygun Raman parmak izi spektral aralıkları lipidler için $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, proteinler için $1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ve şekerler için $1200\text{--}800$ ve $610\text{--}475\text{ cm}^{-1}$ aralıklarında seçilmiştir (Gieroba ve ark., 2020).

Tablo 3.2. Biyofilm örneklerinin Raman spektrumlarında elde edilen en önemli bantlar ve belirli atanmış bileşenlere sahip titreşim türleri. (Gieroba ve ark., 2020).

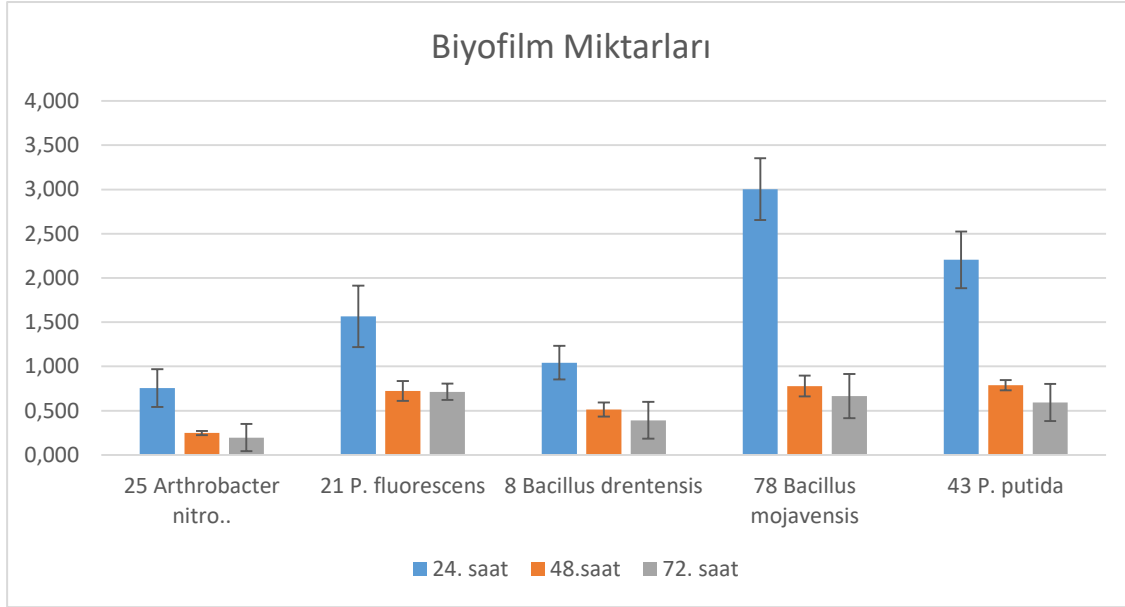
Raman Kayması (cm ⁻¹)	Atama ve Titreşim Türü *
1700–1600	ν (C=O), Amid I
1667–1650	ν (C=C), lipitler, proteinler
1600–1500	ν (C–N), δ (N–H), Amid II
1576	adenin, guanin (DNA bazları)
1523	Sitozin (DNA bazları)
1500–1400	düzlem içi τ ve düzlem dışı τ (CH ₂), lipitler
1461–1445	ν_s (CH ₂), doymuş lipitler
~ 1380	δ (COH), (HCO), (HCC), ν_s (COO ⁻), (C–O), polianyonik polisakkarit
1340–1330	polinükleotid zincirleri, DNA pürin bazları
1330–1125	trans ν (C–C), lipitler
1300–1250	düzlem içi τ ve düzlem dışı τ (CH ₃), lipitler
~ 1280	δ (COH), (HCO), (HCC), ν_s (COO ⁻), (C–O), polianyonik polisakkarit
1300–1230	ν (C–N), δ (N–H), Amid III
~1260 (omuz bandı)	δ (CH), lipitler, proteinler
1200–1050	ν (C–C), lipitler
1075, 1055, 980–880	ramnoz, galaktoz ve glikoz kombinasyonu
~ 1127	ν (C–N), proline
1125	Glikoz
~ 1120	ν_s (COC), glikosidik bağlar
~ 1094	ν_{gibi} (COC), (1→4)- β bağlı glikosidik bağlar
~ 1068	trans ν (C–C), lipitler
1000	fenilalanin halkası solunumunda
950–790	yan grup δ (COH), (C–CH), (O–CH), karbonhidratlar
~ 948	(1→3)-A-D-GLUKAN
800–640	düzlem dışı τ (N–H), Amid V
852	(1→6)-A-D-GLUKAN
~783	sitozin, timin, urasil halkası solunum; ν_s (O–P–O), DNA'daki fosfodiester bağları
770–625	τ (O=C–N), Amid IV
~757, ~520	Glukanlar
600–540	düzlem dışı τ (C=O), Amid VI
~ 380	β -d-glukozit

* Titreşim türleri: germe (ν), deformasyonel (δ), bükülme (τ), simetrik (s) ve asimetrik (as) modları.

4.BULGULAR

4.1. Polistren Yüzeylerde Biyofilm Oluşum Miktarları

Kristal viyole deneyi sonucunda bakterilerin biyofilm oluşturma miktarları belirlenmiştir.

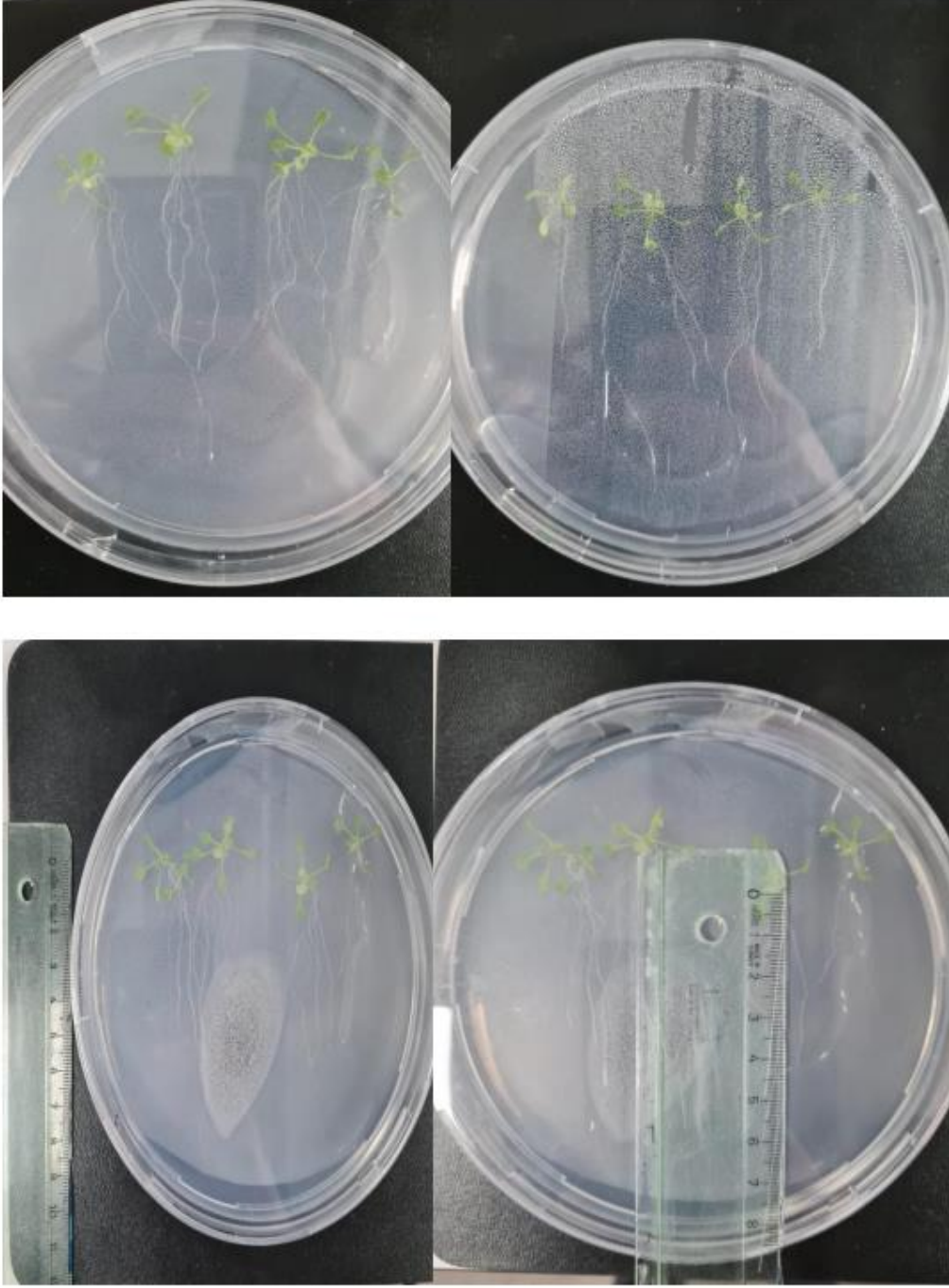


Şekil 4.1 *Bacillus drentensis*, *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter nitroguajacolicus* bakterilerinin biyofilm oluşturma miktarları

Yapılan analizler sonucunda bakterilerin 24. saatin sonunda en yüksek biyofilm üretme kapasitesine ulaştıkları belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşun *B. mojavensis* olduğu ardından sırasıyla *P. putida*, *P. fluorescens*, *B. drentensis* ve *A.nitroguajacolicus* suşlarının biyofilm ürettikleri belirlenmiştir.

4.2. *Arabidopsis thaliana* Columbia Ekotipi Kök Uzunlukları

A. thaliana Columbia ekotipi tohumlarının hazırlanmış olan MS besiyeri petrilere ekimi gerçekleştirilmiş ve 2 haftalık büyümeleri için büyütme kabine bırakılmıştır (25°C, %70 nem, 20000 lux ışık, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık). Bu süre sonunda kök uzunluklarının 7-10cm'ye ulaştıkları belirlenmiştir.

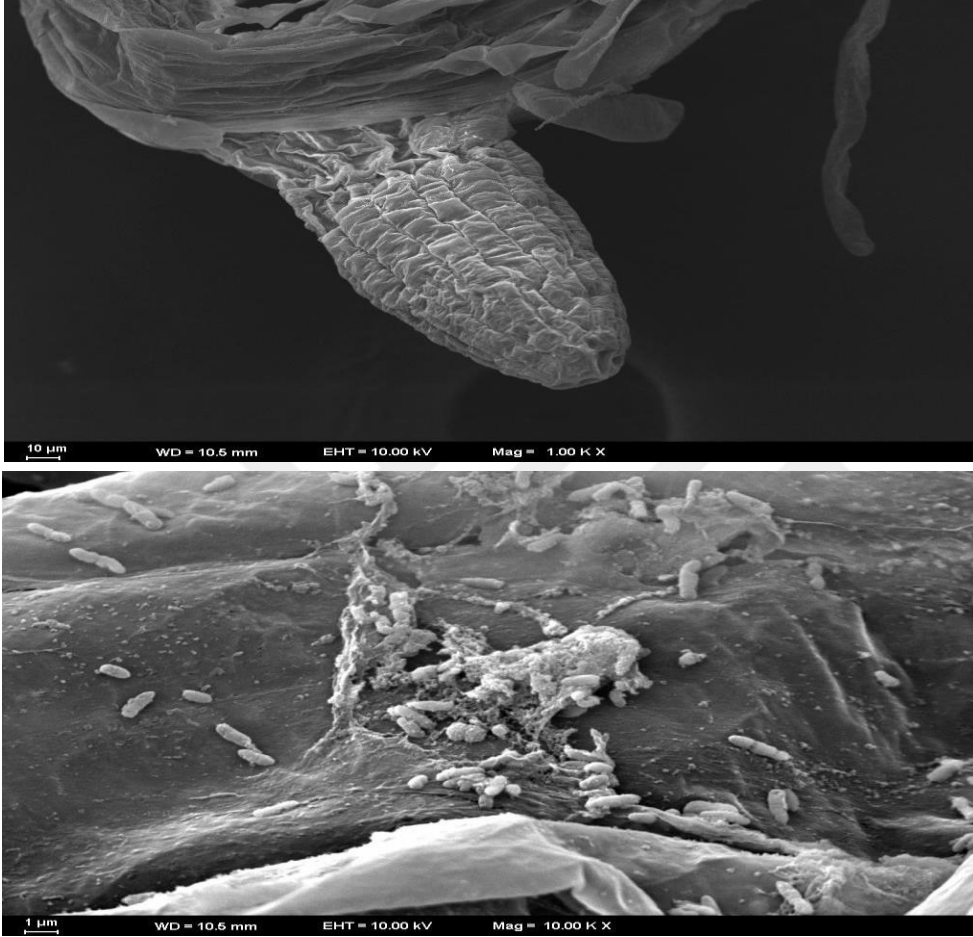


Şekil 4.2. *Arabidopsis thaliana* Columbia bitkileri (2 haftalık büyüme sonundaki durumu)

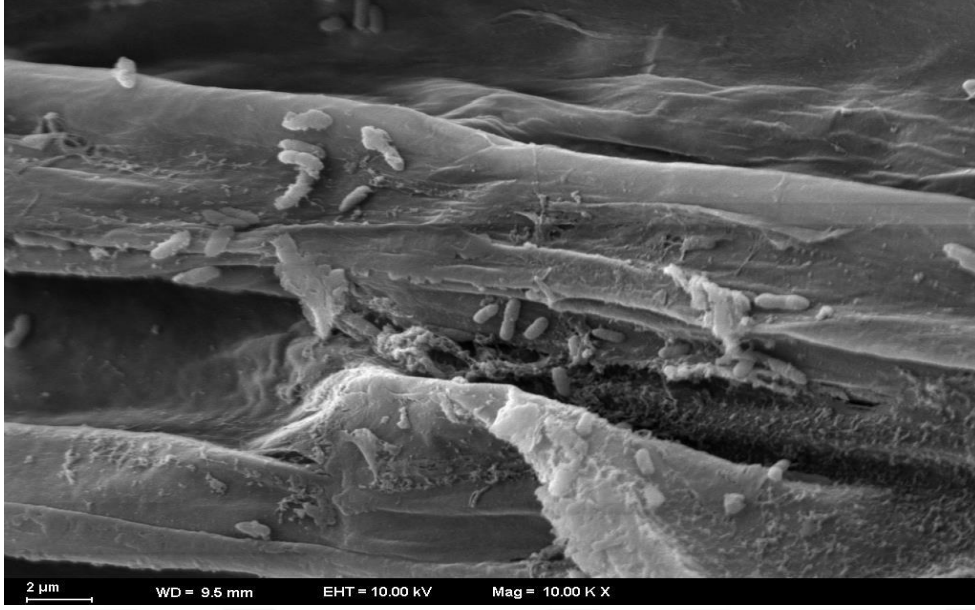
4.3. Bakterilerin Bitki Köklerindeki Kolonizasyonunun Görüntülenmesi (SEM)

Yapılan SEM analizleri sonucunda bakterilerin bitki köklerindeki kolonizasyonu belirlenmiştir.

1. *Bacillus drentensis* (K6-1) SEM görüntüleri

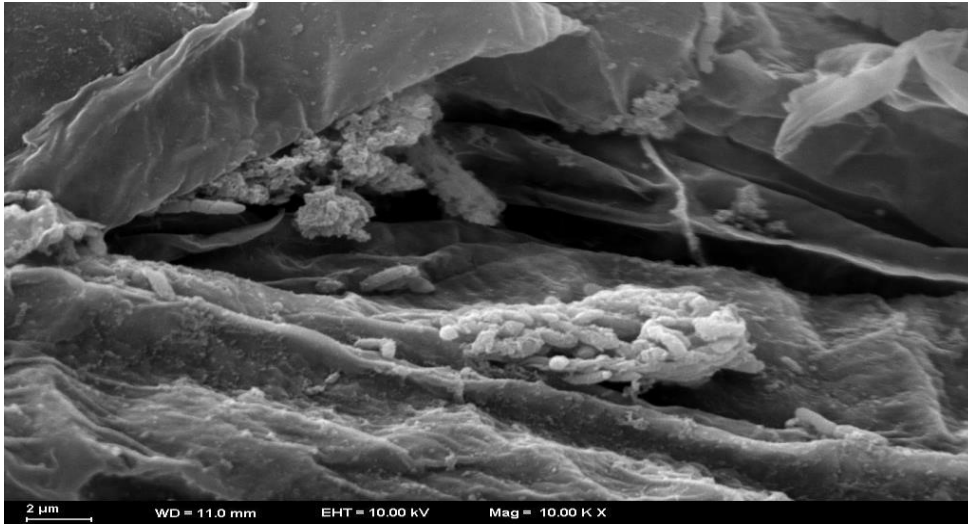


Şekil 4.3. *B. drentensis* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

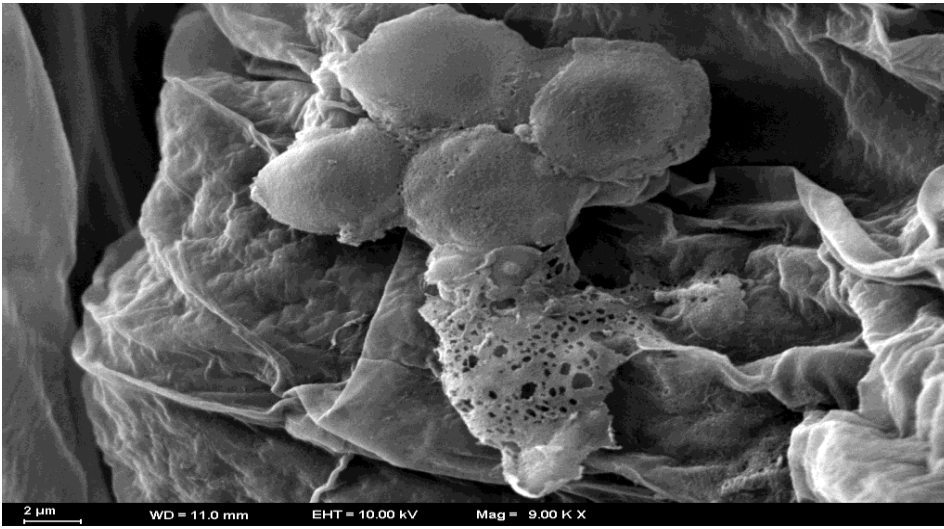
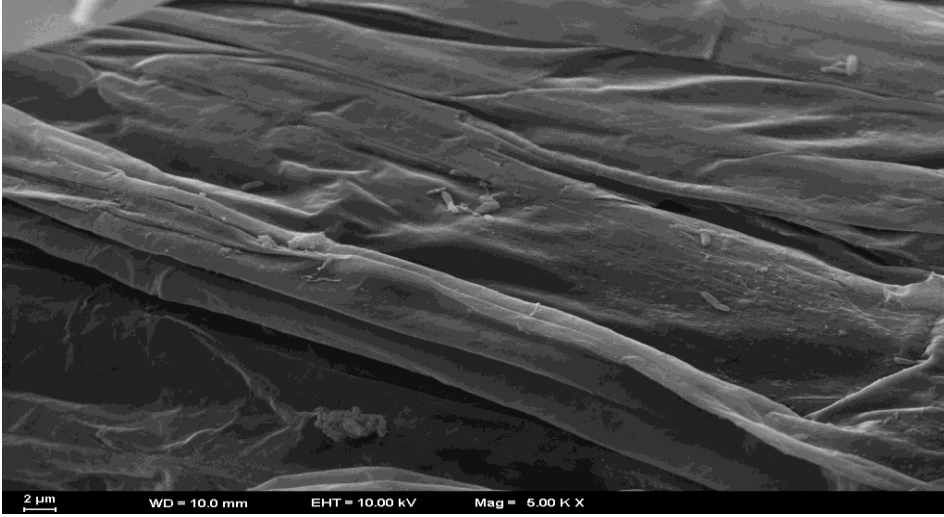


Şekil 4.4. *B. drentensis* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

2. *P. fluorescens* (K4-1) SEM görüntüleri

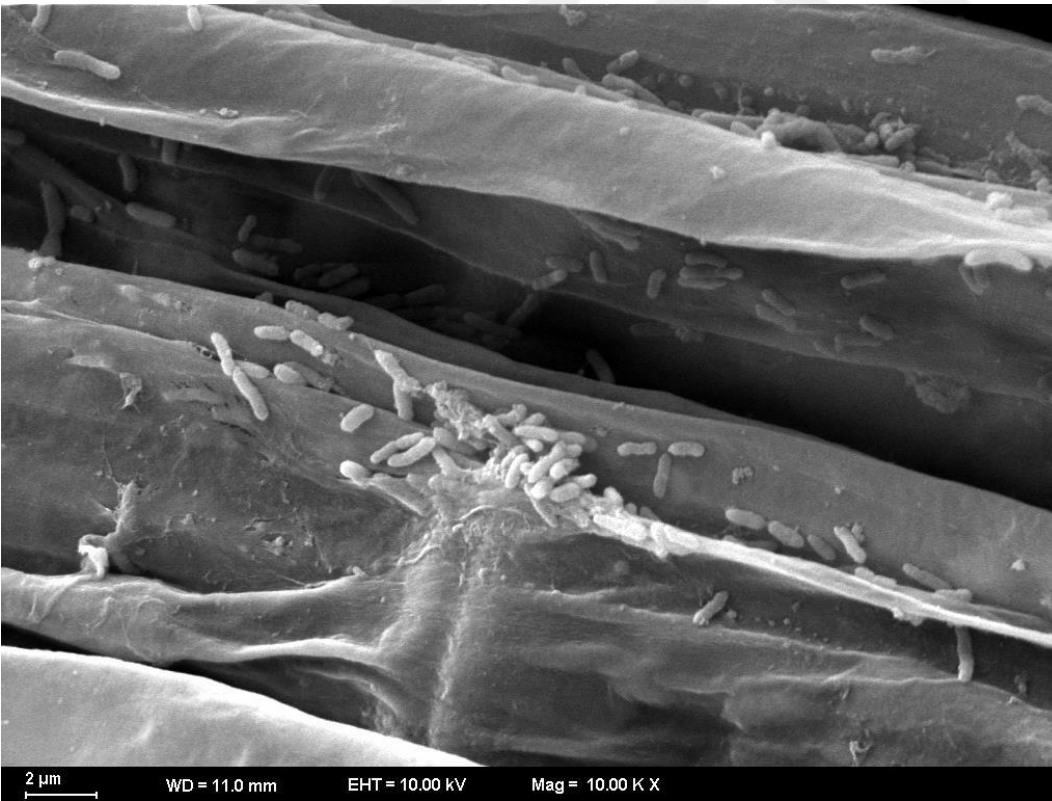
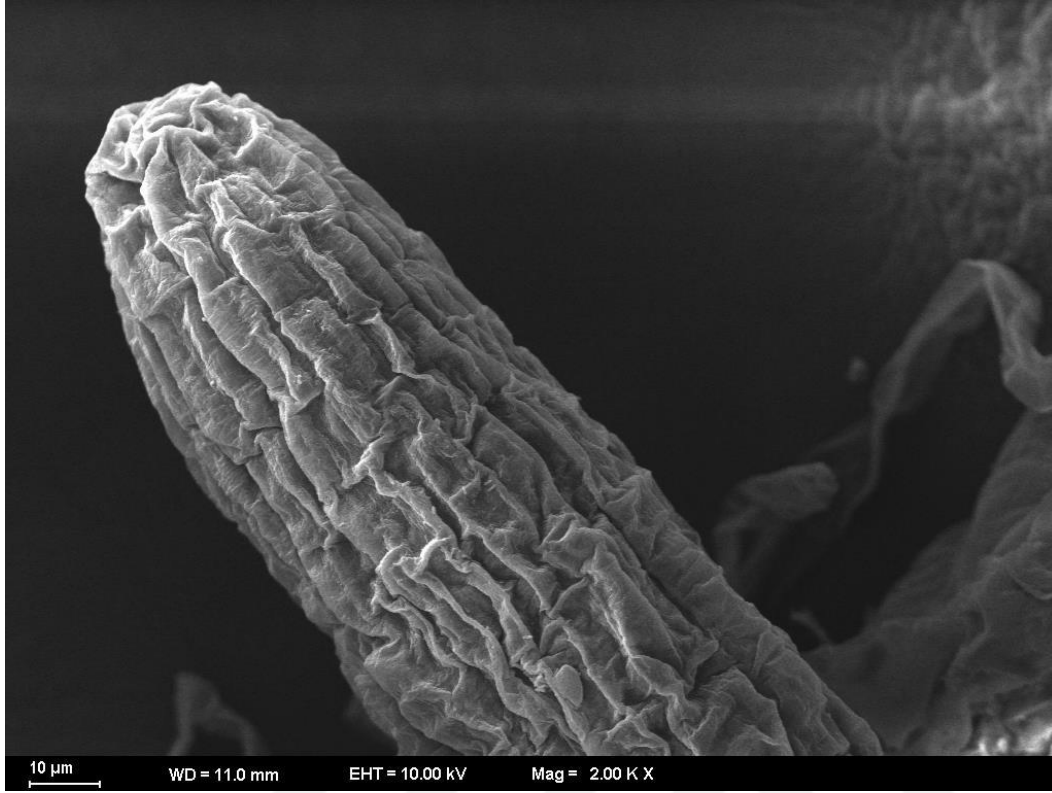


Şekil 4.5. *P. fluorescens* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

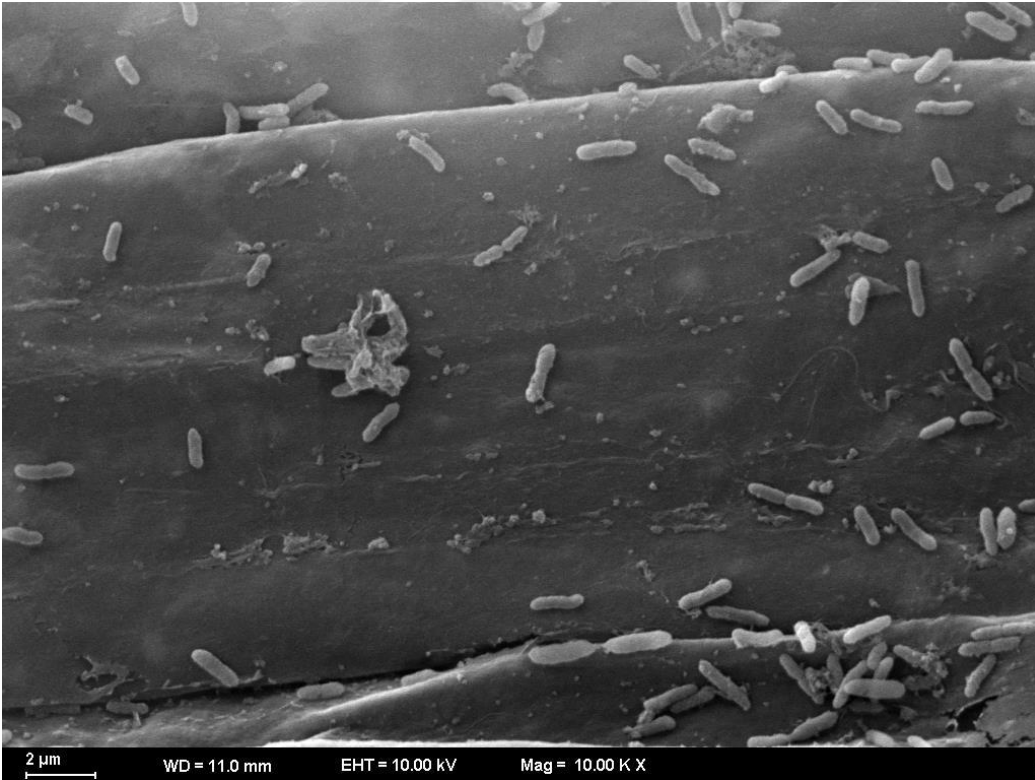


Şekil 4.6. *P. fluorescens* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

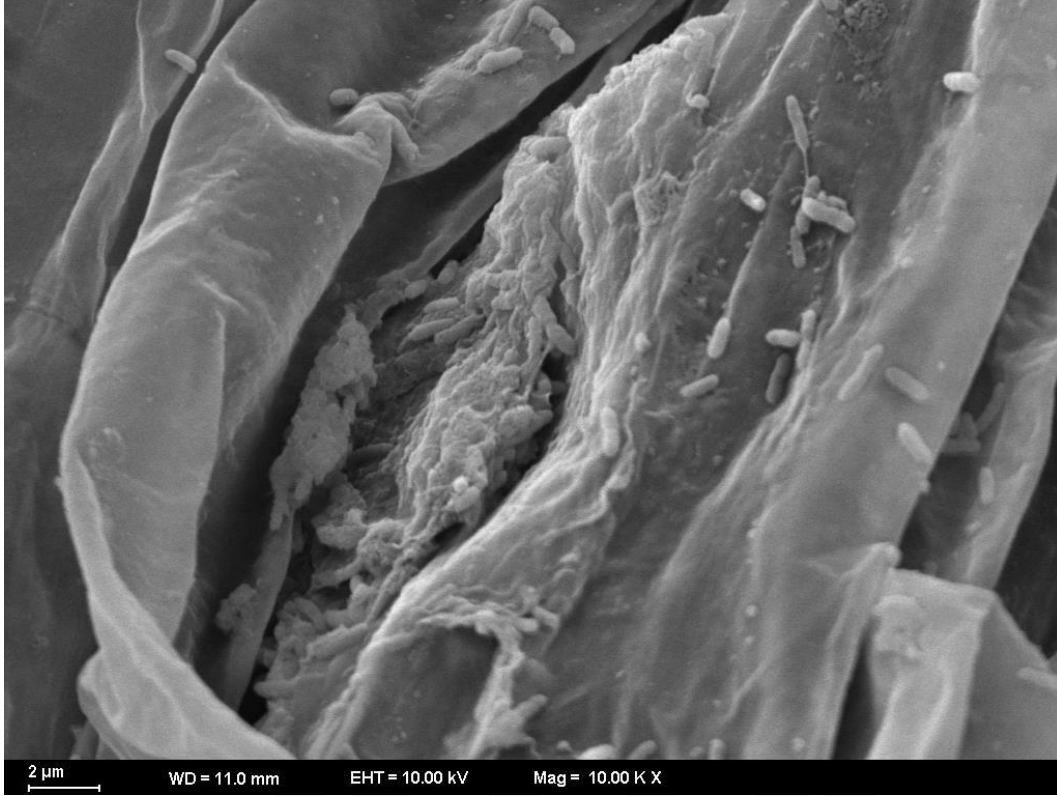
3. *A. nitroguajacolicus* (KH3-1) SEM görüntüleri



Şekil 4.7. *A. nitroguajacolicus* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü



Şekil 4.8. *A. nitroguajacolicus* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü



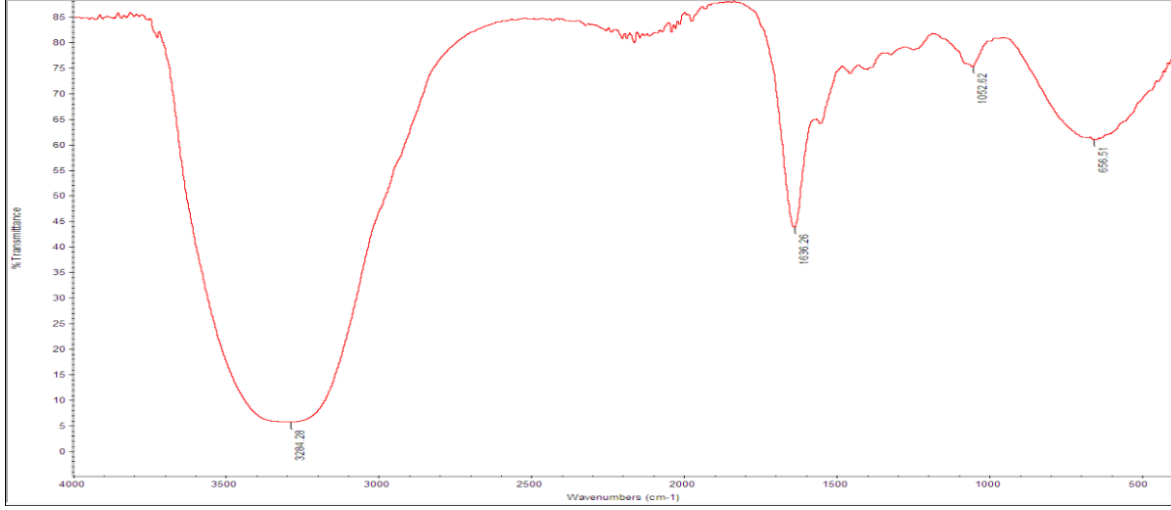
Şekil 4.9. *A. nitroguajacolicus* bakterisinin *A. thaliana* Columbia ekotipi kökündeki kolonizasyonunun SEM görüntüsü

SEM analizleri sonucunda her üç bakteri türünün de ağırlıklı olarak kök uçlarında biyofilm oluşturarak kolonize olduğu belirlenmiştir. Vasküler silindir dışında kalan hücreler arası boşluklarda da bakterilerin biriktiği ve kolonize olduğu belirlenmiştir.

4.3. Biyofilm Yapılarının FT-IR Spektrumları

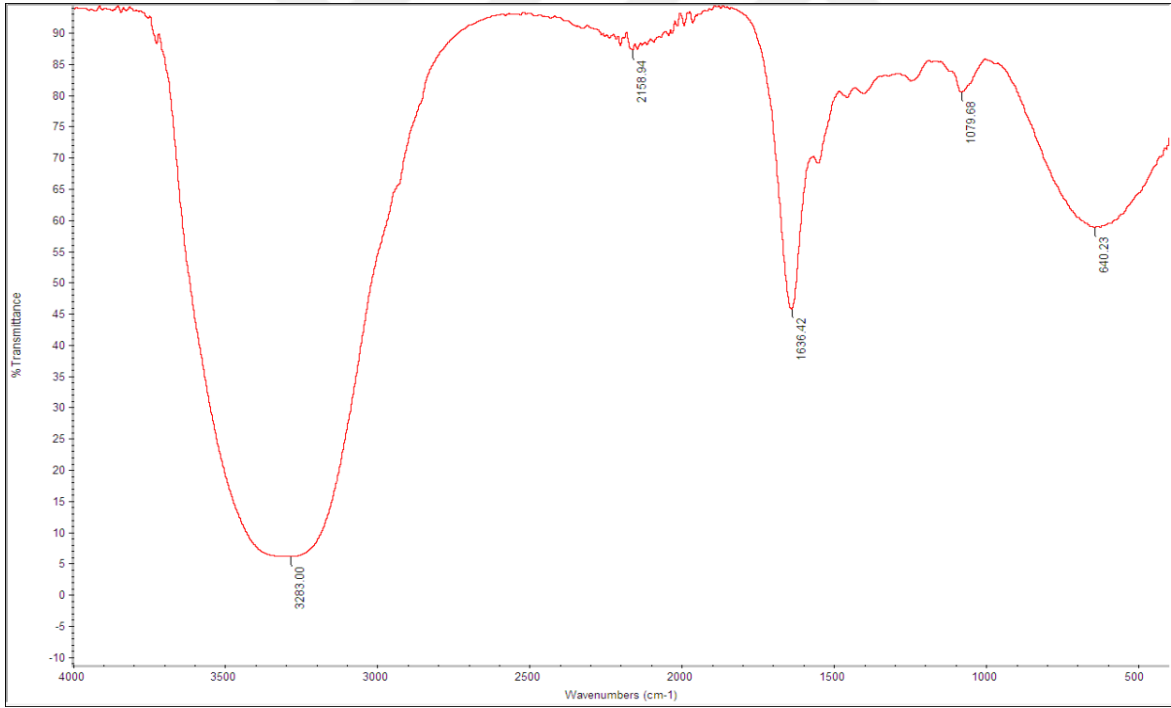
Araştırdığımız bakterilerin biyofilm FT-IR spektrumları aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

1. *Bacillus drentensis* (K6-1) FT-IR spektrumu



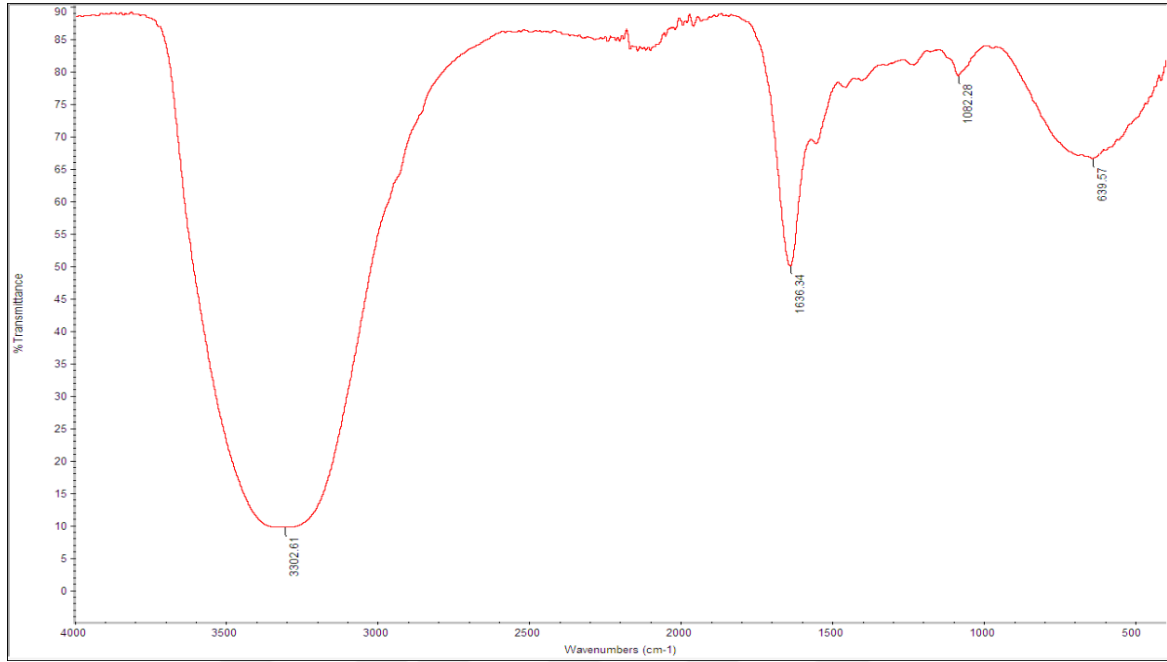
Şekil 4.10. *B. drentensis* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu

2. *Pseudomonas fluorescens* (K4-1) FT-IR spektrumu



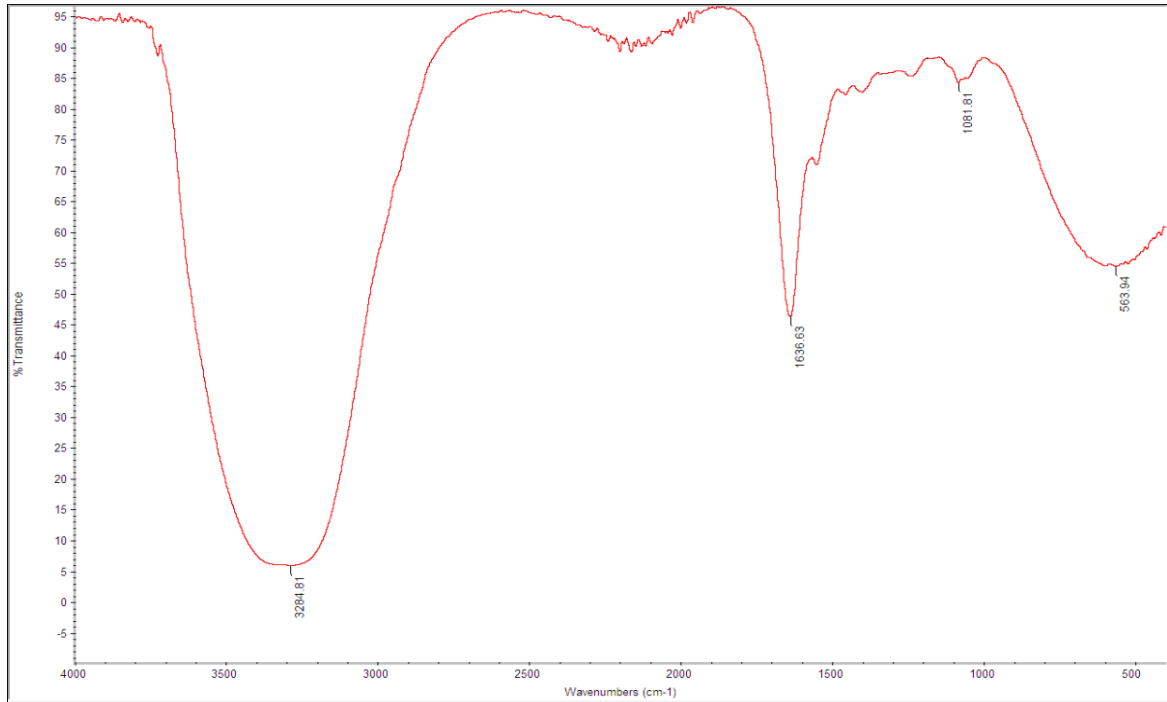
Şekil 4.11. *P. fluorescens* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu

3. *Arthrobacter nitroguajacolicus* (KH3-1) FT-IR spektrumu



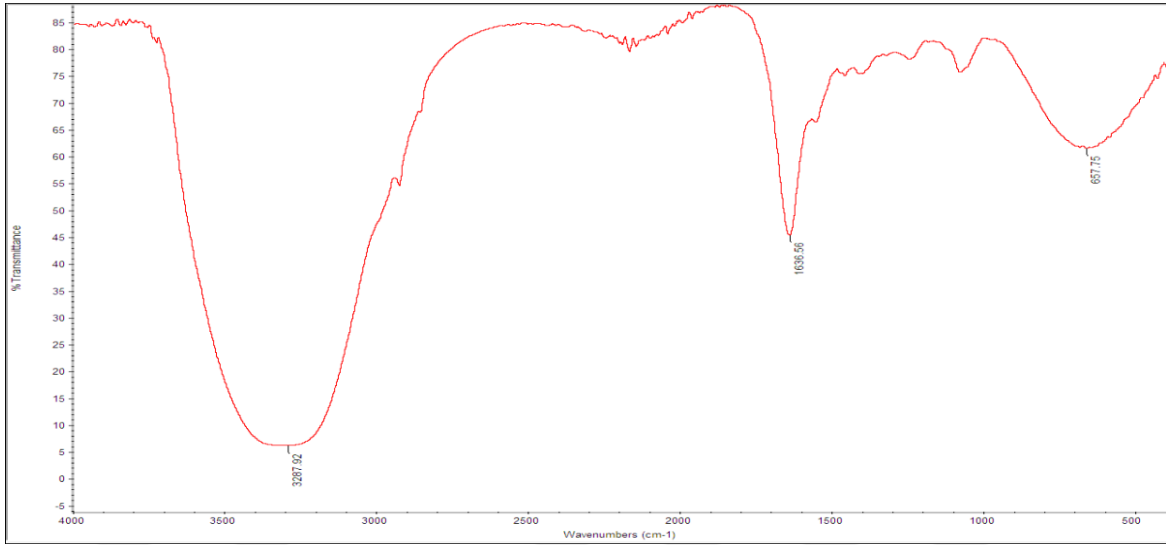
Şekil 4.12. *A. nitroguajacolicus* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu

4. *Pseudomonas putida* (Ç1-1) FT-IR spektrumu



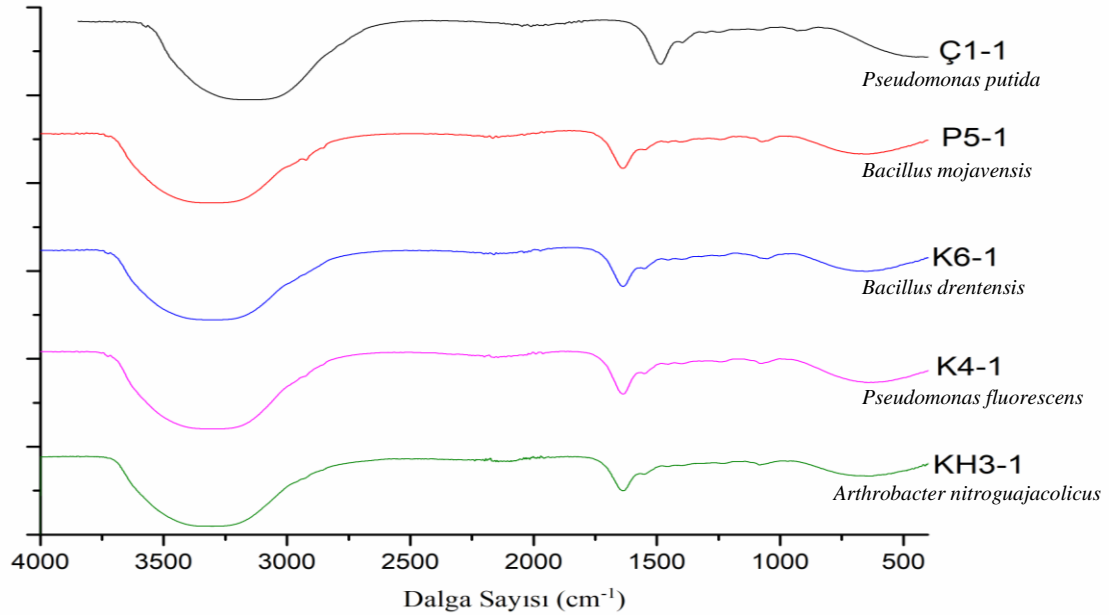
Şekil 4.13. *P. putida* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu

5. *Bacillus mojavensis* (P5-1) FT-IR spektrumu



Şekil 4.14. *B. mojavensis* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının FT-IR spektrumu

6. Karşılaştırmalı FT-IR Spektrumları



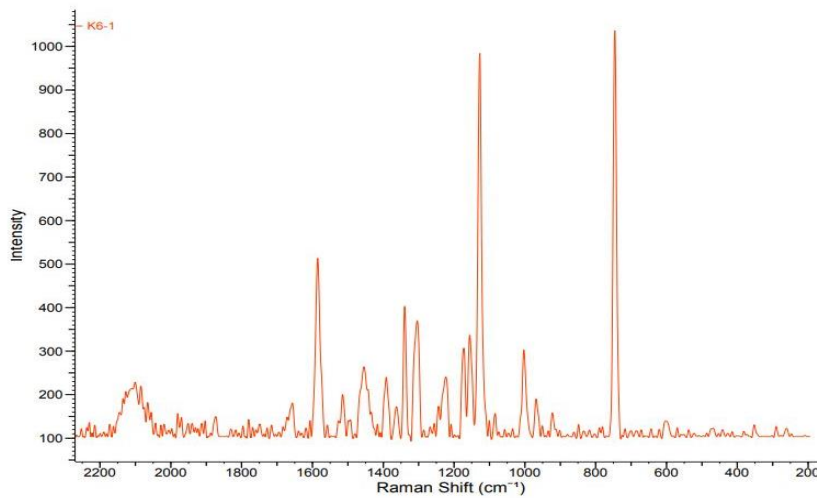
Şekil 4.15. *B. drentensis* (K6-1), *P. fluorescens* (K4-1), *A. nitroguajacolicus* (KH3-1), *P.putida* (Ç1-1), *B. mojavensis* (P5-1) bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Örneklerin IR spektrumları incelendiğinde, 3200-3300 cm^{-1} civarındaki geniş bandlar Amid A varlığını göstermektedir. IR spektumlarında geniş amid A bandının yanında 2800-3000 cm^{-1} bölgesinde omuz olarak ortaya çıkan bandlar bakteri hücre duvarları ve membranlarında yoğunlaşan lipidler için karakteristik olarak bilinen metilen gruplarının CH, CH₂ ve CH₃ simetrik ve asimetrik titreşimlerine ait bantlardır. Bu bandın en yüksek yoğunluğu P5-1 için tespit edilmiştir. Bunun nedeninin hidrokarbon zincir uzunluğuna ve membran lipidlerinin polar baş grubunun kimyasal yapısına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Amid I ve Amid II bantları, proteinlerin ikincil yapılarındaki değişikliklere karşı hassastır. Amid I ve Amid II için karakteristik olan absorpsiyon bantları 1500–1700 cm^{-1} civarındadır. IR spektrumları incelendiğinde, örnekler için amid I bantları 1636 cm^{-1} 'de ve amid II bantları 1544-1553 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Literatürde 1200-950 cm^{-1} civarı şeker bölgesi olarak bilinmektedir. Örneklerin IR spektrumlarında 1148-1152 cm^{-1} aralığındaki bandlar oligosakkaritlerin varlığına işaret etmektedir. 1097-1125 cm^{-1} bölgesinde ortaya çıkan zayıf bandlar karbohidratlar, fosfatlar/fosfolipidler ve nükleik asitlerin varlığını desteklemektedir. Örneklerin β -glucan bağlarına ait bandlar 1052-1083 cm^{-1} aralığında gözlemlenmiştir.

4.4. Biyofilm Yapılarının Raman Spektrumları

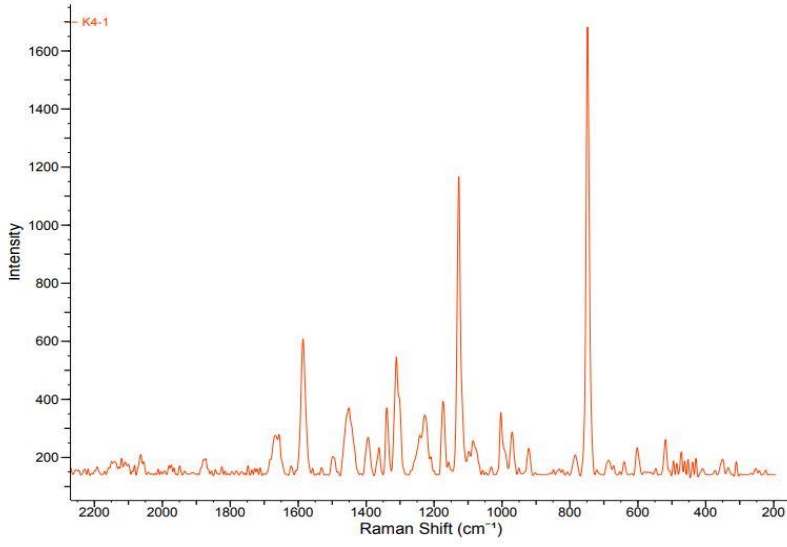
Araştırdığımız bakterilerin 532 nm'deki biyofilm raman spektrumları aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

1. *Bacillus drentensis* (K6-1) Raman spektrumu



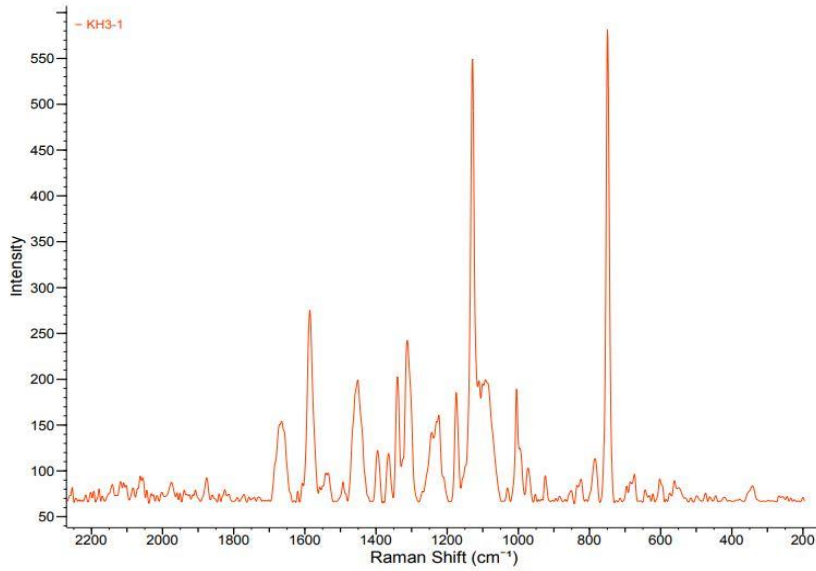
Şekil 4.16. *B. drentensis* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu

2. *Pseudomonas fluorescens* (K4-1) Raman spektrumu



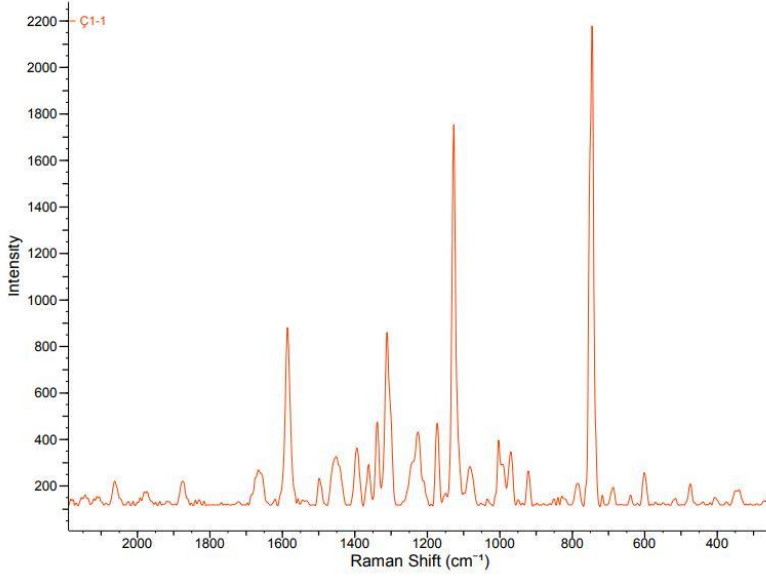
Şekil 4.17. *P. fluorescens* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu

3. *Arthrobacter nitroguajacolicus* (KH3-1) Raman spektrumu



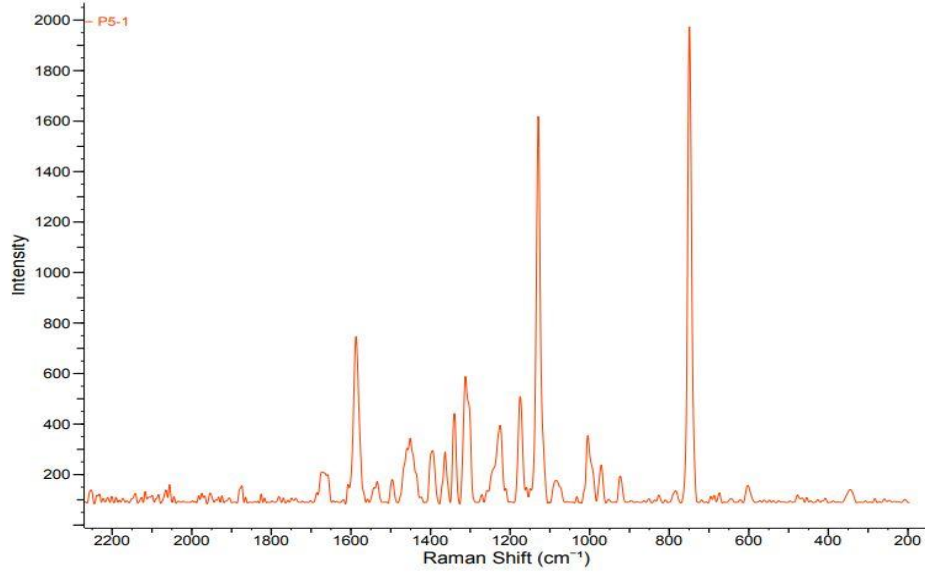
Şekil 4.18. *A. nitroguajacolicus* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu

4. *Pseudomonas putida* (Ç1-1) Raman spektrumu



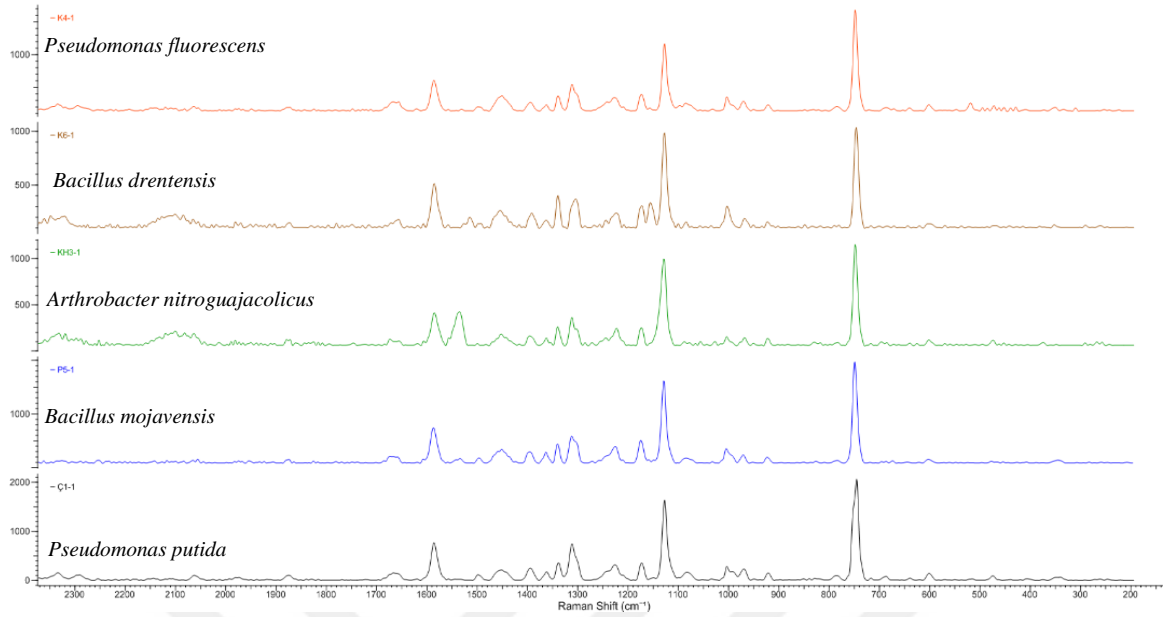
Şekil 4.19. *P. putida* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu

5. *Bacillus mojavensis* (P5-1) Raman spektrumu



Şekil 4.20. *B. mojavensis* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumu

6. Karşılaştırmalı Raman spektrumları



Şekil 4.21. *P. fluorescens* (K4-1), *B. drentensis* (K6-1), *A. nitroguajacolicus* (KH3-1), *B. mojavensis* (P5-1), *P. putida* (Ç1-1) bakterilerinin oluşturduğu biyofilm yapılarının karşılaştırılmalı Raman spektrumları

Örneklerin Raman spektrumları incelendiğinde, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ve $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde sırasıyla Amid I ve Amid II bandları ortaya çıkmıştır. Hidrokarbon zincirinin varlığına atfedilen lipidlerin Raman spektrumları, esas olarak üç spektroskopik bölgede tespit edilmektedir: $1500-1400\text{ cm}^{-1}$, $1300-1250\text{ cm}^{-1}$ ve $1200-1050\text{ cm}^{-1}$. Raman spektrumlarında $1300-1400\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen bandlar bakteriyel biyofilm örneklerinde protein yapısından kaynaklı CH_2 gruplarına aittir. Doymuş lipidlere ait olduğu düşünülen 1450 cm^{-1} civarındaki bandların en yüksek yoğunluğu K4-1 için ve en düşük yoğunluk KH3-1 için gözlenmiştir. Bu bandın yoğunluğundaki farklılıklar, lipid yağ asitlerinin doygunluğu açısından olgunlaşma sırasında lipid miktarlarındaki ve bakteriyel biyofilm bileşimlerindeki değişiklikleri göstermektedir. Glukanlar için en spesifik bantlar $\sim 750\text{ cm}^{-1}$ 'de ortalanmış olanlardır. Örneklerin Raman spektrumlarında bu pikler gözlenmiştir. Gram pozitif hücrelerde, $880-980$, 1055 ve 1075 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantların varlığı, bakteri hücre duvarlarının ramnoz, galaktoz ve glikozun titreşim modlarının bir kombinasyonundan kaynaklanabilmektedir. Yine literatür ile uyumlu olarak 1125 cm^{-1} de gözlenen pikler glukozun spesifik raman literatür pikleridir. $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ 'deki Raman bantları sıklıkla bakteriyel biyofilm matrisinde bir polianyonik polisakarit varlığına işarettir. Örneklerin Raman spektrumlarında bu bandların ortaya çıkmış olması bu durumu doğrulamaktadır.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yapılan analizler sonucunda bakterilerin 24. saatin sonunda en yüksek biyofilm üretme kapasitesine ulaştıkları belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşların *B. mojavensis* ve *P. putida* olduğu ardından sırasıyla *P. fluorescens*, *B. drentensis* ve *A.nitroguajacolicus* suşlarının biyofilm ürettikleri belirlenmiştir. Yaptığımız SEM analizleri sonucunda bakteri kolonizasyonun daha çok kök ucu çevresinde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bu bulgular literatür verileri ile de paralellik göstermiştir. Kök yüzeyinin özellikleri köklerin uzunluğu boyunca değişmekte ve biyofilm oluşumu, farklı bölgelerdeki kökler tarafından salınan bileşikler ve besinlerden etkilenmektedir. Köklerdeki bakteri kolonizasyonunun; hücre bölünmesi ve büyümenin fazla olduğu bölge ve kök kapağında, olgun kök bölgesi ve kök tüyelerine oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Paenibacillus polymyxa*'nın, bitki kök ucu etrafında biyofilm oluşturduğu ve bu biyofilm formunun, biyokontrolde ve kuraklığa karşı toleransı artırmada rol oynadığını bildirmişlerdir. (Timmusk ve ark.2005). Yapılan araştırmalarda tarım sektörüne odaklanan biyo-gübre biyofilmlerinin önemli potansiyel faydalarının olabileceği belirtilmiştir. Bu tür ürünler, bitkiyi sadece çeşitli çevre ve toprak kaynaklı hastalıklara karşı değil, aynı zamanda tuzluluk, kuraklık, inorganik ve organik kirleticiler gibi abiyotik streslere karşı koruyabilmekte ve potansiyel olarak ürün verimliliğini arttırmaktadır (Malusa ve ark. 2012). Bitki kökünde bakteri kolonizasyonunu belirleyen en önemli faktörlerden biri kök eksüdasyonudur (Walker ve ark., 2003; Weller ve Thomashow, 1994). Bitki kökleri, rizosfere çok çeşitli bileşikler salgılamaktadır. Eksüdasyon zaman ve mekânda heterojendir (Liao ve ark., 2001). Metabolik aktivitenin değiştiği tabandan kök ucuna kadar uzunlamasına eksen boyunca da farklılık göstermektedir (Gilroy ve Jones, 2000). Kök kapağı, kök ucundan dökülen hidratlı polisakaritlerin bir kaynağıdır. Bu polisakaritler, ortamdan geçiş sırasında kökü kayganlaştıran musilaj oluşturmaktadır. Apoplastik sakkaroz, konsantrasyon gradyanı nedeniyle kök ucundan da yayılabilmektedir. Sükroz, olgun kök bölümlerinden sızmamakta, çünkü bu bileşiğin difüzyonu suberize endodermal hücre tabakası tarafından bloke edilmektedir (Jaeger ve ark., 1999). Bu tür beslenmeyi tercih eden mikroorganizmalar, bu zengin besin kaynakları tarafından cezbedilebilmektedir. Bazı PGPR'ler, mantar hücre duvarlarını parçalamak, bitkilerde savunma tepkilerini ortaya çıkarmak ve patojenik bakteriler, mantarlar ve virüsler tarafından sonraki enfeksiyonlara direnç kazandırmak için toprak kaynaklı bakteri ve mantar patojenlerine karşı kitinazlar ve glukanazlar gibi hidrolitik enzimler üretmekte

(Maniula ve Podile, 2001) veya kök yüzeylerinde kökleri koruyabilen biyofilmler oluşturmaktadır (O'Toole ve Kolter, 1998).

Pseudomonas ve *Bacillus* spp. çeşitli bitkilerde kökleri kolonize eden en önemli PGPR'lerdir. Bu grubun üyeleri toprakta yaygın bir dağılıma sahiptir, rizosferin etkili kolonileştiricileridir ve bitkilerde çok çeşitli patojenlere karşı inhibitör olan çeşitli türlerde metabolitler üretmektedir (Rangarajan ve ark., 2003). PGPR'nin diğer birçok kök kolonize edici suşunun da topraktaki bir dizi patojene karşı antifungal özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin önemli bir bileşeni olan PGPR ve biyofilm oluşumunun önemini, bitki sağlığı ve toprak verimliliği üzerindeki etkisini göstermektedir. PGPR'nin uygulanabilirliği, toprak ve bitki büyümesinin sürdürülebilir verimliliğini elde etmek için gelecek vaat eden sürdürülebilir ve çevre dostu bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, toprak yapısı oluşumu, organik maddenin ayrışması, temel elementlerin geri dönüşümü, mineral besinler, sayısız bitki büyüme düzenleyicilerinin üretimi, organik kirleticilerin bozulması, kök büyümesinin uyarılması, toprak ve tohum kaynaklı bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü ve vejetasyondaki değişikliklerin teşvik edilmesi, çözündürme gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla daha iyi toprak verimliliği için zirai kimyasallara (gübreler ve pestisitler) olan ihtiyacın azaltılmasına yol açabilecek geniş bir PGPR kullanımına ilham vermektedir.

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriyel biyofilmlerin, biyogübreler, bitki büyümesini hızlandırıcılar ve bitki sağlığı için biyokontrol edici maddeler gibi fütüristik tarım yaklaşımlarında temel bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bazı mahsullerin bitki köklerine bağlanan faydalı biyofilmler, besin döngüsüne ve ayrıca zararlıların ve hastalıkların biyolojik kontrolüne yardımcı olduğu ve sonuç olarak üretkenliği ve mahsul verimini iyileştirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, rizobiyal polisakaritler, bitki büyümesini teşvik etmede oldukça önemlidir, faydalı etkileşimler sırasında aktif bir sinyal molekülü olarak çalışırlar ve enfeksiyon sürecinde savunma yanıtı sağlamaktadırlar (Parada ve ark., 2006).

Raman spektroskopisi ve FT-IR analizleri biyolojik örneklerin hem hızlı, basit ve biyofilm yapısına zarar vermeyecek şekilde yapılması hem de örnek hazırlama aşamasına ihtiyaç duyulmaması nedeniyle biyofilm karakterizasyonunda yaygın şekilde kullanılan yöntemlerdir. Yaptığımız tez çalışmasında bakteriyel biyofilm yapılarının ayrıntılı analizleri ve karakterizasyonu Raman ve FTIR analizleriyle araştırılmıştır. İncelenen

bakteriyel biyofilmlerin IR spektrumlarında yer alan hücre duvarı ve membranlarında yoğunlaşan lipitler için karakteristik olan metilen gruplarının (CH, CH₂ ve CH₃) bantlarında en yüksek yoğunluk P5-1 için tespit edilmiştir. Raman spektrumları incelendiğinde ise doymuş lipitlere ait bantların K4-1’de en yüksek yoğunlukta olduğu, en düşük yoğunluğun ise KH3-1’de görüldüğü belirlenmiştir. Bu durum biyofilm olgunlaşma safhasında lipit miktarlarındaki değişimleri göstermektedir. Lipidlerin polisakkaritlerle birlikte vizkozu arttırarak biyofilmin yüzeye bağlanmasındaki etkisini arttırdığı düşünülmektedir (Gieroba ve ark., 2020). Tez çalışması sırasında incelenen bakterilerin Raman ve FT-IR piklerinde farklı miktarlarda protein bantlarına rastlanmıştır. Lipopolisakkarit konsantrasyonu ve yüzey zarında proteinlerin varlığı gibi bakteri hücrelerinin yüzey yapısı, bitki köklerinde biyofilm oluşumunu etkileyen önemli faktörlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda LapA (Büyük adhezyon proteini A) olarak isimlendirilen 900 kDa’luk hücre yüzeyi proteini keşfedilmiş ve *P. fluorescens* bakterilerinin kolonizasyonunda önemli etkileri olduğu rapor edilmiştir (Hinsa ve ark., 2003). Benzer şekilde, *P. putida* KT2440 LapA homologlarının, rekabetçi kök kolonizasyonu ve tohumların kaplanması sırasında tohuma yapışmada görev aldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak bu protein biyogübre olarak görev almakta ve bitki gelişimini desteklemektedir (Espinosa-Urgel ve ark., 2000). Yüzeye tutunmaya yarayan domainlere sahip olan LapA özellikle Gram pozitif bakterilerin biyofilm oluşturmada rol almaktadır. Benzer şekilde, Ca²⁺ bağlayan diğer protein domaini ve hemolizinler, konukçu-hücre etkileşimlerinde sıklıkla yer almaktadır (Hinsa ve ark., 2003). *Rhizobium leguminosarum*'da hücre kutuplarında lokalize olan Rap (Rhizobium adhezyon proteini) isimli bir dizi aglütininin Ca²⁺'yı bağladığı düşünülmekte ve rizobiyal hücrelerin bitki dokularına bağlanmasında anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir (Ausmees ve ark., 2001).

Hem FT-IR hem de Raman analizlerinde literatürle uyumlu olarak oligosakkarit ve polisakkaritlerin varlığını gösteren spesifik bantlar gözlenmiştir. Özellikle PGPR-EPS’lerin yapısında bulunan polisakkaritlerin bitki büyümesini teşvik etmedeki rolü daha önce yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Bazı PGPR-EPS (Plant Growth Promoting Bacteria-Extracellular Polymeric Substance) yani PGPR’lerin ürettiği EPS’ler, Na⁺ dahil katyonları da bağlayabilmekte, bu da bitkinin topraktan aldığı mevcut Na⁺ içeriğini azaltarak tuzluluk stresinin azaltılmasında bir rol oynamaktadır (Upadhyay ve ark., 2011). Biyofilmlenmiş aşuların birlikte aşılınması, hastalıkların biyolojik kontrolü için bitkilerde

tanıtılan faydalı mikroorganizmaların başarılı bir şekilde kurulması için kullanılabilir (Jayasinghearachchi ve Seneviratne, 2010). Ancak günümüzde bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin biyofilm özellikleri ile ilgili çok az sayıda çalışma yapılmış ve bu alan şimdiye kadar göz ardı edilmiştir. Bitkilerin büyümesinin desteklenmesine yönelik bu entegre biyofilmlili biyogübre yaklaşımının, daha sürdürülebilir tarımın yanı sıra toprağın verimliliğini de artıracakı belirtilmektedir.

Bu tez çalışmasında; bitki büyümesini teşvik edici özelliği bulunan bakteri suşlarının oluşturdukları biyofilm yapıları analiz edilmiş, SEM ile bitki köklerindeki kolonizasyonu ve biyofilm yapıları görüntülenmiş, FT-IR ve Raman Spektroskopisi ile de biyofilm karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular literatür verileri ile karşılaştırıldığında bu bakteri suşlarının biyofilmlili biyogübre olarak kullanılabilirleri için gerekli olan özellikleri taşıdıkları belirlenmiştir. Ağırlıklı olarak yurt dışından ithal edilmek zorunda kalınan mikrobiyal gübrelerin dayanıklı formlarının ülkemizde üretiminin sağlanabilmesi ülkemiz ekonomisine katkı sunması açısından önem arz etmektedir. Bu bakteri suşlarının biyogübre verimliliklerinin ilerde yapılacak sera bitki denemeleri ile araştırılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G., & Novak, P. J. (2007). Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 2905-2910.
- 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
- Angus, A.A. and Hirsch, A.M. (2013). Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth. In: de Bruijn, F.J., Ed., *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Wiley, New York, Vol. 1 & 2, 701-712.
- Achinas, S., & Euverink, G. J. W. (2019). Elevated biogas production from the anaerobic co-digestion of farmhouse waste: Insight into the process performance and kinetics. *Waste Management & Research*, 37(12), 1240–1249.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology Journal*. 2004; 134:307-319.
- Bernard, R.G. (2012) *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012, Article ID: 963401.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., & Perotto, S. (2009). Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochemistry*, 45(1), 39–50. <https://doi.org/10.4081/1612>
- Beier, B. D., Quivey Jr, R. G., & Berger, A. J. (2010). Identification of different bacterial species in biofilms using confocal Raman microscopy. *Journal of biomedical optics*, 15(6), 066001.
- Bloemberg GV, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying

- microbial communities. *Molecular Plant Microbe Interactions Journal*. 2000; 13:1170-1176
- Burmølle, M., Kjølner, A. and Sørensen, S.J. (2012) An Invisible Workforce: Biofilms in the Soil. In: Lear, G. and Lewis, G., Eds., *Microbial Biofilms-Current Research and Applications*, Caister Academic Press, Norfolk, 61-72.
- Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T., and Clardy J. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America Journal*. 2007; 104:1506-1509.
- Cortizo, M.; De Mele, M.F.L. Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 19, 805–810.
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., & Cheng, K. J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 35(1), 299-324.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49(1), 711-745.
- Çankaya, N. & Sökmen, Ö. (2021). Polimerler-Kil Nanokompozitlerinde Kullanılan Bazı Yüzey Analiz Yöntemleri. *Teknik Bilimler Dergisi*, 11 (1) , 20-32. DOI: 10.35354/tbed.763113
- Davey, M.E. and O’toole, G.A. (2000) Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Delille, A., Quilès, F., & Humbert, F. (2007). In situ monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5782-5788.
- Denkhaus, E.; Meisen, S.; Telgheder, U.; Wingender, J. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchim. Acta* 2007, 158, 1–27.
- Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos JL. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology Journal*. 2002; 148:341-343.

- Geoghegan, M., Andrews, J. S., Biggs, C. A., Eboigbodin, K. E., Elliott, D. R., Rolfe, S. & Banwart, S. A. (2008). The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion. *Faraday Discussions*, 139, 85-103.
- Gieroba, B., Krysa, M., Wojtowicz, K., Wiater, A., Pleszczyńska, M., Tomczyk, M., & Sroka-Bartnicka, A. (2020). The FT-IR and Raman spectroscopies as tools for biofilm characterization created by cariogenic streptococci. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3811.
- Haggag WM, Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Applied Microbiology Journal*. 2008; 104:961-969.
- Hayward A. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Reviews of Phytopathology Journal*. 1991; 29:65-87.
- Ikuma, K., Decho, A. W., & Lau, B. L. (2013). The extracellular bastions of bacteria—a biofilm way of life. *Nature Education Knowledge*, 4(2), 2-19.
- Ivleva, N. P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., & Haisch, C. (2009). Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(1), 197-206.
- Jayasinghearachchi, H. S., & Seneviratne, G. (2010). A mushroom-fungus helps improve endophytic colonization of tomato by *Pseudomonas fluorescens* through biofilm formation. *Research Journal of Microbiology*, 5(7), 689-695.
- Jefferson, K.K. (2004) What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-173.
- Ji XL, Lu GB, Gai YP, Zheng CC, Mu ZM. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiology and Ecology Journal*. 2008; 65:565-573.
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., & Biggs, C. A. (2011). “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1869-1881.

- Keleştemur, S.; Avcı, E.; Çulha, M. Raman and Surface-Enhanced Raman Scattering for Biofilm Characterization. *Chemosensors* 2018, 6, 5.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N. (1980) Enhancing Plant Growth by Siderophores Produced by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Küçük, Ç., Bitki Probiyotik Bakteriler: Bitkiler Üzerindeki Roller ve Uygulamalar. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(1): p. 1-15.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. and Rice, S.A. (2014) Biofilm Development and Enhanced Stress Resistance of a Model, Mixed-Species Community Biofilm. *The ISME Journal*, 8, 894-907
- Lemessa F, Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control Journal*. 2007; 42:336-344.
- Lohumi, S.; Kim, M.S.; Qin, J.; Cho, B.-K. Raman imaging from microscopy to macroscopy: Quality and safety control of biological materials. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2017, 93, 183–198.
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Reviews Phytopathology Journal*. 2001; 39:461-490.
- Malusá E, Sas-Paszt L, Ciesielska J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:491206. doi: 10.1100/2012/491206. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22547984; PMCID: PMC3324119.
- Marcotte, L.; Barbeau, J.; Lafleur, M. Characterization of the diffusion of polyethylene glycol in *Streptococcus mutans* biofilms by Raman microspectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2004, 58, 1295–1301.
- Mueller, L.N.; De Brouwer, J.F.; Almeida, J.S.; Stal, L.J.; Xavier, J.B. Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecol.* 2006, 6, 1.

- Nathan K. Archer, Mark J. Mazaitis, J. William Costerton, Jeff G. Leid, Mary Elizabeth Powers & Mark E. Shirtliff (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms, *Virulence*, 2:5, 445-459.
- Neu, T.R.; Woelfl, S.; Lawrence, J.R. Three-dimensional differentiation of photoautotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J. Microbiol. Methods* 2004, 56, 161–172.
- Normander, B. and Prosser, J.I. (2000) Bacterial Origin and Community Composition in the Barley Phytosphere as A Function of Habitat and Pre-Sowing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4372-4377.
- Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms*. 2017; 5(1):9.
- Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology Journal*. 2008; 16:115-125.
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(3):449-61. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x. PMID: 9632250.
- Pandit, A., Adholeya, A., Cahill, D., Brau, L., Kochar, M. 2020. “Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications”, *Journal of applied microbiology*, 129 (2), 199-211.
- Rao, D., Webb, J.S. and Kjelleberg, S. (2005) Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1729-1736.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Sandhya Vardharajula, Shaik Zulfikar Ali, Minakshi Grover, Gopal Reddy & Venkateswarlu Bandi (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.:

effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress, *Journal of Plant Interactions*, 6:1, 1-14, DOI: 10.1080/17429145.2010.535178

Seneviratne, G., Weerasekara, M.L.M.A.W., Seneviratne, K.A.C.N., Zavahir, J.S., Kecskés, M.L., Kennedy, I.R. (2010). Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. In: Maheshwari, D. (eds) *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg.

Singh, A., Jain, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S. and Singh, H.B. (2014) Rhizosphere Competent Microbial Consortium Mediates Rapid Changes in Phenolic Profiles in Chickpea During *Sclerotium Rolfsii* Infection. *Microbiological Research*, 169, 353-360.

Singh, A., & Chauhan, P. S. (2017). Ecological significance of soil-associated plant growth-promoting biofilm-forming microbes for stress management. *Biofilms in Plant and Soil Health*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 291-326.

Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005) Studying Plasmid Horizontal Transfer in Situ: A Critical Review. *Nature Review of Microbiology*, 3, 700-710.

Stepanovic, S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. 2000. "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation", *J. Microbiol. Methods*. 40, 175–179.

Stewart, P. S., Murga, R., Srinivasan, R., & de Beer, D. (1995). Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water research*, 29(8), 2006-2009.

Strathmann, M.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* 2002, 50, 237–248.

Suci, P.; Siedlecki, K.; Palmer, R.; White, D.; Geesey, G. Combined light microscopy and attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution, and chemistry at solid-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4600–4603

- Suci, P.A.; Geesey, G.G.; Tyler, B.J. Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in *Candida albicans* biofilms. *J. Microbiol. Methods* 2001, 46, 193–208.
- Sunita Rangarajan, Saleena, L.M., Vasudevan, P. et al. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp. under saline soil conditions. *Plant and Soil* 251, 73–82 (2003).
- Tapia, J. M., Munoz, J. A., Gonzalez, F., Blázquez, M. L., & Ballester, A. (2009). Interrelation between cells and extracellular polymeric substances (EPS) from *Acidiphilium* 3.2 Sup (5) on carbon surfaces. In *Advanced Materials Research* (Vol. 71, pp. 287-290). Trans Tech Publications Ltd.
- Timmusk, Salme & Grantcharova, Nina & Wagner, E Gerhart H. (2005). *Paenibacillus polymyxa* Invades Plant Roots and Forms Biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 71. 7292-300. 10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005.
- Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Saxena, A.K. and Singh, D.P. (2011), Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14: 605-611.
- Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R. B., Rao, V. R., Kalam, S., & Podile, A. R. (2014). Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian journal of microbiology*, 54(4), 403-412.
- Vestby, L. K., Møretro T., Langsrud S., Heir E., Nesse L.L. 2009. “Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories”, *BMC Vet. Res.* 5, 20-26.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweitzer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formations, and root exudation. *Plant Physiology Journal*. 2004; 134:3210-3331.

Wedad A. Kasim, Reda M. Gaafar, Rania M. Abou-Ali, Mohamed N. Omar, Heba M. Hewait, Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley, *Annals of Agricultural Sciences*, Volume 61, Issue 2, 2016, Pages 217-227.

Xue QY, Chen Y, Li SM, Chen LF, Ding GC, Guo DW, Guo JH. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control Journal*. 2009; 48:252-258.



EKLER

Ek 1

Çalışmayla alakalı; [Ahi Evran International Conference on Scientific Research, “Determination Of Biofilm Forming Capacities Of Some Plant Growth Promoting Bacteria” 30 November – 1-2 December, 2021], sunulmuştur.



Ahi Evran International Conference on Scientific Research
30 November – 1-2 December, 2021 / Abstract Book

BİTKİ BÜYÜMESİNİ TEŞVİK EDEN BAZI BAKTERİLERİN BİYOFİLM OLUŞTURMA KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF BIOFILM FORMING CAPACITIES OF SOME PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA

Tacettin ÇİFTÇİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir, Türkiye.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0005-6867>

İbrahim ERDOĞAN

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir, Türkiye.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9583-0474>

ÖZET

Günümüz şartlarında tarım; hayvancılığa olan talebin artması ve giderek artan insan nüfusunun gıda ihtiyacına karşılık verebilmek için sürdürülebilir tarımsal üretim, sınırlı kaynakların kullanılması (verimli topraklar gibi), geleneksel tarım uygulamalarından kaynaklanan yoğun çevresel sorunların giderilmesi gibi farklı zorluklarla karşı karşıyadır. Bu sorunlar, gıda verimliliğini arttırmak için kimyasal gübre yerine mikroorganizma içerikli organik gübrelerin kullanımı yoluyla ve bu amaçla yerli toprak mikroorganizmalarının keşfi ve kullanılması ile minimize edilebilir. Zengin toprak mikroflorası arasında, bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (BBTER), bir dizi yararlı etki yoluyla bitki büyümesini artırmada önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bu genellikle, rizosferdeki planktonik bakteri varlığına göre avantajları olan biyofilmler oluşturarak elde edilmektedir. Ancak, bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri geçmişte yapılan araştırmalarda ihmal edilmiştir. Geleneksel olarak, bakteri hücreleri serbest yaşayan hücreler olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir, ancak farklı çevresel koşullar altında biyofilm oluşturma yetenekleri vardır. Biyofilm oluşumu ve yayılımının çok iyi tanımlanmış ve aşağıdaki aşamaları içerdiği bilinmektedir: ilk bağlanma, hücreler arası bağlanma, desorpsiyon, biyofilm olgunlaşması ve biyofilm dağılımı. Biyofilmlerin ayrıca azot ve fosfor gibi kompleks besin maddeleri içeren farklı bileşikler parçaladığı bildirilmiştir. Biyotik yüzeylerle biyofilm ilişkilendirmeleri hakkındaki araştırmalar önem kazanmaya başlamış ve bu, tarımda bakteriyel biyofilmlerin kullanımına ivme kazandırmıştır. BBTER tarafından gerçekleştirilen biyofilm yapıları, doğal koşullar altında ortak bir yaşam tarzı olarak kabul edilir ve bitkiler için biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı koruma sağlar. Bitki büyümesini teşvik eden çeşitli rizobakteriler arasındaki etkileşim, esas olarak bakterilerin planktonik büyüme modu altında araştırılmıştır. Bununla birlikte, BBTER'nin bitkilerin kök yüzeyleri ve topraktaki biyofilm modundaki davranışları hakkında daha çok araştırmaya ve bilgiye ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın ana amaçlarından biri de bu alana katkı sunmaktır. Yapılan araştırmalarda tarım sektörüne odaklanan biyofilimli biyogübrelerin önemli potansiyel faydalarının olabileceği belirtilmiştir. Bu tür ürünlerin, bitkiyi sadece çeşitli çevre ve toprak kaynaklı hastalıklara karşı değil, aynı zamanda tuzluluk, kuraklık, inorganik ve organik kirleticiler gibi abiyotik streslere karşı koruyabileceği ve potansiyel olarak ürün verimliliğini artıracığı belirtilmiştir. Bu çalışmada seçmiş olduğumuz toprak bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole deneyi ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, BBTER, mikrobiyal biyofilm, mikrobiyal biyogübre

ABSTRACT

Agriculture in today's conditions; In order to meet the increasing demand for livestock and the food needs of the growing human population, sustainable agricultural production is faced with different challenges such as the use of limited resources (such as fertile lands), and the elimination of intense environmental problems arising from traditional agricultural practices. These problems can be minimized by the use of organic fertilizers containing microorganisms instead of chemical fertilizers to increase food productivity and by the discovery and use of native soil microorganisms for this purpose. Among the rich soil microflora, studies have

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tacettin ÇİFTÇİ
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Fırat Üniversitesi
Fakülte	Fen - Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2006
Yüksek Lisans	
Üniversite	İnönü Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi
Programı	Kimya Öğretmenliği
Mezuniyet Tarihi	2009
Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Tıp
Mezuniyet Tarihi	2019