

• TOPRAK BİYOLOJİSİ

• Doç. Dr. SERDAR BİLEN

7. BÖLÜM

AZOTUN TOPRAGA DÖNÜŞÜ:

BİYOLOJİK AZOT FİKSASYONU

7.1. Giriş

Azot, canlı hücrelerin temel yapısını oluşturan protoplazmanın yapı taşı olup hücre bileşiminde karbon içeren maddelerle birleşerek aminoasitler, amidler, proteinler, vitaminler ve hormonlar gibi çeşitli organik bileşikler oluşturmaları nedeniyle toprağın fauna ve florasının yaşamlarında önemli bir yer tutar (Akçin, 1981).

Azot yeryüzünde katı, sıvı ve gaz şeklinde bulunur. Kaya ve minerallerde çok az bulunmasına karşılık litosfer tabakasında bulunan büyük kaya parçaları, yeryüzündeki toplam azotun % 98'ini içerir. En büyük mikrobiyolojik potansiyel, atmosferdeki yayayışlı rezervlerdir. Yeryüzünde bulunan azotun % 1.2'si atmosferde bulunan azotun % 79 (3.9×10^{21} g)'una eşdeğerdir (Paul ve Clark, 1989).

Bir dekar arazi üzerindeki havada 9 bin ton azot gazı bulunur (Ülgen, 1975).

Baklagil olmayan bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmaların büyük bir kısmı elementel azot gazından yararlanamazlar. Bitkilerin azottan doğrudan veya gübre olarak yararlanmaları için atmosfer azotunun bazı değişikliklere uğraması gerekmektedir.

Bu değişimler:

- 1) atmosferde oluşan elektriksel boşalım olaylarıyla atmosfer azotunun azot oksitlere dönüştürülmesi,
- 2) baklagil bitkileriyle ortak yaşayan *Rhizobium* bakterilerinin moleküler azotu fiks etmesi,
- 3) serbest olarak toprakta ve bazı tropikal bitkilerin yapraklarında yaşayan mikroorganizmaların azot fiksasyonu,
- 4) yüksek sıcaklık ve basınç altında kimyasal olarak moleküler atmosfer azotu (N_2) ve H_2 moleküllerinin NH_3 oluşturmak üzere reaksiyona girdikleri "**Haber-Bosch**" yöntemiyle fiks edilerek amonyumlu gübrelerin temelini oluşturmasıdır (Aydemir, ve İnce 1988; Sezen, 1991).



Atmosfer azotunun doğal olarak mikroorganizmalarca fiks edilmesine **Biyolojik Azot Fiksasyonu** denir.

Dünya üzerinde toplam biyolojik azot fiksasyonu yılda yaklaşık 17×10^7 ton olduğu ve bunun kimyasal yöntemlerle fiks edilen azotun dört katına eşdeğer olduğu bilinmektedir (Aydemir ve İnce 1988; Paul ve Clark, 1989).

- Toprak ekosisteminde biyolojik azot fiksasyonuna etki eden faktörler;
 - 1- Toprağın inorganik besin elementi içeriği,
 - 2- pH,
 - 3- nem içeriği
 - 4- sıcaklık,
 - 5- fiksasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaların aktivitesi gibi faktörler etkili olmaktadır.
-
- Biyolojik azot fiksasyonu yüksek bitkilerle ortak yaşayan (simbiyotik) ve serbest yaşayan (non-simbiyotik) mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir.
 - Azot fiksasyonundan sorumlu çeşitli prokaryot organizmalara artık **diazotrof** denilmektedir.
 - Bu organizmalar içerisine,
 - 1- organotrof bakteriler,
 - 2- fototrofik kükürt bakterileri ve
 - 3- cyanobakteriler (mavi-yeşil algler) girmektedir
 - (Paul ve Clark, 1989).

7.2. Simbiyotik Azot Fiksasyonu

- 2000 yıldan daha önceki yıllarda yaşayan Roma yazarları baklagil bitkilerinin yararlı etkilerine işaret etmişlerdir.
- Azotun atmosferden alınışı ile ilgili ilk öneri 1813 yılında Sir Humphrey Davey'den gelmiştir. Davey buğday yetiştirilen toprağı hazırlamak için önce bezelye ve fasulye bitkilerinin yetiştirilmesinin iyi geldiğini açıklamıştır. Böylece bitki rotasyonunda baklagiller kullanılmaya başlamıştır.
- J.B. Boussingault 1837-1842 yılları arasında kendi tarlasında baklagil bitkileriyle yaptığı rotasyon çalışmalarını Fransa'da bir dizi makaleler halinde yayınlamıştır.
- Almanya'da 1856'da Albert Thaer beyaz üçgül ile, 1857'de Lawes, Gilbert ve Pugh tarafından Rothamsted deneme istasyonunda, yapılan denemelerde baklagil bitkisi ekilen topraklarda azot miktarının yüksek olduğunu ve simbiyotik azot fiksasyonunu keşfetmişlerdir,

Baklagil bitkilerinin kökleri üzerinde nodüllerin varlığı eskiden beri bilinmekte olup, 1858'de Lachman bunlara bakterilerin neden olduğunu ve azot fiksasyonunda rol oynadıklarını tespit etmiştir (Saatçı, 1976).

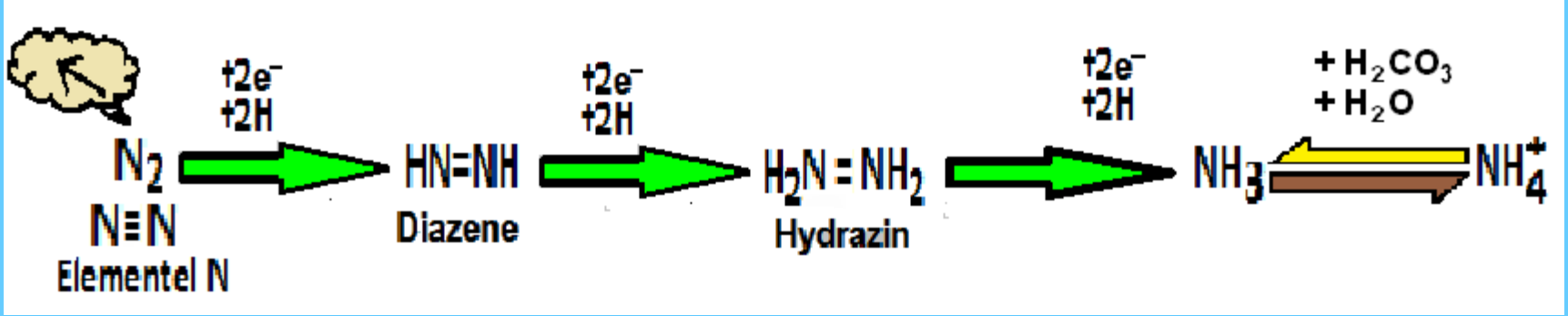
1866'da Waronin nodozitelerin bakteri içeren patolojik bir gelişme olduğunu düşünmüştür.

1886'da Helriegel ve Wilfarth, simbiyotik N₂ fiksasyonunda nodüllerin önemini açıklamışlardır.

1888 'de Beijerinck baklagil bitkilerinde N₂ fiksasyonunda görevli organizmaları izole etmiş ve *onları Bacillus radicola* olarak isimlendirmiştir.

Bu isim daha sonraları Frank tarafından bu bakteriler *Rhizobium* olarak değişmiştir (İsmailçelebioğlu, 1980; Paul ve Clark, 1989).

Yüksek bitkilerle ortak yaşayan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen azot fiksasyonuna **Simbiyotik Azot Fiksasyonu** denir.



Bu ortak yaşam ilişkisinde mikroorganizmalar konakçı bitkiye indirgenmiş yani fiks edilmiş azotu sağlarlar.

Konakçı bitki ise mikroorganizmalara çözünebilir karbonhidratları sağlamaktadır.

Baklagil olmayan ağaç grubundan olan yüksek bitkilerle diazotroflar arasında da bir ortak yaşam söz konusudur.

Böyle baklagil olmayan bitkilerin yetiştiği alanların azot ekonomisine önemli katkıda bulunmasından sorumlu diazotroflar arasında

- bakteriler,
- bakteriyofojlarla enfekte edilmiş bakteriler ve
- aktinomisetler sayılabilir.

Bundan başka gerek ağaçlarla gerekse kültür bitkileriyle mantarlar arasında da ortak yaşam bulunmuştur.

- *Glomus* ile yoğun bir şekilde kökleri sarılmış bitkilerde azot fiksasyonunun düşürüldüğü ancak mikrorizayı inhibe eden toprağın yüksek fosfor düzeyleri, çayır bitkileri ile ortak azot fiksasyonunu arttırabilecektir.
- Bunun yanında Gür (1976), soğan bitkisiyle *Endogen* mantarları arasındaki ortak yaşam ile ilgili yaptığı bir araştırmada ürün veriminin arttığını tespit etmiştir.

- Tarımda baklagil bitkileriyle simbiyotik yaşayan *Rhizobium* bakterileri en önemli azot (N_2) fiks edicileridir.
- Baklagil bitkileri 700 farklı cinsi kapsayan 14.000 türden oluşmuştur. Bunların bir çoğunda özellikle tropikal ormanlık alandakilerde nodül oluşumu ve N_2 fiksasyonu belirlenememiştir.
- Tarımsal açıdan önemli 100 baklagil bitki çeşidinin yetiştirildiği 250×10^6 ha alanda önemli miktarda biyolojik N_2 fiksasyonu meydana gelmektedir (Tablo 7.1) Bunun yılda hektara 140 kg olduğu tahmin edilmektedir (Paul ve Clark, 1989).

Tablo 7.1. Değişik Arazi Kullanma Durumuna Göre Azot Fiksasyonu
(Paul ve Clark, 1989).

Arazi Kullanımı	ha ($\times 10^6$)	Azot (N_2) Fiksasyonu ($kg\ ha^{-1}\ yıl^{-1}$)
Baklagiller	250	140
Pirinç	135	30
Diğer kültür bitkileri	1015	5
Devamlı çayırlar, çimenler	3000	15
Orman ve ağaçlık alanlar	4100	10
Kullanılmayan	4900	2
Buzla kaplı	1500	0
Toplam alan	14.900	-
Deniz	36.100	1
Genel Toplam	51.000	

Herhangi bir baklagil bitkisinin nodülünden izole edilen belirli bir *Rhizobium* türünün izole edildiği baklagil bitkisinden başka varyetelerde de nodül oluşturma ve azot fiks etme yeteneğine **Capraz Aşılama (Cros-Inokülason)** denir.

Tarımsal olarak çok önemli baklagillerle ortak yaşayan diazotroflar ve kros-inokülasyon grupları Tablo 7.2'de verilmiştir.

Tablo 7.2'deki sınıflama, tropikal bölge ağaçları üzerinde bulunanlar gibi birçok *Rhizobium* türünü içine almamaktadır. Ancak bu sınıflama aşısı (inocula) üretilmesi gibi tarımsal amacı açısından önem taşımaktadır (Akçin, 1981).

Cins	Önceki isimlendirme	Son isimlendirme	Konukçu Bitki
Azorhizobium	Rhizobium japonicum	Azorhizobium caulinodans	Sesbania (Sesbanya)
Bradyrhizobium (Yavaş gelişenler)	R. japonicum	Bradyrhizobium japonicum	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Borlulce)
		B. kiplini	Lupinus (Aci bakia) Lotus (Gazal boynuzu) Ornithopus
		B. parsoniae	Parsoniae, Vigna (Borlulce)
		Bradyrhizobium sp	Cicer (Nohut), Acacia, Ornithopus Sesbania (Sesbanya)
Rhizobium (Hızlı gelişenler)	R. japonicum	R. fredii (Sinorhizobium fredii)	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Borlulce)
	?	R. galegae	Galega
	R. phaseoli	R. leguminosarum biovar	Phaseolus (Fasulye)
	R. trifolii	R. leguminosarum biovar	Trifolium (Tirfil)
	R. lotii	R. leguminosarum biovar viciae	Pisum (Bezelye), Lens (Mercimek) Lathyrus (Tatli bezelye) Vicia (Bakia)
		R. lotii	Lotus Gazal boynuzu) Lupinus (Aci bakia) Cicer (Mercimek)
		R. meliloti	Melilotus (Yonca) Medicago (Tas yoncası) Trigonella
	R. leguminosarum biovar phaseoli	R. tropici	Phaseolus (Fasulye) Leucaena
		Rhizobium sp. İzolatı NGN234	Leucaena, Macroptilium Vigna (Borlulce)
Sinorhizobium	R. fredii	S. fredii	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Borlulce)

Soya *Rhizobium* ortaklığında yılda fiks edilen azotun 4-12 kg/ha olduğu tespit edilmiştir (Alexander, 1961; SundaraRao, 1971; İsmailçelebioğlu, 1990; Kızıloğlu, 1991).

Ersin (1978), Ülgen (1978), Tan 1990) ve Kızıloğlu (1995) adi fiğ, Aksoy (1971) ve Akçin (1976) fasülye, Kantar ve ark. (1994) ve Kızıloğlu (1992) yeşil mercimek, Senanayaka ve ark. (1987) börülce (1987) bitkileriyle yaptıkları çalışmalarda *Rhizobium* bakterileriyle aşılama (inokülasyon) işlemleri sonucu bitkilerin azot (N₂) fiksasyonlarının ve buna bağlı olarak ürün miktarlarının artışı gösterdiğini tespit etmişlerdir.

7.2.1. Baklagillerde Enfeksiyon ve Nödü Oluşumu

Rhizobium bakterilerinin konak bitki kökünü enfeksiyonu ve kök nödüllerinin oluşumu Şekil 7.1'de gösterilmiştir .

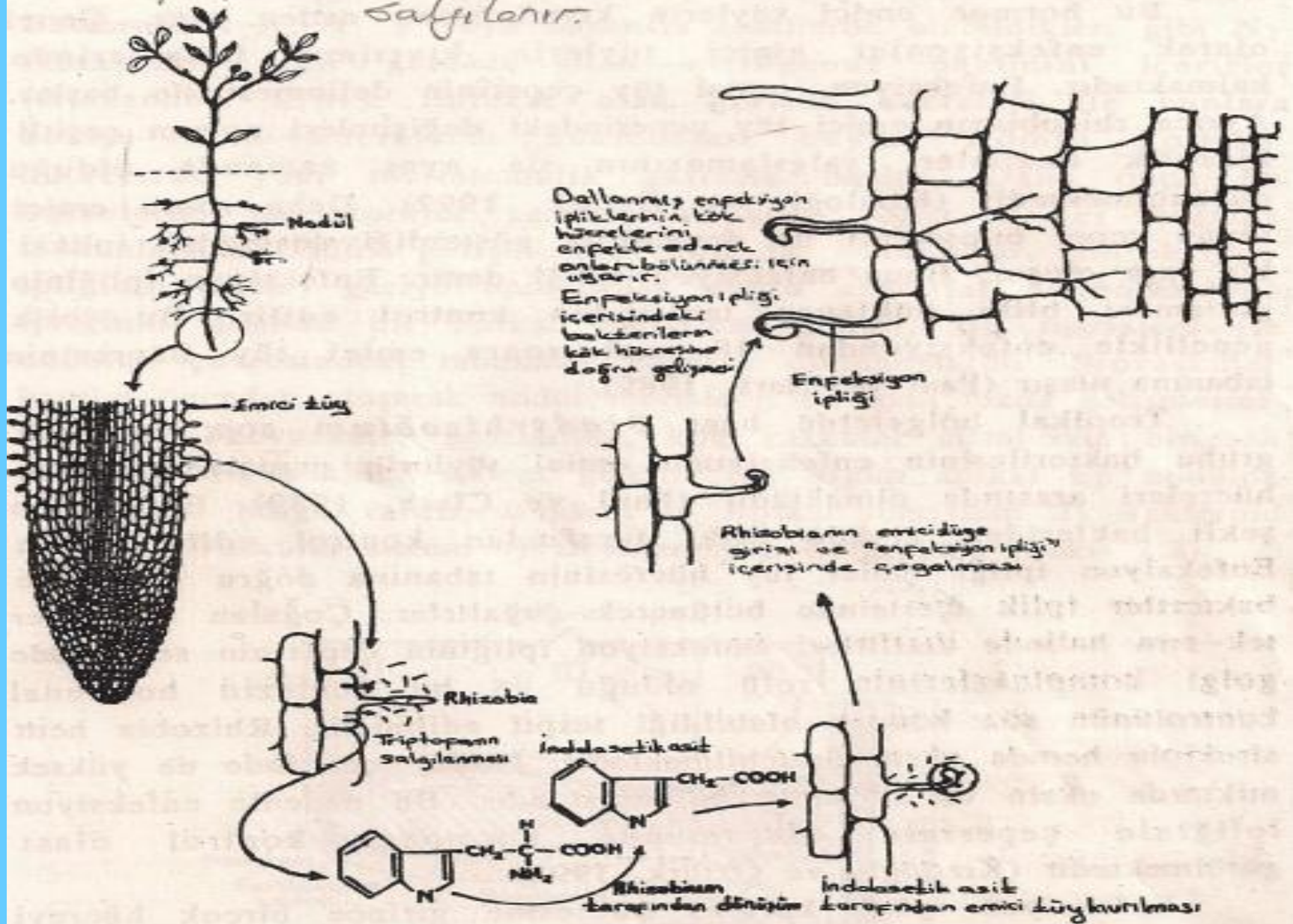
Baklagil bitkilerinin kökleri, rizosferde mikrofloranın gelişmesini uyaran bir çeşit organik materyaller salgılar. Eğer toprakta rhizobia varsa bunlar rizosferde gelişerek çoğalırlar.

2 μm uzunluğundaki bir bakteri dakikada kendi boyunun 3000 misli yol kateder. (6 mm/dk, 360 mm/sa, 3,6 m/sa)

En hızlı hayvanlar çitalar kendi boylarının 1500 misli yol alırlar.

- Emici tüyler yoluyla enfeksiyonda, bitki kökünün salgıladığı triptofan rhizobia tarafından bitki hormonu indolasetik asite dönüştürülür (Brock, 1974).
- Bu hormon emici tüylerin kıvrılmasına neden olur. Genel olarak enfeksiyonlar emici tüylerin kıvrılmış bölgelerinde kalmaktadır. Enfeksiyon, emici tüy çeperinin delinmesi ile başlar.
- Ayrıca rhizobianın emici tüy çeperindeki değişimleri uyaran çeşitli hidrolik enzimleri salgılamasının da aynı zamanda olduğu düşünülmektedir, (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

İsoflavonoidler (aromatik madde) laktin salgılar.



Şekil 7.1. Bir kök nodülünün oluşumunda safhalar (Brock, 1974).

Daha sonra emici tüyler ceper bileşenleri ile devamlılık gösterdiği düşünülen ipliksi bir yapı oluşur. Buna enfeksiyon ipliği denir. Enfeksiyon ipliğinin gelişmesi bitki nükleusu tarafından kontrol edilir. Bu iplik genellikle enfeksiyondan 48 saat sonra emici tüy hücresinin tabanına ulaşır (Paul ve Clark, 1989).

Tropikal bölgelerde bazı *Bradyrhizobium* spp. "cowpea" grubu bakterilerinin enfeksiyonu emici tüylerin geni lemi  taban hücreleri arasında olmaktadır (Paul ve Clark, 1989).

Enfeksiyon şekli bakteriden ziyade bitki tarafından kontrol edilmektedir.

Enfeksiyon ipliği emici tüy hücresinin tabanına doğru geliştikçe bakteriler iplik içerisinde bölünerek çoğalırlar.

Çoğalan bakteriler tek sıra halinde dizilirler.

Enfeksiyon ipliğinin çeperinin sentezinde golgi komplekslerinin rolü olduğu ve bu sentezin hormonal kontrolünün söz konusu olabildiği tespit edilmiştir.

Rhizobia hem sitokinin hemde oksin üretebilmektedir.

Nodül içerisinde yüksek miktarda oksin ve sitokinin bulunmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon ipliğinin çeperinin oluşumunda hormonal kontrol olası görülmektedir (Kızıloğlu ve Öztürk.. 1992).

Enfeksiyon ipliği korteks hücrelerine girince birçok hücreyi enfekte edebilmek için dallanır. Bu iplik, kök içerisinde üç ile altı radyal tabakaya girdiğinde, gelişen ipliğin önündeki iç korteks hücrelerinin küçük gruplarından bitkinin dış yüzeyine dik olarak (antiklinol) mitoz bölünme faaliyetleri başlar. Böylece apikal tip hücre kitlesi (apikal nodül) oluşumu başlamaktadır.

Enfeksiyon ipliğinin dalları daha önceden uyarılmış olan meristematik bölgedeki hücrelere girerler.

Rhizobia tarafından uyarılan sellüloz aktivitesi ile enfeksiyon ipliği parçalanır ve rhizobia hücre içerisinde serbest kalır. Rhizobia enfeksiyon ipliğinden gelişen bir peribakteroid zar içerisinde ve bakteriler tarafından salgılanan "**zoogleal**" matriks içeren mukosakkarit ile çevrilirler (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

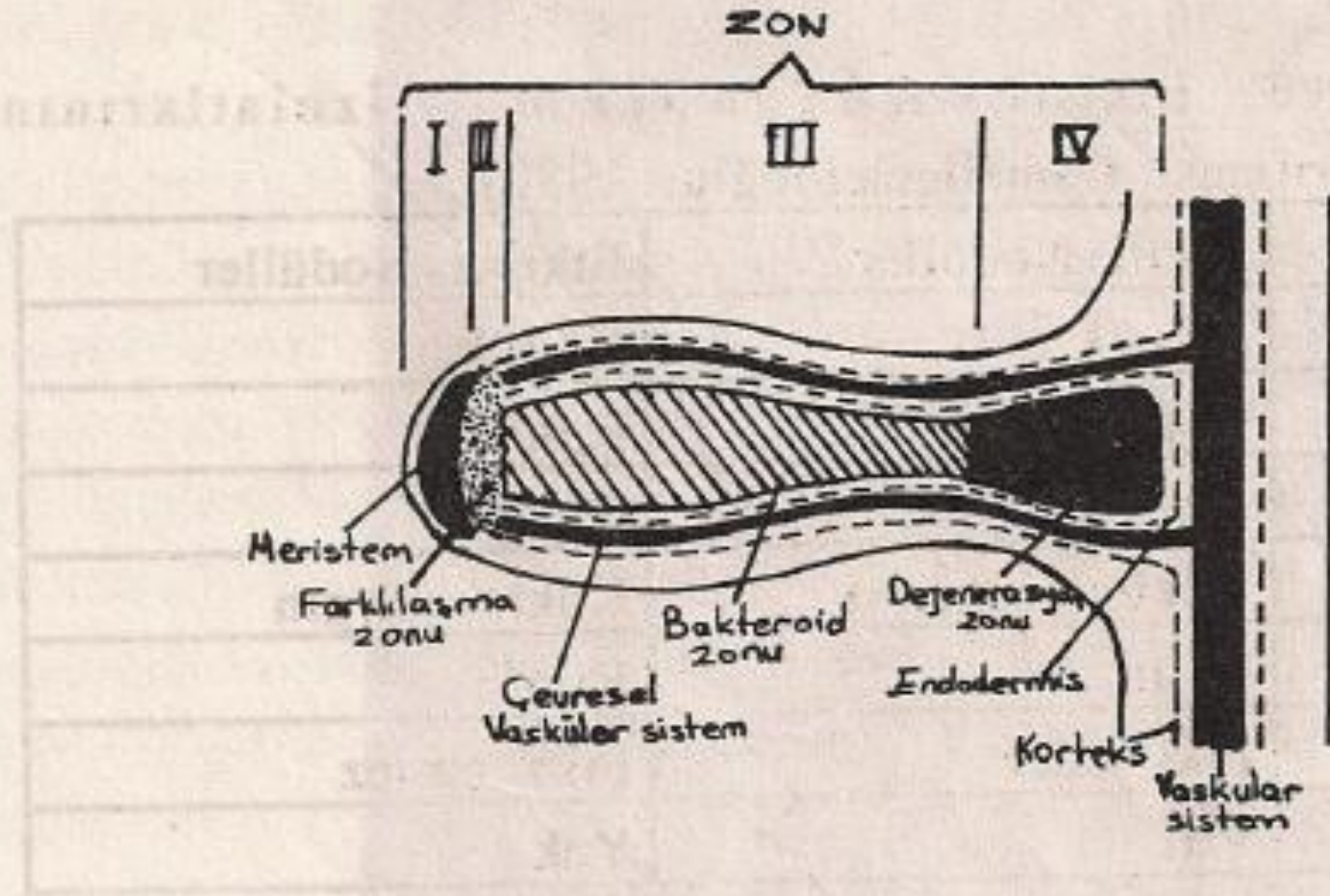
Bu şekli alan bakteriye, "**bakteroid**" denir.

Bakteroidler X, Y, T veya düzensiz şekillerde olabildikleri gibi N₂ fiksasyonu için gerekli olan nitrogenaz enzimini içerirler (Alexander, 1961).

Enfekte olan korteks hücreleri ile bunlara komşu olan hücrelerin nükleusları büyür. Komşu korteks hücrelerde yeni meristematik aktivite başlar. Bu hücrelerde bakteroidler tarafından işgal edilir. Diğer korteks tabakalarında nodül gelişmesine katkıda bulunurlar. Enfeksiyon ipliğinin dalları geriyeepidermise doğru uzanırlar ve enfeksiyon ipliğinin önünde bir apikal meristem gelişir. Bu meristem ile nodülün çevresindeki tabakalar enfekte olmamışlardır. Provasküler bantlar önceden oluşarak nodül meristemi ile aynı hızda gelişmesini sürdürür. Provasküler bantlardan, kök vasküler sistemiyle birleşen çevresel bir vasküler sistem gelişir. Bir olgun apikal tip nodülde dört farklı bölge vardır.

Bunlar:

- 1) Apikal meristem
- 2) Bakteroid bölge
- 3) Vasküler sistem
- 4) Dejerierasyon bölgesi (Şekil 7.2).



Şekil 7.2. Apikal nodül (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

Üç tip nodül oluşumu vardır. Bunlar:

1) Apikal n d ller :

Yonca (*Medicago*),       (*Trifolium*), mercimek (*Lens*), bezelye (*Pisum*), fi  (*Vicia*)'da bulunur.

2) Küresel nodüller :

Fasülye (*Phaseolus*), soya (*Glycine*), Börülce (*Vigna*)'de bulunur.

3) Yaka (halka) nodüller:

Acı Bakla (*Lupinus*)'da bulunurlar.

Nodül  ekli ne olursa olsun rhizobianın varlığı hissedilir hissedilmez hücre içi DNA sentezinin duplikasyonu yeniden oluşmaktadır (Kızılo lu ve  zt rk, 1992).

Nodüller aşağıdaki özelliklerinden dolayı köklerden ayrılırlar ( smail elebio lu, 1980).

1- Nodüller bakteri enfeksiyonu ile oluşurlar.

2- Korteks içinde bir bakteroid alanına sahiptirler.

3- Nodüllerin orta silindirleri yoktur.

4- Kök ba cı ına benzer bir yönleri yoktur.

Resim 1 ve 2'de görüldüğü gibi baklagil bitkisinin kökleri üzerindeki az sayıda, büyük nodüller etkili *Rhizobium* izolatına işaretetmektedir (Kızıloğlu, 1991, Kızıloğlu, 1992). Aksi durum ise etkisiz *Rhizobium* izolatını gösterir (Tablo 7.3).

Tablo 7.3. Etkili ve Etkisiz *Rhizobium* İzolatlarının Karşılaştırılması (İsmailçelebioğlu, 1980).

Özellikler	Etkili Nodüller	Etkisiz Nodüller
Büyüklik	Büyük	Küçük
Renk	Pembe	Renksiz
Sayı	Az	Çok
Yer	Kökün yukarısı	Kökte yaygın
Yaş	Uzun	Kısa
N ₂	Fiks eder	Fiks etmez
Bakteroid	Var	Yok

7.2.2. Nodüllerde Azot Fiksasyonunun Biyokimyası

Azot fikse eden olgun bir nodül, pembe renklidir. Bu renge "**leghemoglobin**" denen hemoglobin benzeri bir proteinin üretimi neden olur.

Azot fiks eden nodüllerde hem **bakteroidler** hemde **leghemoglobin** bulunur.

Leghemoglobin simbiyozu özeldir
Ancak Nitrogenaz enzimi simbiyozu özel değildir.

Yani ne *Rhizobium* nede bitki tek başına leghemoglobin üretemezler. Ancak her ikisinin ortak (simbiyotik) yaşamacı sonucu leghemoglobin üretilir (Brock,1974).

Leghemoglobinden başka 18-20 kadar nodüle özel polipeptid tanımlanmıştır ve bu proteinler, konakçı hücre sitoplazmasında sentezlenen toplam proteinlerin % 7-11'ni temsil ederler.

Nodüle özel olan "**Nodulin**" denen proteinlerin sentezi ancak başarılı simbiyotik ilişkiler sonucu olmaktadır.

Nodül içerisinde leghemoglobinin görevleri;

- 1)- Azot fiksasyonu için gerekli olan oksijeni belli bir basınç seviyesinde tutmak,
- 2)- Azot fiksasyonu için gerekli olan oksijenin tesirli olarak hücrelere difüzyonunu sağlamak,
- 3)- Solunum aktivitesini hızlandırmak suretiyle daha fazla azot fiksasyonunu sağlamaktır.

Hücreler yaşlanınca leghemoglobinlerini kaybederler (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

Leghemoglobinin sentezi için genetik bilgi bitki tarafından türetilir. İki farklı baklagil bitkisi, aynı *Rhizobium* türleri ile enfekte edilirse elektroforetik farklar gösteren leghemoglobin proteinleri oluşur.

Oysa aynı baklagil bitkisi iki farklı *Rhizobium* türü ile enfekte olursa aynı leghemoglobin proteinleri oluşur.

Leghemoglobin, nodülde indirgenmiş bir redoks potansiyeli muhafaza ederek azot fiksasyonunda rol oynar. Azot fiksasyonunun mekanizması, N_2 fiks eden prokaryotların çoğundakine benzerdir.

Nitrogenaz enzimi, iki demir-kükürt proteinlerinden oluşmuştur.

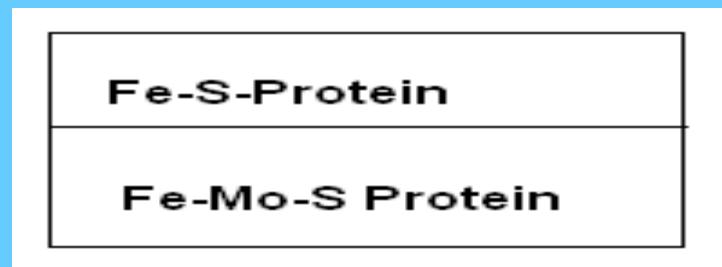
Bunlardan birisi, 60.000 molekül ağırlığıyla demir proteindir.

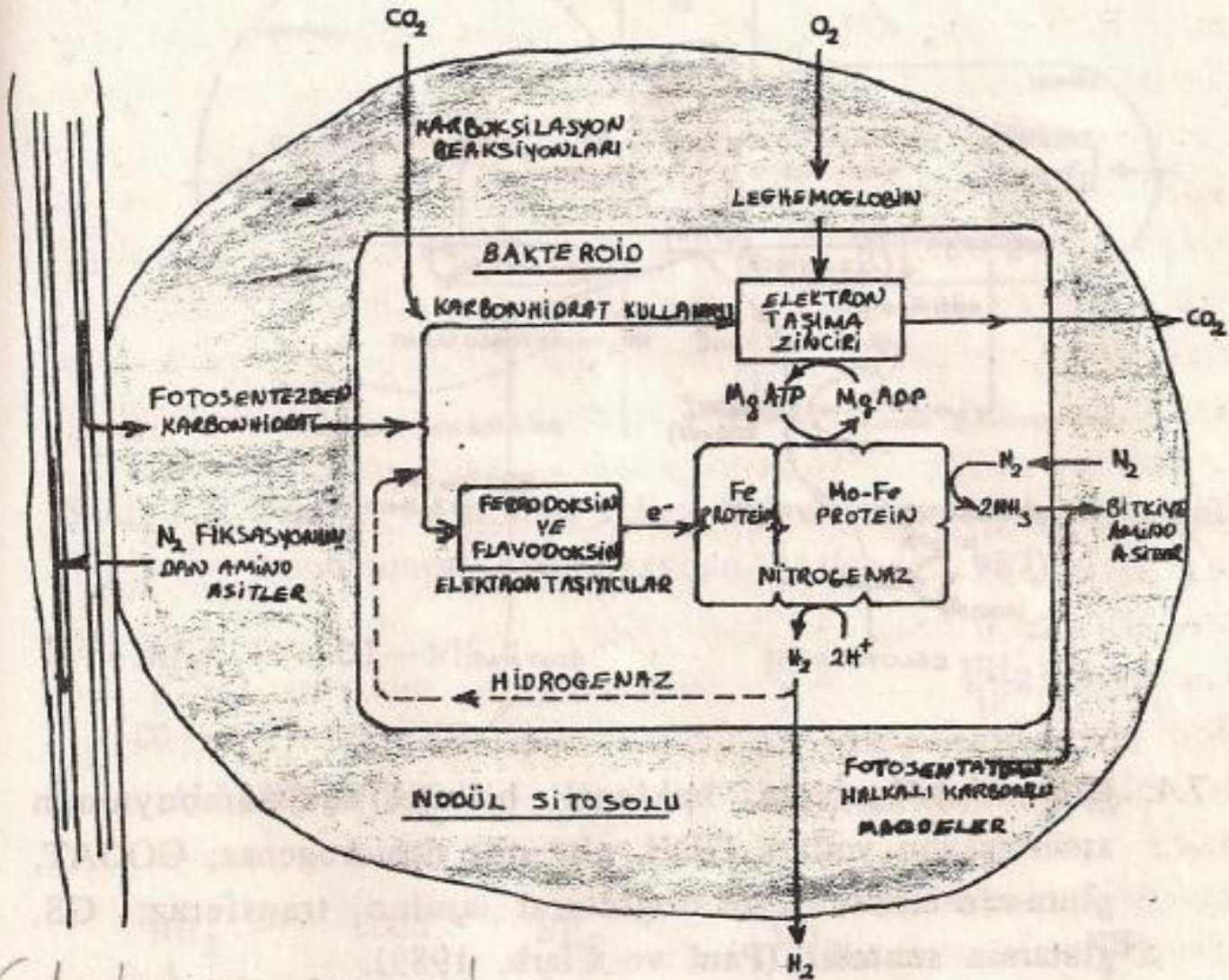
Demir proteini kübik bir yapı içerisinde 4 demir 4 aktif kükürt atomu içerir.

İkincisi daha büyük demir-kükürt proteini olup her molekülünde 28 ila 32 arasında değişen demir ve 28 aktif kükürt atomuyla birlikte 2 molibden atomu içermektedir. İkinci demir-kükürt proteininin molekül ağırlığı ise 200.000 ile 300.000 arasında değişmektedir.

Nitrogenazın aktivitesi için her iki proteininde bulunması gerekir (Burns ve Hardy, 1975; Paul ve Clark, 1989).

Bu iki protein N_2 'nin, NH_3 'a redüksiyonunu kataliz ederler.





Glutamin → amir
Glutamat → amino asit

Şekil 7.3. Bir nodül içerisindeki bütün reaksiyonlar (Evans ve ark., 1977).

Ayrıca nitrogenaz enzimi;

dinitrojen ($\text{N}=\text{N}$)'i -----> $\text{NH}_3 + \text{H}_2$ 'e

asetilen ($\text{HC}=\text{CH}$)'i -----> etilene ($\text{H}_2\text{C} = \text{CH}_2$),

nitroz oksid ($\text{N}=\text{N}-\text{O}$)'i -----> $\text{N}_2 + \text{NH}_3$ 'a,

siyanid ($\text{C}=\text{N}$)'i -----> $\text{CH}_4 + \text{NH}_3$ 'a,

azid ($\text{N}=\text{N}-\text{N}$)'i -----> $\text{N}_2 + \text{NH}_3 + \text{N}_2\text{H}_4$ 'e,

Siyanojen ($\text{N}=\text{C} - \text{C}=\text{N}$)'i -----> CH_4 'a ve

Allen ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{CH}_2$)'i -----> $\text{H}_3\text{C}-\text{CH} = \text{CH}_2$

bileşiğine indirger

(Akçin, 1980; Paul ve Clark, 1989; Keha ve Küfrevioğlu, 1993).

Bakteroid içerisinde elektronların taşınması, normal metabolik yollardan elektron taşıyıcıları flavodoksin ve ferrodoksine ve oradan da demir proteinine doğru gerçekleşmektedir (Şekil 7.3).

Demir proteini ve ATP kompleksi, inorganik fosfatın (P_i) serbest kalması ve ADP oluşumu ile demir-kükürt proteinini indirger. Bu protein, elektronları N_2 'a veya yukarıda adı geçen maddelere (asetilen, nitroz oksid, siyanid v.s.) geçirir. N_2 fiksasyonu sırasında aktif hale gelmiş olan molibden-demir proteini bir kısım H^+ iyonunu da H_2 'e indirger. H^+ iyonu ve N_2 değişik miktarlarda indirgenirler.

Düşük elektron akımında H^+ iyonu dominant olup en fazla H_2 üretilir. Yüksek ATP içeriği ve yüksek elektron akımında ise N_2 dominant olup en fazla NH_3 oluşturulur. Optimum laboratuvar koşullarında saflaştırılmış nitrogenaz kompleksinden indirgenebilen madde herbir elektron geçişi için 2 ATP gerektiği tespit edilmiştir.

N_2 redüksiyon sürecini gösteren reaksiyonlar aşağıda görülmektedir:

Hidrojen döngüsü nitrogenaz aktivitesi ile sabit bir durum gösterir. Tüm organizmalardaki nitrogenaz sistemi aynı olup, mevcut H^+ iyonunun H_2 'e ve aynı zamanda azotun (N_2) NH_3 'a indirgenmesini katalize eder.

Bazı *Rhizobium japonicum* izolatları tarafından ve cowpea (börülce) grubu baklagillerde ya çok az veya hiç H_2 oluşumu gerçekleşmez. Çünkü bu tip *Rhizobium* izolatları tarafından oluşturulan bakteroidler hydrogenaz kompleksini sentezlerne kabiliyetindedir.

Ayrıca H_2 'in suya oksidasyonunu katalize eder. Bazı *Rhizobium* izolatları nitrogenaz katalizi ile ortaya çıkan H_2 'le harcanan enerjinin bir bölümünü geri kazanma kabiliyeti gösterir. Bunlara, **hydrogenaz pozitif (Hup+)** veya **hidrojen alımı pozitif izolatlar** denmektedir. Bu izolatlarla aşılanan (inoküle edilen) baklagiller, **hydrogenaz negatif (Hup-)** izolatla aşılanelardan daha fazla azot fikse ederler.

Eğer nodüllerde H_2 salınımı (Serbestlenrnesi) meydana gelmiyorsa bakteroidlerde oksijene bağımlı hidrojen alımı sisteminin bulunduğu ve izolatların diğlerlerine göre üstün olduğunu gösterir (Evans ve ark., 1977; Schubert ve Evans, 1977; Çakmakçı, 1987; Paul ve Clark, 1989).

Şekil 7.3. nodül içerisindeki bütün reaksiyonları göstermektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi azotun amonyağa indirgenmesi sırasında hidrogenaz enzimi, oluşan H_2 'ni okside ederek ilave enerji sağlamaktadır. Bu özellik *Rhizobium* izolatlarının azot fiksasyonu güçlerinin yaklaşık % 30 oranında artırılmasını sağlamaktadır (Çakmakçı, 1987).

Bitki yaprakları tarafından fotosentez sırasında sentezlenen şekerler köklere taşınırlar, veya doğrudan yada organik asitlere dönüştükten sonra azot fiksasyonu için elektron vericisi (donor) olarak kullanılırlar

(Brock, 1974).

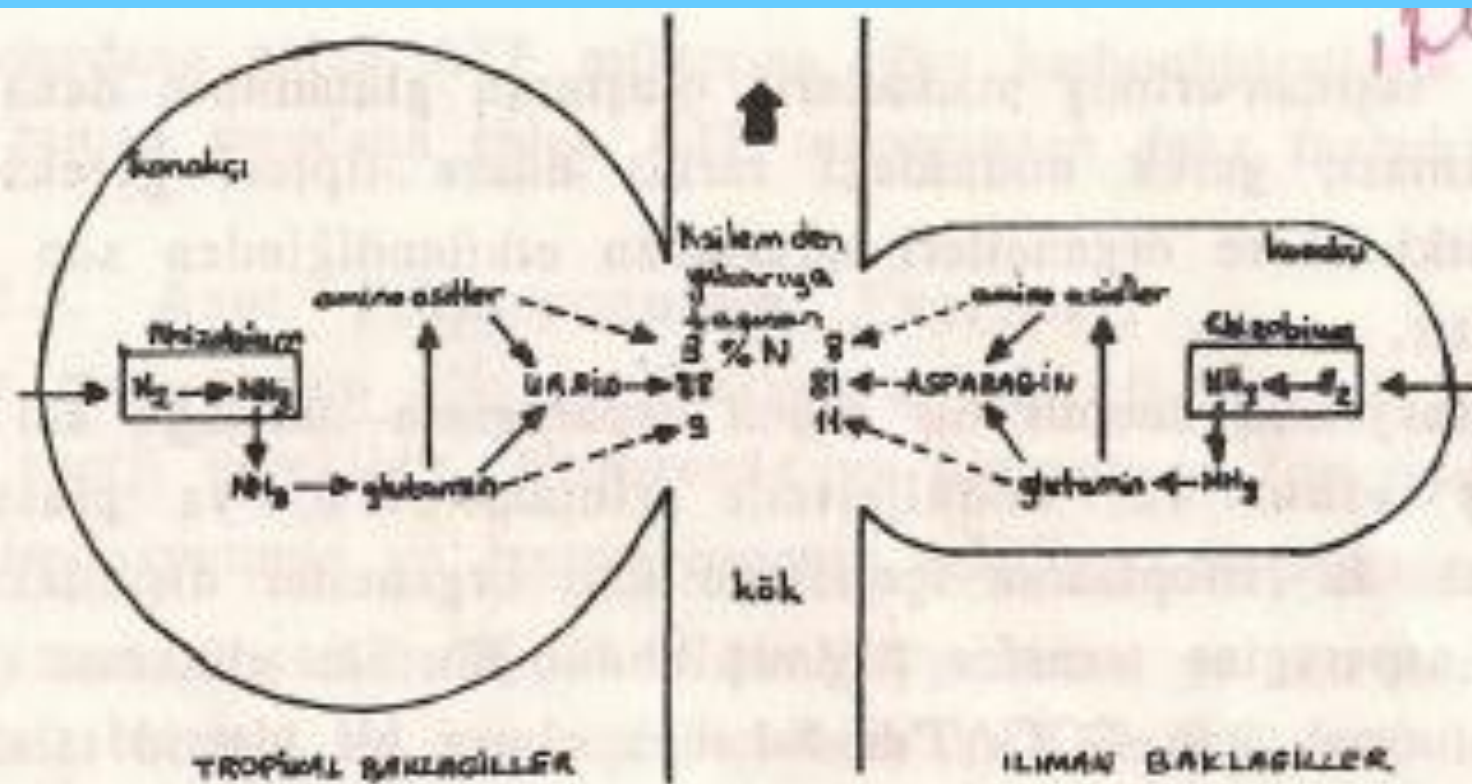
Fiksasyonun ilk ürünü NH_4^+ 'dur. NH_4^+ 'dan oluşmuş glutaminin yüksek seviyeleri, NH_4^+ 'u asimile eden glutamin sentatazın adenilasyonuna sebep olur (Şekil 7.4). Bu bakteroid içerisinde yeni nitrogenazın üretimi için kodlamayı etkiler.

Nodüllerdeki bakteroidler tarafından üretilen NH_4^+ , konakçı hücreye organik formlar olarak verilir. Ilıman iklim bitkilerinin nodüllerinde bulunan **glutamat dehidrogenaz (GDH)** ve **GOGAT (glutamat sentaz)** ile NH_4^+ 'un konakçı bitkiye ilavesi iki şekilde olur.

Şekil 7.4'de görüldüğü gibi solüsyon içerisinde NH_4^+ konsantrasyonu **1.5 mm'den daha fazla olduğunda, glutamat dehidrogenaz yolu izlenir.** Böyle yüksek NH_4^+ konsantrasyonları, nitrogenaz sentezini yavaşlatır. Ancak solüsyondaki NH_4^+ konsantrasyonu 1.5 mm'dan az olursa **glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentaz yolu izlenir.** GS, nitrogenaz düzenlemesinde (regulasyonunda) ve enzim oluşumu için gereken bakteroid proteininin üretiminde de roloynar.

Şekil 7.5'de görüldüğü gibi glutamin, nodüllerden kökteki ksilem içerisine salgılanır. Ancak bu fazla değildir. Yüksek fiksasyon koşullarında bu amid, glutamin metabolizmasının yan ürünleri olan asparagin (ılıman iklim bölgesi baklagillerinde) veya üre (tropikal baklagillerde) allantoin ve allantoinik asit olarak nodüllerden önemli miktarda ksileme taşınan azotun yaklaşık % 10 gibi önemli bir kısmını karşılar (Atkins, 1987).

Asparagin ve glutamin amidleri, üreden daha eriyebilir özellikte olduğu için daha düşük sıcaklık koşullarındaki ılıman iklim bölgesinin baklagil bitkilerine daha iyi adapte olmuşlardır. Söz konusu azotlu bileşiklerin C:N oranları düşük olduğundan taşınmada daha düşük karbon miktarları gerekir (Şekil 7.6).



Şekil 7.5. Tropik ve ılıman iklim bölgelerinin baklagil nodüllerinde amonyumun assimilasyonu (Atkins, 1987).

Bu "taşınan-erimiş maddeleri" oluşturan glutaminin daha ileri metabolizması, gerek nodüldeki farklı hücre tipleri gerekse çok sayıda bitki hücre organelleri tarafından etkilendiğinden son derece karmaşıktır.

Fiksasyonun önemli bir ürünü asparaginin olduğu acı bakla (*Lupinus albus* L.) nodüllerinde glutamin-N'u, ya plastidlerde yada sitosolda (sitoplazma içerisinde katı organeller dışındaki sıvı kısımda) asparagine transfer edilmiş amino-N'u ile glutamat (amino asit) oluşturmak için GOGAT'da lokalize olmuş bir plastid tarafından kullanılır. Daha sonra asparagin sentetaz, asparagin oluşturmak için sitosolik bir reaksiyon ile aspartat ve glutaminin amid-N'unu kullanır (Atkins, 1987).

Nodüller tarafından sağlanan amino asitler, konakçı bitkinin yaşam döngüsü ile ilgilidir. Genç baklagil bitkisi köklerinin infeksiyondan sonraki bir kaç gün içinde N_2 fiks eden bakteri, tamamen bitkiye bağımlı olup sentezlenen amino asitler nodüllerin büyümesi için kullanılır. Daha sonra üretilen amino asitlerin çoğu konakçı bitkiye taşınır. Çiçeklenme devresinin son bu lmasıyla amino asit aktarılması olayı sona erer (Aydemir ve İnce 1988).

Toprakta bulunan nitrat, hem nodulasyon hemde N_2 fiksasyonu üzerinde bir inhibitör etkiye sahiptir. İnhibisyonun mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Nitrat assimilasyonu fazla miktarda organik substratları gerektirir ve nitrat redüksiyonunun ilk ürünü olan NO_2^- leghemoglobin ile kompleks oluşturabilir ve leghemoglobinin oksijen basıncını ayarlama özelliğini yok edebilir (Paul ve Clark, 1989).

Baklagil nodülleri içerisinde oksijenin difüzyon oranları, N_2 fiksasyonunu artırabilir. Kısa sürelerle aşırı sulama veya su baskınları nodül fonksiyonuna zararlıdır. Normal % 20'den daha fazla atmosferik O_2 konsantrasyonlarının N_2 fiksasyonunu artırdığı % 50'den daha fazla olduğunda ise inhibe ettiği bulunmuştur. Hem yarıyışlı karbon hemde O_2 'in sağlanması simbiyotik fiksasyon üzerinde önemli etkilere sahiptir. Karbon veya oksijen miktarlarına getirilen herhangi bir sınırlama sadece fiksasyonu değil aynı zamanda meydana gelen hidrojeni de etkilediği bulunmuştur.

Mevcut O_2 'den meydana gelmiş ATP miktarı, H_2 'in okside edildiği zaman meydana gelen ATP miktarına göre karbondhidratların okside edildiği zaman meydana gelen ATP miktarından daha fazladır.

7.2.3. Azot Fiksasyonunun Enerjileri

Bir mol azot-u-n (N_2) redüksiyonu için, 0.22 mol glikozda bulunan enerji gereklidir. Nitrogenaz ve hidrogenaz fonksiyonlarına NH_4^+ assimilasyonuna ve bunun organik şekillere dönüşümüne fiks olmuş azotun taşınmasına, nodülün gelişmesine ve korunmasına fiks edilmiş bir mol N_2 için toplam olarak 1.13 ile 2.37 mol arasında değişen glukoz gereklidir.

Bunun gram olarak ifade edilmesi ise baklagil simbiyosisi ile bir gram azotun fiks edilmesi için, toplam olarak 2.9 ile 6.1 arasında değişen fotosentetik karbonun kullanılması gereklidir (Paul ve Clark, 1989).

7.2.4. Baklagil Bitkilerinin Aşılama

Aşılama (inokülasyon); genç bitkide nodül oluşumu sağlamak veya artırmak amacıyla tohumu veya toprağı konakçı baklagil bitkisine özel (Tablo 7.2) etkili azot fikse etme yeteneğı yüksek olan yeterli sayıda rhizobia (İnokülant) ile bulaştırmaktır.

Aşı materyali olarak kullanılan

Rhizobium kültürleri iki grup altında toplanır.

Birincisi, birden fazla baklagil bitki grubuna (çapraz aşılama grubu) dahil olan bitkilerin (yonca, üçgül v.b.) nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* izolatlarını bir arada içeren kültürlerdir.

İkinci gruba girenler ise bir baklagil bitki grubuna (yonca) dahil olan bitkilerin nodüllerinden izole edilen izolatları içeren kültürlerdir (Ülgen, 1975).

Cins	Önceki isimlendirme	Son isimlendirme	Konukçu Bitki
Azorhizobium	Rhizobium japonicum	Azorhizobium caulinodans	Sesbania (Sesbanya)
Bradyrhizobium (Yavaş gelişenler)	R. japonicum	Bradyrhizobium japonicum	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Boriliçe)
		B. kiplini	Lupinus (Aci bakia) Lotus (Gazal boynuzu) Ornithopus
		B. parsoniae	Parsoniae, Vigna (Boriliçe)
		Bradyrhizobium sp	Cicer (Nohut), Acacia, Ornithopus Sesbania (Sesbanya)
Rhizobium (Hızlı gelişenler)	R. japonicum	R. fredii (Sinorhizobium fredii)	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Boriliçe)
	?	R. galegae	Galega
	R. phaseoli	R. leguminosarum biovar	Phaseolus (Fasulye)
	R. trifolii	R. leguminosarum biovar	Trifolium (Tirfil)
	R. lotii	R. leguminosarum biovar viciae	Pisum (Bezelye), Lens (Mercimek) Lathyrus (Tatli bezelye) Vicia (Bakia)
		R. lotii	Lotus Gazal boynuzu) Lupinus (Aci bakia) Cicer (Mercimek)
		R. meliloti	Melilotus (Yonca) Medicago (Tas yoncası) Trigonella
	R. leguminosarum biovar phaseoli	R. tropici	Phaseolus (Fasulye) Leucaena
		Rhizobium sp. İzolati NGN234	Leucaena, Macroptilium Vigna (Börülce)
Sinorhizobium	R. fredii	S. fredii	Glycine (Soya fasulyesi) Vigna (Börülce)

Rhizobium izolatlarının azot tespit etme yeteneklerinin farklı oluşu pratik bakımdan büyük önem taşımaktadır. Bugün dünyada çeşitli ülkelerde azot tespit etme yeteneği yüksek olan *Rhizobium* izolatları denemelerle seçilip üretilerek baklagil bitkilerinin aşılmasında kullanılmaktadır.

Tarla denemeleri sonucunda, yoncada olduğu gibi küçük bir tohum başına en az 10^4 adet,

soyada olduğu gibi büyük bir tohum başına ise en az 10^7 adet rhizobia içeren aşı materyali, maksimum etkili bulunmuştur.

Ortalama olarak bir kg tohuma 4 gr aşı materyali, bir çok tohum tipleri için uygundur (Paul ve Clark, 1989).

Tohumla aşılama da tohumlar ekimden önce uygun inokülanla kaplanmalıdır.

Eğer mevcutsa tohumların fungusitelere karşı Thiriam (Tetramethylthiuram disulfide, Bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide) ile muamele edilmesi uygun olur (Çakmakçı, 1987).

Tohumların inokülanlarla kaplanmasına yardımcı olmak üzere bir miktar akasya zamkı (gum arabic) veya şeker ile biraz su içerisinde tohumların güneşte tutulmadan karıştırılması gerekir.

Tohumların inokülantla peletlenmesi ise avantajlı bulunmuştur.

Peletleme; tohumları peat tabanlı inokulant yapıştırıcısı ile ıslatmayı daha sonra iyice toz haline getirilmiş kireçtaşı gibi bir bileşikle kaplamayı içermektedir.

Tropik koşullarda ekseriye toz haline getirilmiş kayafosfat, kireçtaşı yerine kullanılır. Çünkü kireçtaşı aside toleranslı bakterilere zararlıdır.

Suda çözünen yapıştırıcılardan polivinil asetat, poliüreten poliüre vernikleri veya çözünebilen reçineler; kireçtaşını, kaya fosfatı veya peat-tabanlı inokulantı tohumlara yapıştırmak için kullanılabilir.

Tohumlar inokülantla kaplandıktan sonra derhal ekilmeli ve üzeri toprakla örtülerek kuruma önlenmelidir (Çakmakçı, 1987; Paul ve Clark, 1989).

Tohumlar sıcak ve kuru toprak yüzeyine ekildiğinde veya tohumlar zehirli pestisidlerle kaplandığında, rhizobia tohumların aşağısındaki nemli toprağa verilebilir. Ancak etkisiz doğal rhizobianın doğrudan tohuma uygulanan etkili rhizobia miktarından daha fazla toprağa verilmelidir. Bu ise daha fazla emek ve sermaye isteyen pahalı bir yoldur.

Aşılama materyalinin sulama suyu ile çimlenmiş 2-3 cm boya erişen soya ve mercimek bitkilerine verilmesi durumunda ise ürün verimi ve protein miktarlarının arttığı, üstelik bu gerek tarla gerekse sera çalışmalarında *Rhizobium* kültürlerinin aşılama materyali olarak kullanılması durumunda baklagil bitkilerinde aşılamamanın 4-12 kg azotlu gübrelemeye eşdeğer olduğu tespit edilmiştir. (Kızıloğlu, 1991; Kızıloğlu, 1992; Kantar ve ark., 1994).

Tablo 7A'de çeşitli baklagil bitkileri tarafından tespit edilen azot miktarları verilmiştir (Ersin, 1978).

Tablo 7.4. Çeşitli Baklagil Bitkileri Tarafından Tespit Edilen azot Miktarları (Ersin, 1978).

Baklagiller	N kg/da	% 21'lik Amonyum sülfat Eşdeğeri	Baklagiller	N kg/da	% 21'lik Amonyum Sülfat Eşdeğeri
Yonca	24	120	Börülce	11	55
Ladino üçgülü	22	110	Japon üçgülü	11	55
Acı Bakla	19	95	Fiğ	10	50
Taş Yoncası	15	75	Bezelye	9	45
Melez Üçgül	15	75	Soya Fasülyesi	8	40
Çayır üçgülü	14	70	Nohut	8	40
Mercimek	13	65	Yer Fıstığı	5	25
Kırmızı Üçgül	12	60	Fasülye	5	25

Baklagil bitkilerinden soyanın gerek tohumları gerekse sulama suyu aracılığı ile kök sistemleri özel *Rhizobium* izolatları ile aşılama suretiyle bu bitkilere atmosferin serbest azotundan yararlanabilme olanağı sağlamaktadır. Bu durum aynı zamanda bitkilerde ürün ve protein artışını olumlu yönde etkilemektedir (Dunigan ve ark., 1984a,b; Blackwell ve ark., 1985; Emiroğlu ve ark., 1986; Mukhtar Naib; 1987; Kızıloğlu 1991). Önceden soya yetiştirilmiş tarla topraklarında ise etkili *R. japonicum* izolatları ile aşılama yapılması bu topraklarda nadiren ürün artışlarına sebep olmuştur (Abd ve Erdman, 1964; Kapusta ve Rouwenhorst, 1973; Ham ve ark., 1976; Boonkerd ve, ark., 1978; Semu ve Hume, 1979; Ellis ve ark., 1984).

Diğer baklagil bitkileriyle de *Rhizobium* izolatlarıyla aşılama çalışmaları yapılmıştır.

Bunlardan Göktan ve Madanoğlu (1975) yonca, Akçin (1976) tarla fasulyesi; Ülgen (1978), Ersin (1978) ve Kızıloğlu (1995) fiğ; Senanayake ve ark., (1987) börülce; Kızıloğlu (1992) ve Kantar ve ark., (1994) mercimek bitkileriyle deneme yapmışlardır.

Sonuç olarak araştırmacılar, aşılama ile azot fiksasyonunun buna bağlı olarak ürün miktarının artış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

7.2.5. Simbiyotik Azot Fiksasyonunu Etkileyen Faktörler

7.2.5.1. Azot İçeriği

Azot, diğer besin maddelerinden farklı olarak bitki kökleriyle inorganik bileşikler olarak alınırken etkili nódüllerle de serbest azot formunda (N_2) alınır.

Toprakta yüksek miktarda kullanılabilir azotun bulunması nodül oluşumunu engellemektedir.

Örneğin topraktaki azot miktarının 400 ppm kadar yüksek miktarda olması nodül oluşumunu engellemektedir.

Çünkü fazla azot miktarı baklagil bitkisinin karbon-azot oranının daraltılması olan azot yüdesinin artmasıyla nodül oluşumunda önemli olan kök kıvrılmalarını önleyerek. *Rhizobium* bakterilerinin nodül yapmak için köke girişine engel olurlar (Ülgen, 1975). Ancak bu sorun yüksek azot düzeylerine toleranslı *Rhizobium* izolatlarının seçimi ile ortadan kaldırılabilir.

Bir başka önlemse toprağa ıslak saman karıştırılması gibi basit bir tarımsal uygulamadır. Bu yolla topraktaki yarayışı azot hızla diğer mikroorganizmalar tarafından tüketilir ve *Rhizobium* -baklagil simbiyozunun gerçekleşmesine yardımcı olur.

Kum kültüründe soya ve ladino üçgülü ile yapılan bir araştırmada da NH_4^+ olarak ilave edilen azot miktarı arttıkça atmosferden fiks edilen azot miktarı azalmaktadır.

Tablo 7.5. Kum Kültüründe Azot Fiksasyonuna Amonyumun Etkisi
(Alexander, 1961).

İlave Edilen NH_4 mg N/saksı	Atmosferden Fikse Edilen Azotun Oranı, %	
	Soya	Ladino Üçgülü
0	100	100
80	95	75
320	89	35
560	82	15
800	79	12

7.2.5.2. Makro Besin Maddelerinin Etkisi

Fosfor, protein sentezinde rol, oynayan önemli bir besin maddesidir.

Baklagillerin diğer bitkilere göre protein içeriği bakımından zengin olması, bu bitkilerin fosfora gereksinimlerini artırmaktadır.

Ayrıca toprakta potasyumun ve kükürdün bulunmaması durumunda, fazla miktarda yarayışlı azot olsada baklagil bitkileri protein, sentezi yapamazlar.

Potasyum nodul sayısında,

kükürt ve fosfor nodül sayı ve büyüklüğünde etkili olmaktadır.

Kalsiyum, toprak reaksiyonuna etki ederek baklagil bitkilerinin gelişmesine *Rhizobium* bakterilerinin çoğalma ve hayatını devam ettirmesine yardım eder. Kalsiyum tuzlarının, özellikle asit topraklarda nodul oluşumuna, büyüklüğüne, sayısına ve konakçı bitkinin protein içeriğine olumlu etkileri olmaktadır.

Ayrıca kalsiyum iyonları, fosfor, bor, mangan ve molibdenin konakçı bitki tarafından alınmasına yardım eder.

Magnezyumun en önemli işlevi, klorofil molekülünün merkezinde yapı elementi olarak bulunmasıdır. Bunun yanında, Mg^{+2} bir çok, fizyolojik olaylarda da önemli görevler üstlenmiştir.

Bunların içinde en önemlisi tüm enzimleri aktive eden fosforlaşma süreçlerinde kofaktör görevidir. Magnezyum (Mg^{+2}), ATP ve ADP'nin pyrofosfat yapısı ile enzim molekülü arasında, bir köprü oluşturur.

Fosforilasyon olayını aktive eden tek iyon Mg^{+2} değildir.

Bazen bu işlevi Mn^{+2} ve daha az olmak kaydıyla diğer bazı katyonlarda üstlenebilir. Böylece Mg^{+2} baklagillerde nodül oluşumunu ve azot fiksasyonunu artırmaktadır

(Çakmakçı, 1987; Aydemir ve İnce, 1988).

7.2.5.3. Mikro Besin Maddelerinin Etkisi

Demir, bakteroidlerde N_2 fiksasyonunda rol oynayan proteinlerin yapısında yer alır. Moleküler N_2 'un gerçek indirgenme yeri nitrogenaz enziminin Fe-Mo protein kompleksi olup bu komplekse elektronlar Fe-protein kompleksinden sağlanır.

Nitrogenazın Fe-protein kompleksi ise bu elektronları demir proteini olan ferrodoksinden alır.

Demirin gerek nitrogenaz gerekse hidrogenaz sistemlerinde görev yapması N_2 fiksasyonu için son derece önemlidir.

Kobalt, B₁₂ vitamininin metal bileşenidir. Bu besin maddesi, büyük bir olasılıkla leghemoglobin sentezini denetleyen propionat oluşum yolunda gereklidir.

(bakteroidlerde ve kültüre alınmış *Rhizobium* hücrelerinde gerçekleşen dönüşüme göre, üretilen sussinil CoA, glisin ile reaksiyona girerek aminolavulinik (ALA) asid ve buda ---> propionat ----> propionil CoA ----> Metin malonil CoA ----> Sussinil CoA yollarını izleyerek leghernoglobine dönüşür)

Bakırın leghemoglobin veya moleküler oksijene elektron taşınmasıyla ilgili enzimlerin sentezinde görev yapması, yakın bir olasılıktır. Cu noksanlığı gösteren bitkilerde klorofil miktarının azalması ve karbonhidrat dolayısıyla azot metabolizmalarının bozulmasına neden olmaktadır.

Molibden, nitrogenaz ve nitrat redüktaz gibi iki önemli enzimin gerekli bileşenidir. Molibden noksanlığı, baklagillerde ve kızılağaçlarda azot beslenmesini sınırlar.

Fosforilasyon olayını etkinleştirmede rol oynayan Manganın noksanlığı bitkilerde klorofil oluşumunu azaltmakta, kloroplastların fonksiyonunu aksatmakta, karbon asimilasyonunu önemli derecede azaltmaktadır. Bu nedenle meydana gelen karbonhidrat noksanlığı azot ve metabolizmasını bozmaktadır (Ülgen, 1975; Aydemir ve İnce, 1988; Aydemir, 1993).

Çinkonun nodül oluşumuna etkisini gösteren araştırmalar azdır. Bazı araştırmacılar Zn noksanlığı gösteren baklagillerin kültür solusyonlarında bir çok kök nodülü oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Küçük olan bu nodüllerin normal olarak atmosfer azotunu fikse ettikleri saptanmıştır.

Bor, her ne kadar *Rhizobium* için gerekli değilse de normal kök ve nodül oluşumu için gereklidir. Bor noksanlığında, bezelye ve bazı baklagillerinin azot noksanlığından zarar gördüğü tespit edilmiştir (Ulgen, 1975).

7.2.5.4. Değişen Toprak Tipleri

Toprakların, pH, organik madde içeriği, iyonik bileşimlerine bağlı olarak bir *Rhizobium* izolatı, bir toprak tipinde etkili olurken diğer toprak tipinde etkisiz olabilir. Bu nedenle *Rhizobium* inokulantı veya izolatı nerede kullanılacaksa izolatın o çevreden izole edilmesi başarı şansını önemli ölçüde artırmaktadır (Çakmakçı, 1987).

Yeşil mercimek ve adi fiğ bitkileriyle Erzurum'da yapılan denemelerde bu ilin çeşitli yörelerinden izole edilen *R. leguminosarum* izolatlarının bitkilerin azot içeriğini ve ürün miktarını artırdıkları tespit edilmiştir

(Kızıloğlu, 1992; 1995; Kantar ve ark., 1994).

7.2.5.5. Nem, İçeriği

Rhizobium bakterileri kuraklığa ve aşırı su miktarına karşı hassastırlar. Azot fiksasyonu için en uygun nem düzeyi toprağın su tutma kapasitesinin % 84'ü kadar olduğuunda elde edilmiştir (Ülgen, 1975).

7.2.5.6. Hava Durumu

Havalanma durumu iyi bir strüktüre sahip olan tarla toprağına, aşılama materyali olarak kullanılan aerobik olan *Rhizobium* bakterileri kolayca adapte olmakta ve çoğalmaktadır.

İnce tekstürlü topraklarda baklagil bitkileri kaba tekstürlü topraklara göre daha zayıf bir gelişme gösterirler.

Ayrıca, havalanmanın kötü olduğu koşullarda söz konusu bitkilerin nödüllerinin leghemoglobin içerikleri daha azdır (Ulgen, 1975).

7.2.5.7. Sıcaklık

Sıcaklık, genel olarak bitki metabolizmasını etkilediği gibi, ndl oluşumu ve N₂ fiksasyonu üzerinede önemli etkide bulunmaktadır.

Genelde *Rhizobium* gelişmesi için optimum sıcaklık 28 °C'dir. Ancak bu değer *Rhizobium* izolatlarına ve çevresel koşullara bağlı olarak değişme gösterir.

Bu nedenle yüksek ve düşük sıcaklıklarda çalışma yapıldığı zaman bu sıcaklıklara tolerans gösteren izolatların seçilmesi ve konakçı bitkinin optimum gelişme sıcaklığının da dikkate alınması gerekir.

Rhizobium izolatlarının 40 °C'nin üzerinde etkinliklerini kaybettikleri bilinmektedir (akmakı, 1987).

7.2.5.8. Toprak Reaksiyonu (pH)

Rhizobium'ların gelişmesi için en uygun pH 6.8'dir. *Rhizobium* izolatlarının gelişmeleri için pH 4 ile 8.5 arasında değişme göstermektedir.

pH aralığının geniş olması söz konusu bakterilerin farklı yörelerde kullanımını olası duruma getirmektedir. Düşük pH alüminyum, mangan ve kalsiyum noksanlığına neden olur (Alexander, 1961; Çakmakçı, 1987).

Toprak tuzluluğuna genelde *Rhizobium* 'lar bitkilerden de fazla dirençli olup tuzlu topraklarda *Rhizobium* soya ortak yaşama etkisi ile ilgili yapılan araştırmalarda artan toprak tuzluluğunun nodül oluşumunu ve azot fiksasyonunu azalttığı bulunmuştur (Singleton ve Bohlool, 1983; Hamdi ve ark., 1984; Çakmakçı, 1987).

7.2.5.9. Bitkisel Faktörler

Simbiyotik yaşamın üzerine konakçı bitkinin çok önemli rolü olmaktadır. Konakçı bitki, *Rhizobium* 'un tanınmasını düzenleyip kontrol eden ve enfeksiyon başlangıcını olası kılan özelliğe sahiptir. Özel *Rhizobium* izolatlarının, konakçı bitkiler tarafından karışık populasyon arasından seçilmesi oldukça ilgi çekicidir (Çakmakçı, 1987).

Konakçı genleri nodül oluşumundan sorumludur. Nodül içerisindeki O_2 basıncını ayarlayan leghemoglobinin apoprotein yarısı bitki tarafından, hem yarısı ise bakteri tarafından kodlanır. Etkisiz nodüller leghemoglobin yokluğu ve bol nişasta ile karakterize edilirler (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

Ayrıca konak bitki nodüllere az karbonhidrat sağladığı zaman, azot fiksasyonunda inhibe edilmektedir (Akçier, 1981).

7.2.5.10. Bakteriyel Faktörler

Anormal durumlar ortaya çıkaran birçok rhizobiyal izolat, elde edilmiş olup bunlar antibiyotiğe dirençli veya oksotrofik mutantlardır. Bunlar;

- enfeksiyon ipliğinden salınımdaki başarısızlık,
- bakteroid haline dönüşememe,
- anormal morfolojiye sahip bakteroid oluşturma,
- hidrogenaz aktivitesinin bulunmayışı veya
- tümör benzeri yapıların oluşması

sonucu azot fiksasyonuna engel olurlar (Kızıloğlu ve Öztürk, 1992).

Ayrıca azot fiks etme gücü yüksek izolatlarla doğal populasyon arasındaki rekabetin, doğal izolatların yönünde bozulabilmesi de azot fiksasyonunda olumsuz etki yapmaktadır.

Bunların dışında bazı biotik faktörler örneğin fajlar, sitona vb. zararlıların azot fiksasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Çakmakçı, 1987).

3. Simbiyotik Olmayan (Non-Simbiyotik) Azot Fiksasyonu

Toprakta serbest olarak yaşayan bazı mikroorganizmaların atmosferin moleküler azotunu toprağa fiks ettikleri bilinmektedir.

Buna **Simbiyotik Olmayan Azot Fiksasyonu** denir.

Serbest yaşayan ve atmosferik N_2 'u toprağa fikse eden bakterileri 1890 yılında Winogradsky izole etmiş ve bunları *Clostridium* ve *Azotobacter* olarak tanımlamıştır.

Beijerinck ise 1941 yılında *A. chroococcum*'u bulmuştur (Paul ve Clark, 1989).

Non-simbiyotik azot fiksasyonunu gerçekleştiren organizmalar dört grupta toplanmıştır. Bunlar;

1. Heterotrofik bakteriler : *Azotobacter*, *Acbromobacter*, *Aerobacter*, *Azotomonas*, *Pseudomonas* ve *Bacillus polymyxa*.
2. Kemoototrofik bakteriler : *Methanobacillus omelianskii*,
3. Mavi-yeşil algler: *Anobaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, , *Nostoc* ve *Totypothrix*.
4. Fotosentetik bakteriler: *Chlorobium*, *Chromatium*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas* ve *Rhodospirillum* (Alexander, 1961).

- Yukarıda adı geçen bazı mikroorganizmalar ile kültür besiyerinde moleküler azot fiksasyonu miktarları Tablo 7.6'da görülmektedir.

Tablo 7.6. Kültür Besiyerinde Moleküler Azotun Fiksasyonu (Alexander, 1961).

Mikroorganizmalar	Yaşama Koşulları	İnkübasyon Süresi (gün)	Fiks Edilen Azot $\mu\text{gN/ml}$
<i>Achromobacter</i> sp.	Aerobik	4	17
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Aerobik	3	1050
<i>Cylindrospermum cylindria</i>	aerobik, ışıhta	55	52
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Anaerobik	2	60
<i>Clostridium butyricum</i>	Anaerobik	10	136
<i>Chlorobium</i> sp.	Anaerobik ışıhta	5	20
<i>Rhodospirillum</i> sp.	Anaerobik, ışıhta	10	76

Buna göre *Azotobacter vinelandii* ve *Clostridium butyricum* besi yerindeki 1 gr karbon kaynağını okside olan şekeri iyi değerlendirerek en fazla azot fikse eden bakterilerdir.

Azotobacter'ler 1 gr karbon kaynağını en iyi değerlendirebilen aerobik bakterilerdir.

Ilıman iklim bölgelerinde iki önemli türü vardır. Bunlardan *A. chroococcum*, 1 gr toprakta sayısı yüzbinlere ulaşarak toprakta en fazla bulunan türdür. Söz konusu bakteri, bir dekar toprağa yılda ortalama olarak 2-4 kg arasında azot fiks eder (Aydemir ve ince, 1988).

Azotobacter'ler aracılığı ile toprağa daha fazla azot kazandırılması için gerekli koşullar;

- 1- Toprağın hava durumunun iyi olması,
- 2- Toprağa C:N oranı geniş (33:1'den büyük) organik materyallerin ilavesi,
- 3- pH'nın 6'dan büyük olması ve
- 4- Toprakta yeterli ölçüde fosforun bulunmasıdır.

Bu toprak isteklerine göre. *Azotobacter* 'in her toprakta bulunması beklenemez (Çengel, 1993). Günümüzde bu olumlu özelliğinden dolayı *Azotobacter* kültürleriyle toprağı aşilayarak yüksek bitkilerde azot miktarını artırarak ürün miktarını artirmaya yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

- *Brown ve ark (1964)*, Buğday, arpa, maydanoz, havuç, ıspanak, turp, bitkileriyle *Azotobacter* spp. ile aşılamışlar ve ürün miktarının arttığını gözlemişlerdir.
- *İsmailçelebioğlu (1913)*, *Azotobacter chroococcum* kültürleri ile aşıladığı topraklar da yetiştirdiği buğday bitkisinin dane miktarında % 47.08 patates bitkisinin yumru miktarında % 63.49 oranlarında artış tespit etmiştir.
- *Paspalum notatum* adlı tropikal çayır bitkisi, kökleri üzerinde *Azotobacter* bulunduğu zaman dekara yılda 9 kg azot fikse edilebilmektedir. (Aydemir ve İnce, 1988).

- *Azotobacter* cinsinin hücre şekli, pigment oluşturma ve hareket kabiliyeti gibi özelliklerine göre beş türü vardır. Bunlar; 1- *A.chroococcum*,
- 2- *A. beijerinckii* ,
- 3- *A. vinelandii* ,
- 4- *A. macrocytogenes*
- 5- *A. agilis*'tir.
- *A. chroococcum* ise pH 6'dan aşağı olan koşullarda aktivite gösteremez (Alexander, 1961).
- Tropik bölgelerde bulunan *A. beijerinckii*, asit koşullarda daha iyi gelişir ve pH'sı 3'e kadar düşen topraklarda bile azot fiks edilebilir.
- Bunların içinde önemli miktarlarda azot fikse edenlerden *A. agilis* genellikle su birikintileri, göller ve durgun akan sularda bulunur.

- Azot fikse eden non-simbiyotik anaerobik bakterilerin içinde en önemlisi ise *Clostridium* cinsidir.

Bir gram toprakta sayıları yüzbine ulaşır.

Clostridium 'lar pH 5'de gelişirler ancak pH 9'da da gelişebilirler. Bu geniş pH aralığından dolayı *Aerobacter* 'lere oranla daha geniş bir yayılma alanına sahiptirler.

Bir dekar alana yılda ortalama 1-1.5 kg kadar azot fikse ederler.

Bu cinse ait önemli türler;

C. pasterionum, *C. butylicum*, *C. felsineum*, *C. kluyveri*, *C. beijerinckii*, *C. lactoacetophilum*, *C. madisonii*, *C. pectinovorum*, *C. tetranomorphum*, *C. acetobutylicum*'dur.

- Non-simbiyotik olarak moleküler azotu fikse eden diğer organizmalar mavi-yeşil algler (Cyanophyceae)'dir.
- Bunlara iyi drenajlı topraklarda rastlanmaz.
- Ancak bunlar, su ile göllendirilmiş çeltik topraklarında N₂ fiksasyonuna önemli katkıda bulunmakta ve böylece pirinç bitkisinin gelişmesini artırmaktadırlar.
- Artan ışık intensitesi ile bu alglerin azot fiksasyonunda artmaktadır.
- Ancak aşırı ışık, azot fiksasyonunu engeller.
- Yarı gölge koşulları en uygundur.
- *Aulosira*, *Anabaenopsis*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc* ve *Tolypothrix* mavi-yeşil alglere ilişkin cinslerdir.
- Bunların azot fiksasyonu *Azotobacter* ve *Clostridium* 'dan çok daha azdır (Alexander,1961; Aydemir ve İnce, 1988; Çengel, 1993),

- Fotosentetik bakteriler üç, familyaya ayrılırlar. Bunlar;
 - 1- Athiorhodaceae (non-kükürt bakterileri),
 - 2- Thiorhodaceae (Mor-kükürt bakterileri) ve
 - 3- Chlorobacteriacsae (yeşil-kükürt bakterileri).
-
- Bu bakterilerin azot fiksasyonları ışık ile artış gösterir, O₂ ile inhibe olur (Alexander, 1961).

7.3.1. Non- Simbiyotik Azot Flksasyonunun Biyokimyası

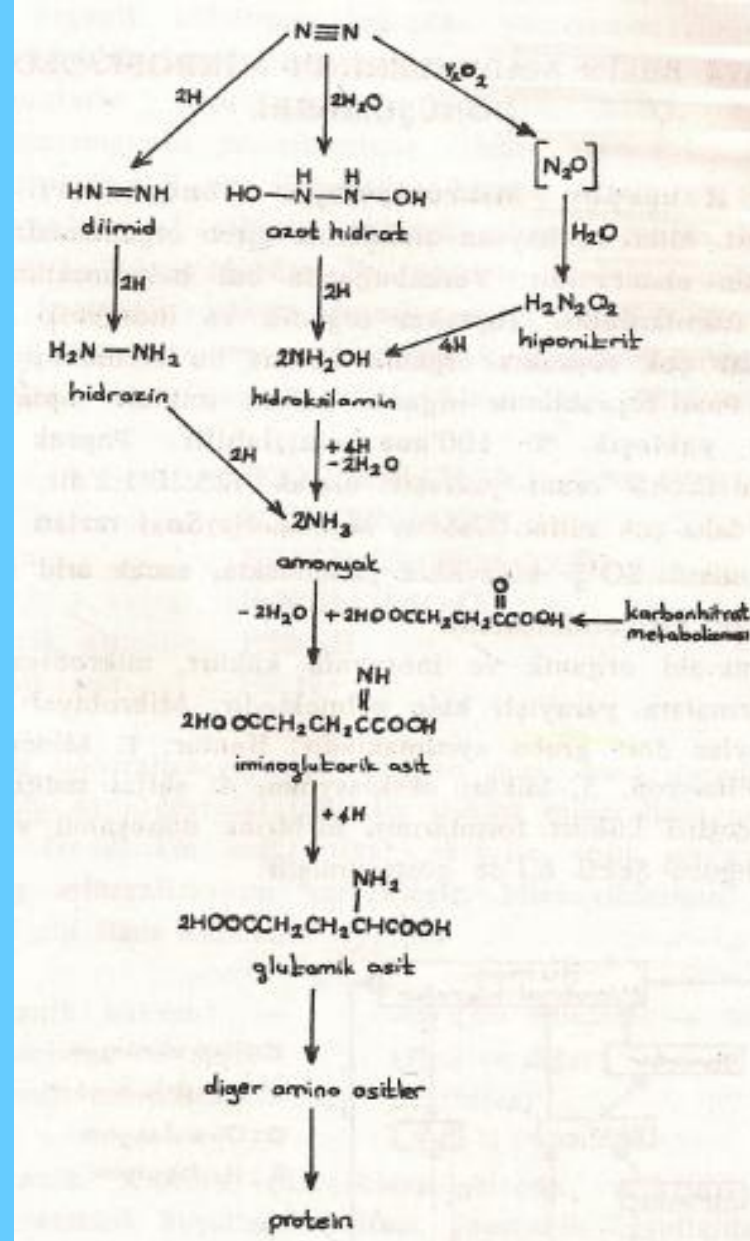
Non-simbiyotik azot bağlamada mikroorganizmaların moleküler azotu hangi kademelerden sonra fikse ettikleri biyokimyasal olarak günümüze kadar açıklığa kavuşamamıştır. Ancak bu konuda bazı teorik açıklamalar yapılmıştır.

Atmosferik moleküler azotun, fiksasyon olayı sırasında redüksiyonu için büyük bir enerji harcaması gerekmektedir.

Enerji, biyolojik enerjinin depo edildiği ATP'den, redüksiyon için gerekli olan hidrojen ise (Krebs döngüsündeki) solunum kademelerinden sağlanmaktadır.

Çünkü mikroorganizmalar moleküler hidrojeni oluşturma yeteneğindedirler.

- Mikroorganizmaların moleküler azotu fikse edilebilmeleri için hidrogenaz aktivitesi gösteren nitrogenaz kompleksinin bulunması gereklidir.
- Bu kompleks Fe, Mo ve SH grupları içeren protein yapısındadır.
- Genel olarak kompleks Fe-proteini ile Fe-Mo proteini olmak üzere iki kısımdır. Azot fiksasyonunda her zaman son ürünün amonyak olduğu bulunmuştur (Çengel, 1993).
- Fiksasyonun teorik açıklaması Şekil 7 .7'de gösterilmiştir .



Şekil 7.7. Biyolojik N_2 fiksasyonunun teorik mekanizması (Alexander, 1961).

3.2.Non-Simbiyotik Azot Fiksasyonunu Etkileyen Faktörler

Bu azot fiksasyonunda nitrogenaz aktivitesi için Fe, Mo ve S kesinlikle gereklidir. Mo'in yerine vanadium kısmen geçebilirse de Mg, K, S, Fe ve P'un yerine diğer elementer geçemezler.

Fotosentetik bakterilerin dışında bağımsız yaşayan N_2 fikse eden tüm bakteriler, heterotrofturlar. Enerji gereksinimleri için toprakta hazır kolayca parçalanan ve C'ca zengin organik madde miktarının varlığı, bu organizmalarca N_2 fiksasyonunu artırmaktadır (Çengel, 1993).

- Moleküler azotu asimile eden mikroorganizmalar; amonyumu, bazen nitratı ve diğer azotlu bileşikleri de kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Gerçekte bu mikroorganizmalar moleküler azottan daha fazla ve tercihli olarak amonyum tuzlarını kullandıkları için topraktan alınabilir azot miktarının artmasıyla N_2 fiksasyonu engellenir. Çünkü organizmalar hazır azot varken, büyük enerji sarf ederek azot fiksasyonuna gitmezler (Alexander, 1961).
- Topraktaki hidorjen iyonları konsantrasyonu non-simbiyotik azot fiksasyonuna etki etmektedir. *Azotobacter* spp. genellikle pH 6'dan aşağı asit tarla koşullarında çalışmaz. Ancak *Beijerinckia* spp. pH'sı 3-9 arasında değişen tropik ve subptropik topraklarda N_2 fiks edebilir (Alexander, 1961; İsmailçelebioğlu, 1980; Aydemir ve İnce, 1988).

