



Yabani Baklagil Bitkilerinden, Mikrobiyal Gübre Olarak Kullanılan *Rhizobium Spp.* Bakterilerinin İzolasyonu

Hatice Ögütücü ^{1*}, Ömer Faruk Algur ²

^{1*}Ahi Evran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 40100 Kırşehir, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25100 Erzurum, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 30 Ocak 2014
Kabul 25 Nisan 2014
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:
Medicago spp.
Nodülasyon
Mikrobiyal gübre
Rhizobium spp.

* Sorumlu Yazar:
E-mail: hogutcu@gmail.com

Ö Z E T

Araştırmamızda kullanılan yabani baklagil bitkileri (*Medicago sativa*, *M. lupulina* ve *M. varia*) Erzurum iline ait yüksek rakımlı (2000-2500m) bölgelerden (Palandöken dağı, Alibaba dağı, Turnagöl dağı, Hasanbaba dağı, Egerli dağı, Yıldırım dağı, Çubuklu dağı, Deveboynu mevkii, Kayakyolu mevkii, Telsizler tepesi ve Dumlu tepesi) Haziran ve Temmuz aylarında toplandı. Bu bitkilerden elde edilen nodüller steril edilerek YMA (Yeast Mannitol Agar) plaklarına çizgi ekim yapıldı ve petriler 28+1°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan tipik koloniler oluşturan (beyaz, saydam veya hafif mat, mukozlu, yuvarlak, kabarık) 39 izolat seçilerek yatık YMA tüplerine aktarıldı ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Sonraki aşamada bu izolatlara sitolojik ve biyokimyasal analizlerle tanımlanmaya çalışıldı. Bu amaçla izolatlara Brom Thymol Mavili ve Kongo Kırmızılı YMA'da üreme, gram özelliği, hareket, katalaz ve oksidaz testlerine tabi tutularak değerlendirildi. Yapılan sitolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen 39 izolatin 28'inin *Rhizobium spp.* olduğu tespit edildi.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 2(4): 181-184, 2014

Isolation of *Rhizobium Spp.* Bacteria which as Used Microbial Fertilizer from Wild Leguminosarum Plants

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 January 2014
Accepted 25 April 2014
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:
Medicago spp.
Nodulation
Microbial fertilizer
Rhizobium spp.

ABSTRACT

In our study used wild leguminous plants (*Medicago sativa*, *M. lupulina* and *M. varia*) Erzurum belongs to the high altitude (2000 - 2500m) regions (Palandöken mountain, Alibaba mountain, Turnagöl mountain, Hasanbaba mountain, Egerli mountain, Yıldırım mountain, Çubuklu mountain, Deveboynu locality, Kayakyolu locality, Telsizler and Dumlu hill) were collected during the months of June and July. Nodules were obtained from this plant were sterilized, YMA (Yeast Mannitol Agar) plates were streaked and petri dishes 28+1°C were incubated for 3-5 days. Colonies appear after incubation typically constitute (white, clear or slightly opaque, mucosity, round, raised) 39 isolates were selected and transferred to tubes and refrigerated YMA were stored at +4°C. In the next stage, cytological and biochemical analyzes of these isolates were studied to determine. For this purpose isolates; YMA containing bromothymol blue and congo red reproduction, gram stain reaction, movement and subjected to catalase and oxidase tests were evaluated. The cytological and biochemical analysis of results showed that 28 of 39 strains belonged to *Rhizobium spp.*

* Corresponding Author:
E-mail: hogutcu@gmail.com

Giriş

Gelecekte dünyamızın karşılaştacağı en önemli problem, 2025 yılında 8 milyara ulaşacağı tahmin edilen dünya nüfusedir. Dünya nüfusunun 830 milyonunun açlık sınırında olduğu ve küresel ısınmaya bağlı olarak değişen iklim sisteminin gıda üretimi üzerindeki olumsuz etkileri de göz önüne alındığında önümüzdeki 20 yıl içerisinde en önemli konunun tarımsal üretim olacağı tahmin edilmektedir.

Günümüzde tarımsal üretimin artırılması için azotlu mineral gübreleme maliyetlerinin yüksek olmasının yanı sıra; bu gübrelerin ortamda farklı özel ihtiyaçlarının olması ve çevre kirliliğine yol açması nedeniyle topraktaki azot açığının giderilebilmesi için, biyolojik azot fiksasyonu gibi, doğal ve daha ekonomik kaynaklardan yararlanma çalışmalarına ilginin gün geçtikçe arttığı gözlenmektedir. Gerek simbiyotik fiksasyon yapan Angiosperm türlerinin gerekse baklagil bitki türlerinin birer azot üretim fabrikası gibi çalıştıkları bildirilmektedir (Boşgelmez ve ark., 2001; Özer ve ark., 2010; Andeden ve ark., 2013). İlaveten, önemli bir potansiyele sahip olan azot fiksasyonu aracılığıyla toprağa bağlanan azot miktarının 175 milyon ton/yıl olduğu tespit edilmiştir (Sarıoğlu, 1993).

Yurdumuzda, Hititler zamanından bu yana tarımı yapılmakta olan yonca (*Medicago sp.*) yem bitkilerinin en önemlisidir. Yonca tarımının %90-95'i ise *Medicago sativa* ile gerçekleştirilmektedir. Çok uzun ömürlü olan yoncanın ekonomik ömrü 7-10 yıldır. Otunun beslenme değeri yüksek olan bu bitki vitamin ve mineral maddeler yönünden zengindir. Yonca'da nodül oluşturan *Rhizobium* türleri *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium meliloti* veya *Sinorhizobium medicae* (Lajudie et al., 1994; Zribi et al., 2004; Villegas et al., 2006) olarak adlandırılmaktadır.

Çevresel faktörler azot fikse eden bitkilerin aktivitelerini ve büyümelerini sınırlayabilir. *Rhizobium*-baklagil simbiyotik ilişkisinde azot fiksasyonu bitkinin fizyolojik durumu ile ilgilidir. Baklagil bitkilerde nodülasyon ve azot fiksasyonunu sınırlayan faktörlerin; tuzluluk, uygun olmayan toprak asitliği, besin farklılığı, yetersiz fotosentez, bitkisel hastalıklar, mineral toksikliği, ekstrem sıcaklıklar, verimsiz ve aşırı toprak basıncının olduğu bildirilmektedir. Çevresel şartlar; üstün azot bağlama gücü olan bazı *Rhizobium* suşlarının kolonize olmasını sağladığından ve azot bağlama potansiyellerini olumsuz etkilediğinden çeşitli ekstrem ekolojik şartlara adaptasyon sağlamış suşların seçilmesi ve aşılama

kullanılması büyük önem arz etmektedir (Öğütücü, 2008; Öğütücü, 2010). Erzurum gibi serin iklim koşullarının hakim olduğu bölgelerde, düşük sıcaklık şartlarına adaptasyon sağlamış suşların tespitini amaçlayan bu araştırmada, yüksek rakımlı bölgelerden toplanan yonca bitkilerinden *Rhizobium sp.* bakterileri izole edilmiş sitolojik ve biyokimyasal analizleri yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Rhizobium bakterisi içeren yabani yonca bitkileri (*Medicago sativa*, *M. lupulina* and *M. varia*) Erzurum iline ait Palandöken dağı, Alibaba dağı, Turnagöl dağı, Hasanbaba dağı, Egerli dağı, Yıldırım dağı, Çubuklu dağı, Telsizler tepesi ve Dumlu tepesi'nden Haziran ve Temmuz aylarında toplandı (Çizelge 1). Bu bitkilerden elde edilen steril nodüllerden YMA plaklarına çizgi ekimi yapılarak, petriler 28+1°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Oluşan tipik koloniler (beyaz, saydam veya hafif mat, mukozlu, yuvarlak, kabarık) seçilerek yatık YMA tüplerine aktarıldı ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi (Atıcı, 2005; Öğütücü2010). Daha sonra elde edilen 39 izolat sitolojik ve biyokimyasal analizlerle tanımlanmaya çalışıldı. Bu amaçla bakteriler Bromthymol Mavili besiyerinde ve Kongo Kırmızılı YMA'da üretildi, gram özellikleri belirlendikten sonra hareket, katalaz ve oksidaz testlerine tabi tutularak değerlendirildi ((Somasegaran and Hoben 1985; Öğütücü, 2009).

Bulgular

Bu araştırmada yabani yonca bitkilerinden elde edilen izolatların sitolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri sırasıyla Çizelge 1 ve 2'de özetlenmiştir. Çizelgelerde de görüldüğü gibi 39 izolatın 28'i Gram negatif özellikte ve hepsi çubuk biçimindedir. Gram negatif özellikte bulunan bakteriler, genellikle YMA besiyerinde opak, beyaz ve mukozlu, Bromtimol mavili YMA besiyerinde sarı renkli, Kongo Kırmızılı YMA besiyerinde ise beyaz-opak koloniler oluşturmuşlardır. Yine Gram negatif özellikteki izolatların Pepton Glikoz Agar besiyerinde üremelerinin zayıf olduğu, hatta bazılarının hiç üremediği görülmüştür. İzolatların Litmus Milk besiyerinde alkali reaksiyon göstererek genellikle serum zonu oluşturmuşlardır. Ayrıca izolatların katalaz ve sitokrom oksidaz enzimlerine sahip oldukları ve hareketli oldukları da çizelgelerde görülmektedir.

Çizelge 1 *Sinorhizobium medicae* türlerinin izole edildiği bitkilerin toplandığı lokaliteler ve yükseklikleri

İzolat No	İzolasyon bölgesi	Yükseklik(ma.s.l.)
HF85, HF88, HF103	Telsizler Tepesi	2100
HF188, HF191, HF208, HF373	Deveboynu Mevkii	2000
HF15, HF18, HF45, HF46, HF48	Kayakyolu Mevkii	2250
HF64, HF66, HF71, HF84	Palandöken Dağları	2500
HF109, HF113	Yıldırım Dağı	2350
HF184, HF115, HF369	Alibaba Dağı	2350
HF209, HF312, HF363, HF368	Turnagöl Dağı	2250
HF213, HF296, HF301	Hasanbaba Dağı	2100
HF305, HF308, HF310, HF372	Egerli Dağı	2300
HF315, HF319, HF322, HF370	Çubuklu Dağı	2400
HF328, HF330, HF331	Dumlu Tepesi	2350

Çizelge 2 *Sinorhizobium medicae* izolatlarının sitolojik ve biyokimyasal özellikleri

Izolat No.	Gram boyama	Bakteri morfolojisi	Koloni rengi	Mukoz oluşturma	Brom thymol blue besiyerinde koloni rengi	Congo red besiyerinde koloni rengi	Hareket	Katalaz	Oksidaz
HF15	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF18	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF45	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF46	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF48	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF64	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF66	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF71	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF84	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF85	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF88	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF103	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HK109	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF113	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF115	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF184	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF188	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF191	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Pembe	+	+	+
HF208	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF209	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Beyaz	-	-	-
HF213	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF296	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF301	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF305	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF308	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Pembe	+	+	+
HF310	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Beyaz	-	-	-
HF312	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF315	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Pembe	+	+	+
HF319	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Beyaz	-	-	-
HF322	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF328	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF330	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF331	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Pembe	+	+	+
HF363	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF368	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF369	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Beyaz	+	+	+
HF370	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Pembe	-	-	-
HF372	-	Çubuk	Krem	+	Sarı	Pembe	+	+	+
HF373	-	Çubuk	Krem	-	Beyaz	Beyaz	-	-	-

Sonuç olarak, sitolojik ve biyokimyasal analiz verilerine göre elde edilen 39 izolatın 28'inin *Sinorhizobium medicae* (*Rhizobium meliloti* veya *Sinorhizobium meliloti*) türü olduğu Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology'e göre tespit edildi (Jordan, 1984; Çizelge 1 ve 2).

Tartışma ve Sonuç

Araştırmamızda yabani yonca bitkilerinden izole edilen bakterilerin teşhisinde geleneksel teşhis yöntemleri uygulanmıştır. Klasik yöntemlerde izolatların kültürel özelliklerinin *Rhizobium* türleri için belirtilen özelliklere uyup uymadıkları araştırılmış ve bu amaçla YMA, Brom thymol mavili ve Kongo kırmızılı YMA besiyerlerinde üreme, gram özelliği, hareket, katalaz ve oksidaz testlerine reaksiyonları incelenmiştir. Çeşitli araştırmacılar

(Beck et. al., 1993; Öğütücü, 2009). *Rhizobium* bakterilerinin YMA besiyerinde beyaz-krem renkli, opak, bazen şeffaf ve mukozlu koloniler oluşturduğunu, Brom thymol mavili besiyerinde hızlı üreyenlerin yeşil renkli besiyerini asit üreterek maviye dönüştürdüğünü, Kongo kırmızılı YMA besiyerinde ise pembe-beyaz ve opak koloniler oluşturduklarını belirtmektedirler. Bu özellikler bakımından izolatların 11 tanesinin literatürde belirtilenlere uymadığı, 28 tanesinin ise literatürde belirtilen özelliklere uyduğu görülmüştür (Çizelge 2). Genellikle agar plaklarında hızlı üreyen *Rhizobium*'ların 2-5 mm çaplı koloniler oluşturdukları belirtilmektedir (Somasegaran and Hoben 1985; Öğütücü, 2009). Araştırmamızda elde edilen izolatların saf kültürlerinde oluşturdukları kolonilerin büyüklüğünün belirtilen sınırlarda olduğu gözlemlenmiştir.

Kültürel özellikleri bakımından olumlu bulunan toplam 28 izolat hücresel yapı, Gram özellikleri ve hareket yetenekleri bakımından da incelenmiş ve hepsinin çubuk şeklinde, gram (-) ve hareketli oldukları belirlenmiştir. Bu bulgular *Rhizobium* cinsine ait bakterilerin sitolojik özellikleriyle de uygunluk göstermektedir (Matos ve Schröder, 1989; Holt 1994; Adıgüzel, 2010).

Ayrıca *Rhizobium* bakterilerinin katalaz ve sitokrom oksidaz enzimlerine sahip oldukları bildirilmektedir (Gök, 1993; Öğütücü, 2009). Genellikle katalaz enziminin anaerobik ve mikroaerofilik bakterilerde, sitokrom oksidaz enziminin de Gram (-) fakültatif anaerobik bakterilerde bulunmadığı belirtilmekte olup (Tamer vd.,1986) izolatlarımızın 28 tanesi bu iki test bakımından da pozitif bulunmuştur (Çizelge 2).

Araştırmada belirlenen izolatların moleküler düzeydeki tanımlamaları yapıldıktan sonra simbiyotik etkenlik ve azot bağlama potansiyellerinin araştırılmasının ardından tarla denemelerinin de eklenmesi ile beraber rekabet yeteneklerinin tespit edilmesi sonucunda tarımsal faaliyetlerde mikrobiyal gübre olarak kullanılabilecekleri tavsiye edilebilir.

Kaynaklar

- Adıgüzel A, Öğütücü H, Baris O, Karadayı M, Gulluce M, Sahin, F. 2010. Genetic Diversity of Rhizobium Strains Isolated from Wild Vetch Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. Romanian Biotechnological Letters., 15: 5017-5024
- Andeden EE, Baloch FS, Derya M, Kilian B, Özkan H. 2013. IPBS-Retrotransposons-based Genetic Diversity and Relationship Among Wild Annual Cicer Species. J. Plant Biochem. Biotechnol., 22: 453-466
- Atıcı Ö, Öğütücü H, Algur ÖF. 2005. Effect of Putrescine on Inducing Symbiosis in Chickpea and Vetch Inoculated with Standard or Wild Strains of Rhizobium. Symbiosis., 38: 163-174
- Beck DP, Materon LA, Afandi F. 1993. Practical Rhizobium – Legume Technology Manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo Syria: P 1 – 54
- Boşgelmez A, Boşgelmez İİ, Paslı N, Savaşçı S. 2001. Ekoloji-II., Ankara: 886s
- Gök M, Martin P. 1993. Farklı Rhizobium Bakterileri ile Aşılamanın Soya, Üçgül ve Fiğde Simbiyotik Azot Fiksasyonuna Etkisi. Doğa Tr. J. of Agricultural and Forestry., 17: 753-761
- Holt JG, Krieg NR, Sneath Ha A, Staley JT, Williams ST. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (9 nd ed): p 5–98
- Lajudie PD, Willems A, Pot B, Dewettinck GM, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of the genus Sinorhizobium and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp.nov., and *Sinorhizobium teranga* sp.nov. International Journal Systematic Bacteriology.,44: 715-733
- Jordan DC. 1984. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore\ London: pp. 235-244
- Matos I, Schröder EC. 1989. Strain selection for pigeon pea Rhizobium under greenhouse conditions. Plant and Soil., 116: 19-22
- Öğütücü H, Algur ÖF, Elkoca E, Kantar F. 2008. The Determination of Symbiotic Effectiveness of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum. Turk. J. Agric. For., 32: 241-248
- Öğütücü H, Adıgüzel A, Güllüce M, Karadayı M, Şahin F. 2009. Molecular Characterization of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. Romanian Biotechnological Letters., 14: 4294-4300
- Öğütücü H, Kasımoğlu C, Elkoca, E, 2010. Influence of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas on the Growth and Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under Salt Stress. Turk. J. Agric. For., 34: 361-371
- Özer S, Karaköy T, Toklu F, Baloch FS, Kilian Ö, Özkan, H. 2010. Nutritional and Physicochemical Variation in Turkish Kabuli Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Landraces. Euphytica., 175:237–249
- Sarıoğlu G, Özçelik S, Kaymaz S. 1993. Elazığ ve Yöresinde Üretilen Mercimek Bitkilerinden Etkili Nodozite Bakterilerinin (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) Seçimi. Doğa Tr. J. of Agricultural and Forestry., 17: 569-573
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1985. Methods in Legume Rhizobium Technology. Library of Congress Number., 87-106109 Havaii: pp. 1-52
- Tamer AÜ, Uçar F, Ünver E, Karaboz İ, Bursalioğlu M, Oğultekin R. 1986. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi No: 15, Bornova – İzmir (İkinci baskı): pp. 88 – 90
- Villegas MDC, Rome S, Maure L, Domergue O, Gardan L, Bailly X, Cleyet-Marel JC, Brunel B. 2006. Nitrogen-Fixing Sinorhizobia with *Medicago laciniata* Constitute a Novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. Systematic and Applied Microbiology., 29: 526-538
- Zribi K, Mhamdi R, Huguet T, Aouani ME. 2004. Distribution and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Populations of *Medicago truncatula* in Tunisian Soils. Soil Biology and Biochemistry., 36: 903-908