

Farklı Sterilizasyon Yöntemleri Kullanılarak Fiğ (*Vicia sativa* L.) ve Bakla (*Vicia faba* L.)’da Bakteri (*Rhizobium* spp) İzolasyon Çalışması

Mehmet ÖTEN^{1*}, Zeynep DURAN¹, Ferzat TURAN¹

¹Tarla Bitkileri, Ziraat Fakültesi/ Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Türkiye.

ÖZ

Baklagiller beslenmenin yanı sıra tarımsal alanlarda da önemli bir bitki grubudur. Ekim nöbeti uygulamalarıyla beraber toprağa azotça zengin organik gübre kazandırmaktadırlar. Azot bağlama görevini baklagil bitkilerin köklerinde bulunan nodüllerde oluşan *Rhizobium* bakterileri gerçekleştirmektedir. *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonu ve çoğaltımı üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmada fiğ ve bakla bitkisinden *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonu aşamasında hidrojen peroksit (H₂O₂) ve sodyum hipoklorit (NaClO)’in farklı dozları ve süreleri uygulanarak, nodül sterilizasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışma Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada fiğ ve bakla bitkisinden alınan nodüller, %50’lik H₂O₂ çözeltisinde 10, 15 ve 20 dakika sürelerde bekletme işlemi sterilizasyon açısından her iki bitkide de başarılı sonuç vermiştir. Diğer çalışma konusu olan NaClO uygulamasının; %40, %50 ve %60’lık çözeltilerinde 10, 15 ve 20 dakika muamele işlemi fiğ bitkisi için başarılı sonuç verirken, bakla bitkisi için yeterince sterilizasyon sağlayamamıştır. Uygulamalardan yeterli sterilizasyon sağlanan ve herhangi bir kontaminasyon görülmeyen nodüller seçilip kültür ortamına alınmıştır. *Rhizobium* bakterilerinin çoğaltım aşamasında Nutrient Broth besi yeri kullanılmıştır. Petri kaplarında hazırlanan besi yeri ortamlarına uygun prosedürlerde bakteri ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu ortamın bakteri çoğaltımı üzerindeki başarısı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İzolasyon, Kontaminasyon, Nodül, *Rhizobium* bakterisi

* Sorumlu Yazarın e-postası: mehmetoten@subu.edu.tr

Cite as: Öten, M, Duran, Z. & Turan, F. (2025). Farklı Sterilizasyon Yöntemleri Kullanılarak Fiğ (*Vicia sativa* L.) ve Bakla (*Vicia faba* L.)’da Bakteri (*Rhizobium* spp) İzolasyon Çalışması, *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(1), 14-22. <https://doi.org/10.58728/joinabt.1620849>

Bacteria (*Rhizobium* spp) Isolation Study Using Different Sterilization Methods in Vetch (*Vicia sativa* L.) and Faba Bean (*Vicia faba* L.)

ABSTRACT

Leguminous plants are not only important for nutrition but also for agricultural fields. Through crop rotation practices, they contribute nitrogen-rich organic fertilizer to the soil. The nitrogen fixation process is carried out by *Rhizobium* bacteria located in the nodules of leguminous plants. Various studies have been conducted on the isolation and multiplication of *Rhizobium* bacteria. In this study, the effects of different doses and durations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and sodium hypochlorite (NaClO) on nodule sterilization were investigated during the isolation of *Rhizobium* bacteria from vetch and faba bean. The study was carried out in the laboratories of the Faculty of Agriculture, Sakarya University of Applied Sciences. In the study, nodules obtained vetch and faba bean were treated with 50% H₂O₂ solution for 10, 15, and 20 minutes, which resulted in successful sterilization for both plants. In the case of NaClO treatments, 40%, 50%, and 60% solutions with 10, 15, and 20 minute exposure times yielded successful results for vetch, while faba bean did not achieve sufficient sterilization. Nodules that showed no contamination and sufficient sterilization were selected and transferred to the culture medium. Nutrient Broth was used for the multiplication of *Rhizobium* bacteria. Bacterial inoculation was carried out in petri dishes with the prepared culture medium, and the success of bacterial multiplication on this medium was observed.

Keywords: Isolation, Contamination, Nodule, *Rhizobium* bacterium

1. Giriş

Baklagiller, Dünya florasında 650 cins ve 16000 tür ile temsil edilen, tarım alanında ekonomik değere sahip, oldukça önemli bir familyadır. İnsan yiyeceği ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır [1]. Organik maddece fakir topraklarda, baklagil bitkileri ile yeşil gübre uygulaması, toprağın organik maddece zenginleşmesini sağlamaktadır [2]. Kök saplı ve sülüklü baklagiller erozyon kontrolü açısından etkilidir. Baklagil yem bitkileri, buğdaygillerle beraber yetiştirildiği zaman ot verimi ve protein oranında artış görülmektedir. Dünya genelinde insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin %22’si, karbonhidratların da %7’si yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır [3]. Baklagillerin önemli özelliklerinden bir diğeri de toprakta bulunan *Rhizobium* bakterileri ile kurdukları ortak yaşam sonucu atmosferdeki %78 oranındaki moleküler azotu toprağa bağlamalarıdır. Bazı bakteriler, mavi-yeşil algler ve mantarlar dışında hiçbir canlı, azotu doğrudan kullanma yeteneğine sahip değildir. Atmosferde bol miktarda bulunan bu moleküler azotun amonyum formlarına indirgenerek, yararışlı hale geçmesine azot fiksasyonu denir [4]. Azot fiksasyonu sonucu yılda 175 milyon ton azot tespit edilmekte ve bunun da yaklaşık yarısı *Rhizobium* spp. bakterilerinin baklagillerle olan simbiyotik ilişkisi sonucu sağlanmaktadır. Gerek dünya protein ihtiyacının artması, gerekse mineral azotlu gübrelerin üretimi ve kullanımı sırasında ortaya çıkan çevre sorunları nedeniyle *Rhizobium* spp. bakterileri tarafından gerçekleştirilen simbiyotik azot fiksasyonunun önemi gün geçtikçe artmaktadır [5]. Canlıların bu kaynaktan yararlanabilmeleri için azot molekülleri arasındaki üçlü bağın ikili bağa indirgenmesi ve azotun hidrojen ve oksijenle birleşmesi gerekir. *Rhizobium* spp. bakterileri konak seçici olup, baklagiller (*Leguminosae*) familyasındaki bitkilerle birlikte bulunur ve bu bitkilerin köklerinde nodüller oluşturarak azot fiksasyonunu gerçekleştirirler [4]. *Rhizobium* bakterileri baklagillere özel olmakla birlikte her baklagil bitkisine de özel *Rhizobium* bakterisi bulunmaktadır. Nodüllerde azot bağlayıcı olarak; *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. ve *Azorhizobium* sp. cinslerinin olduğu tespit edilmiştir. En iyi bilinenler ise bezelye, fasulye, soya fasulyesi, yonca gibi baklagil bitkilerinin kök nodüllerinde oluşan *Rhizobium* sp. bakterileridir. Belirli *Rhizobium* türleri arasında aşılama yapılmaktadır [6]. Bu aşılama ile belirli baklagil bitkilerini enfekte etmekte ve nodül oluşumuna yardımcı olmaktadır. Nodül oluşumu, bitki kökleri tarafından salgılanan flavonoid sentezi ile başlayarak, bitki ve bakteri arasında gerçekleşen bir ilişkidir. Bu sayede baklagiller, hem kendi ihtiyacı olan azotu karşılamakta hem de kendinden sonra ekilecek bitkiye azot bakımından zengin bir toprak bırakmaktadır [7]. Her baklagil yem bitkisi için özel bakteri grubu olduğu gibi, her grup içerisinde de azot tespit etme yönünden etkili veya etkisiz suşlar bulunmaktadır. Etkili suşların yumrucuk meydana getirmelerine karşılık, azot tespit etme güçleri çok

düşüktür [8]. Bu nedenle, çeşitli bitkiler için etkili suşların bulunup üretilmesi gereklidir. Bu amaçla çalışmada materyal olarak seçilen baklagil türlerinden adi fiğ; çok geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olması, tane ve yeşil otunda protein oranının yüksek olması, kısa sürede gelişmesi, ekim nöbetinde arzu edilen bir bitki olması, toprağa azot fikse etmesi, yeşil gübre olarak kullanılması, topraktaki organik madde miktarını arttırması gibi nedenlerle ülkemizde en fazla ekim alanına sahip yem bitkilerinden birisidir [9]. Fiğ, dünyada ve ülkemizde hayvanlara kaba ve kesif yem sağlamak, toprağın verim gücünü arttırmak için yetiştirilen, yeşil ve kuru otu lezzetli ve besleyici, taneleri yalnız olarak veya arpa ile beraber verildiğinde hayvanlar için zengin bir kesif yem kaynağı olan, samanının besleme değeri diğer samanlardan daha yüksektir [10]. Diğer bitki olan bakla hem insan hem de hayvan beslenmesinde önemli bir protein kaynağı ve dünyanın birçok yerinde ekim nöbetinin göz ardı edilmeyen bir bitkidir [11].

Söz konusu bitkilerden bakteri suşlarının üretim sürecinde bilinmesi gereken bir diğer konu ise bakteri izolasyonu öncesi nodül sterilizasyonu ve bakterilerin çoğaltılacağı uygun ortamların belirlenmesidir. Ögütçü [12] çalışmasında *Rhizobium* bakterilerine özel besi yeri olarak, içerisinde karbon kaynağı olarak mannitol, organik azot kaynağı olarak ise Yeast Mannitol Agar (YMA) kullanmış ve elde ettiği sonuçlar ışığında bakterilerinin topraktan izolasyonunun zor olduğunu ancak kök nodüllerinin izolasyonu kolayca yapılabileceğini, *Rhizobium* bakterileri Kongo kırmızılı YMA’ya ekilip, ışısız alanda inkübe edildiğinde boyayı absorbe ettiğini ve beyaz-opak pembemsi koloniler oluşturduğunu, ayrıca *Rhizobium* bakterileri yeni yapılmış Brom Timol Mavili YMA’da besi yerinin yeşil rengini hızlı üreyenlerin sarıya, yavaş üreyenlerin ise maviye dönüştürdüğünü bildirmiştir.

Somasegaran ve Hoben [13], fasulye bitkisinin kök nodüllerini topladıktan sonra ilk olarak %5’lik sodyum hipoklorit içinde iki dakika tutarak, yüzey sterilizasyonu yapmışlardır. Bu işlemler laminar hava akışlı kabin içerisinde gerçekleşmiştir. Nodüldeki bakteri izolasyonu için ise her bir nodül içerisinde steril 1 ml distile su bulunan tüplere konulmuş, burada 10 dakika bekletilmek suretiyle nodüllerin yumuşaması sağlanmıştır. Nodüller daha sonra steril bir tüp içerisinde parçalanıp, bakterilerin sıvıya bulaşması sağlanmıştır. Daha sonra bakterilerin çoğaltılması amacıyla özel hazırlandıkları YMA (Mannitol 10 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, Yeast ekstrakt 0.8 g 15 g l⁻¹ (distile su) ortamı üzerine bakteri bulaştırdıkları sıvıdan 0.5 ml alınarak eşit bir şekilde yaymışlar ve 28°C sıcaklıkta 7 gün boyunca inkübasyona bırakmışlardır. Oluşan *Rhizobium* bakterileri tüplere doldurulmuş, aynı ortam üzerine ekimi yapılmıştır. Daha sonra tekrar aynı ortam, petri kaplarına alınmıştır. Bakteri çoğaltımı gerçekleşmiştir. Her 6 ayda bir yenilenip +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Christiansen ve Graham [14]’in yaptıkları çalışmada, besin solüsyonuna farklı düzeylerde eklenen fosforun fasulyede azot fiksasyonu ve nodülasyon parametrelerine olan etkileri incelenmiştir. 1 mg kg⁻¹, 4 mg kg⁻¹ ve 16 mg kg⁻¹ düzeylerinde besin solüsyonuna eklenen fosfor ile nodül kuru ağırlığı sırasıyla 70, 212 ve 354 mg bitki⁻¹ olarak alınırken, bitkideki toplam azot sırasıyla 45, 108 ve 126 mg bitki⁻¹ olarak bulunmuştur.

Yavaş ve Ünay [1] tarafından yapılan çalışmada, iklim değişikliğinin kök nodül oluşumu ve Biyolojik Azot Fiksasyonu (BNF) üzerindeki etkileri araştırılmış, baklagiller ve bakteriler arasındaki simbiyotik ilişkinin artan CO₂ koşulları altında nodül gelişimini hızlandırdığı ve BNF’yi artırdığı belirtilmiştir. Ancak, iklim senaryolarına göre 2-4°C’lik sıcaklık artışı ve beraberindeki kuraklığın, kök tüyü enfeksiyonunu, nodül sayısını, nodül büyüklüğünü, nodül gelişimini ve aktivitesini azaltarak BNF’yi olumsuz etkileyeceği, ayrıca tuzluluğun nodül solunumunu ve leghemoglobin içeriğini azaltacağı vurgulanmıştır.

Türkoğlu [15], *Rhizobium* cinsi bakterilerinin geliştirilmesinde Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyeri, Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretim miktarlarının incelenmesinde melas besi ortamı kullanılmıştır. YEM besi yeri içerisindeki maddeler 1 litre distile suda çözündürülmüştür. 0.01N HCL ve 0.01N NaOH kullanılarak, besi yerinin pH değeri 7’ye ayarlanıp, 121°C de 15 dakika sterilize edilmiştir. Melas ise saf su ile %0.5, %0.1 ve %1.5’lik konsantrasyonlara ayarlanarak, 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. İzole edilen *Rhizobium phaseoli* suşları besi yerinde yuvarlak, kenarları

düzgün ve berrak koloniler oluşturmuştur. Suşların hepsi YEM besiyerinde mukoz oluşturmuştur. Suşların hareket kabiliyetlerinin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Suşların tümü 36 saat ve 120 saat sonra üreme gösterip asit oluşturmuşlardır.

Öğütçü ve ark. [16], yabani fiğden (*Vicia cracca*) izole ettikleri *Rhizobium* suşlarını düşük ve normal düzeyde sıcaklıklarda fiğ (*Vicia sativa* L. cv. Karaelçi) bitkilerinde nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyellerini araştırılmışlar ve düşük sıcaklıkta büyütülen bitkilerde kuru biyomas, nodül kitlesi, azot içeriklerinin genel olarak azaldığını ancak bazı suşların ise düşük sıcaklıkta etkili olduklarını tespit etmişler ve bu suşların uygun bölgelerde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Öğütçü [12], yapmış olduğu araştırmada, nodüllerden *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonunu incelenmiştir. Steril edilen nodüller 1 ml steril saf su içeren havanda ezilerek bakteri dışarı çıkartılmış ve YMA plaklarına çizgi ekimi yapılmıştır. Petriler 28+1°C’de 3-5 gün arası inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan bakteriler YMA besiyeri ortamı olan tüplere aktarılmıştır. Nohuttan 32, fiğden 97 adet izolat elde edilmiştir.

Somasegaran ve Hoben [13], *Rhizobium leguminosarum* ssp. Ciceri bakterisi için yüzey sterilizasyonu yapmıştır. Çalışmada tohumlar %80’lik etil alkolle 10 saniye muamele edilmiş ve alkolün uçması için beklendikten sonra %3’lük hidrojen peroksit çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tohumlar steril saf su ile yıkanıp, steril petrilere aktarılmıştır. 25°C’de etüvde çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlar içerisine %15’lik şeker çözeltisi bulunan inoculum ile muamele edilerek, kültürün tohumlara iyice bulaşması sağlanmıştır.

Ali [16], yapmış olduğu çalışmada 2 adet *Rhizobium japonicum* ve bir adet *Bradyrhizobium japonicum* ile 2 adet *Rhizobium* sp. suşunun PHB üretimlerini tespit etmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin PHB verimlerinin (hücre kuru ağırlığına göre) %2.2-51.1 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada baklagil yem bitkilerinden fiğ ve baklanın; nodüllerinden *Rhizobium* bakteri izolasyonu aşamasında, farklı sterilizasyon yöntemlerinin söz konusu türlere ait *Rhizobium* bakterilerinin izolasyon ve çoğaltım başarısı üzerine etkileri incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışma Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Doku Kültürü Laboratuvarında steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen Eresen-87 bakla çeşidi ile Alfa Tohum Firmasından temin edilen Nilüfer fiğ çeşidi kullanılmıştır. Fiğ ve bakla tohumları sterilize edilmiş kum, torf ve toprak karışımı (sırasıyla 1/4, 1/4, 2/4) ile hazırlanmış saksılara ekilerek %50 çiçeklenme dönemine kadar beklenmiş ve %50 çiçeklenme döneminden saksılardan bitkiler sökülerek, nodduller elde edilmiştir. Çalışmada ayrıca sterilizasyon malzemesi olarak, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve sodyum hipoklorit (NaClO), besiyeri olarak da Murashige & Skoog (MS) ve Nutrient Broth (NB) kullanılmıştır.

2.1. Nodüllerin Sterilizasyonu

Öncelikle %50 çiçeklenme döneminde hasat edilen bakla ve fiğ bitkisinin köklerinde oluşan nodüller topraklarından arındırmak için yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yarım saatte bir suyu değiştirilerek suda bekletilip temizlenmiştir. Bu işlem 4 kez uygulanmıştır. Daha sonra nodüller bisturi yardımı ile köklerden ayrılmıştır [12].

Nodüllerin en uygun sterilizasyon optimizasyonunu belirlemek için sterilizasyon aşamasında hidrojen peroksit (H₂O₂) ve sodyum hipoklorit (NaClO) kullanılmıştır. Sterilizasyon aşamasında hidrojen peroksit (H₂O₂) %50’lik çözelti oranında 3 farklı çalkalama (10, 15 ve 20 dk.) sürelerinde ve sodyum hipoklorit (NaClO) ise 3 farklı farklı çözelti oranlarında (%40-50-60) ve sabit 15 dk. çalkalama süresinde uygulanmıştır. Nodüller, hazırlanan konsantrasyonlarda belirtilen doz ve sürelerde muamele edildikten sonra 3 kez ve 5’er dakika steril saf su ile durulanmıştır (Tablo 1). Sterilizasyona tabi tutulan nodüller MS ortamına kültüre alınmıştır [15].

Tablo 1. H₂O₂ ve NaClO uygulama prosedürü

Sterilizasyon kimyasalı	Çeşme suyunda bekletme	Çalkalama süresi	Çözelti oranları
H ₂ O ₂	1 saat	10 dk	%50
(Hidrojen peroksit)	1 saat	15 dk.	%50
	1 saat	20 dk.	%50
NaClO	1 saat	10 dk	%40
(Sodyum hipoklorit)	1 saat	15 dk.	%50
	1 saat	20 dk.	%60

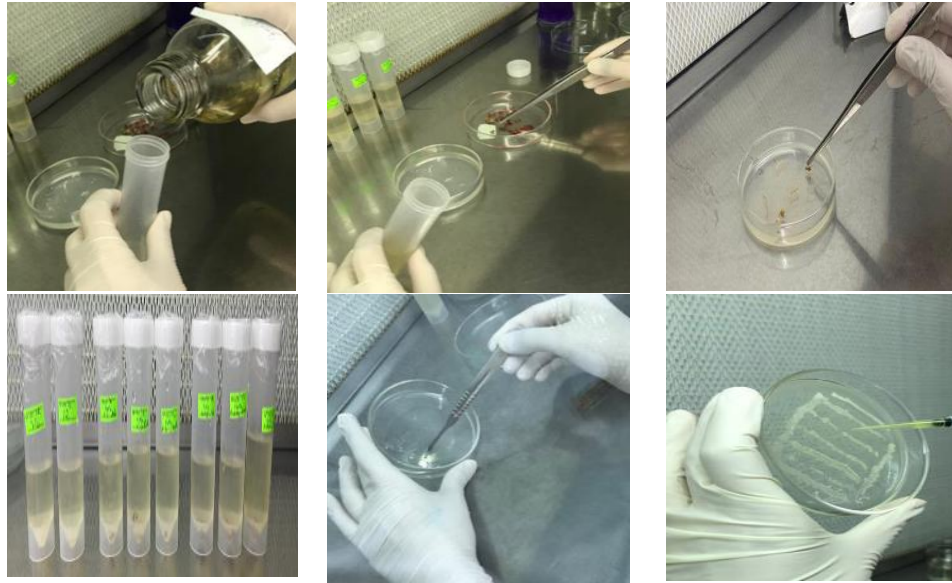
Daha sonra kültür ortamında kontaminasyon göstermeyen nodüller, MS ortamından alınarak steril petri üzerinde bisturi yardımı ile ezilip, küçük parçalar haline getirilmiştir [16].

2.2. *Rhizobium* bakterilerinin çoğaltımı

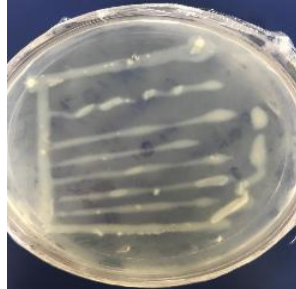
Rhizobium bakterileri için uygun bakteri besi ortamı 6 g l⁻¹ Nutrient Broth (NB) kullanılarak hazırlanmış ve ortamlar steril kabin içinde steril falkon tüplerine eşit miktarda dağıtılmıştır. Daha sonra ezilmiş nodüller, sıvı Nutrient Broth ortamında bakterinin çoğalması için 23-25°C sıcaklıkta kültüre alınmıştır. Besi yerinde 16-18 saat içinde çoğalan bakteriler steril ortamda öze yardımı ile daha önceden hazırlanmış 6 g l⁻¹ Nutrient Broth Agar içeren petrilere tek klon elde etmek için çizimler yaparak kültüre alınmıştır [15].

3. Bulgular ve Tartışma

Bakterilerin devamlılığını gözlemlmek ve tek klon elde etmek için yeniden sıvı besi ortamına alınan bakteriler, 16-18 saat falkon tüpte bekletildikten sonra petrilere bulunan katı besi ortamlarına bulaştırılmıştır (Şekil 1). Bu işlem sonucunda kolonilerde tekrardan çoğalma gözlemlenmiştir [12].



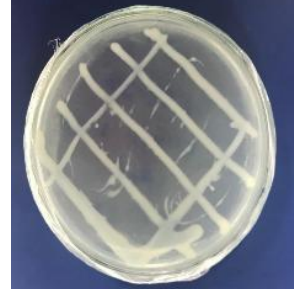
Rhizobium bakterisi ekim aşamalarına ait görseller



%40'lık NaClO' da üreyen fiğ bitkisine ait *Rhizobium* bakterisi



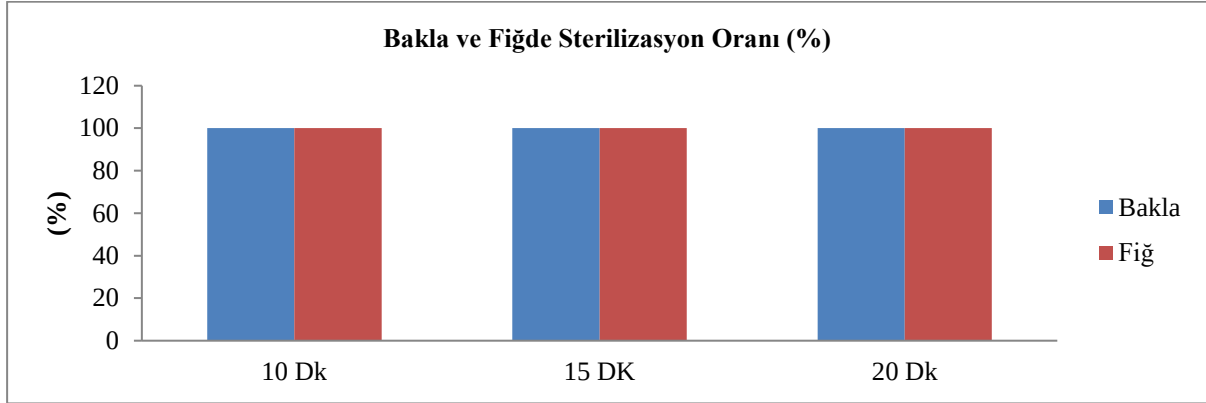
%60'lık NaClO' da üreyen fiğ bitkisine ait *Rhizobium* bakterisi



%50'lik H₂O₂'de bulunan bakla bitkisi *Rhizobium* bakterisi

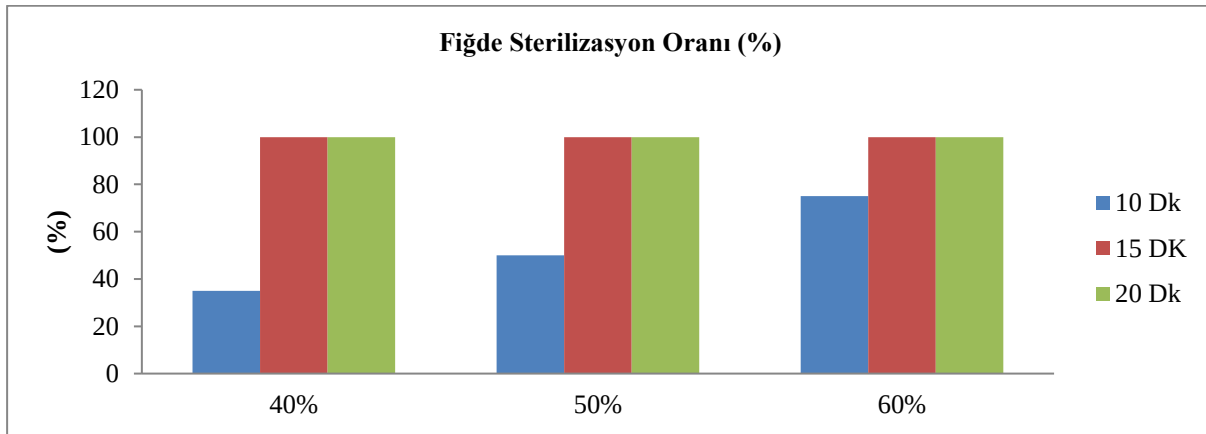
Şekil 1. Çalışmanın farklı aşamalarına ait görseller.

Elde edilen verilere göre nodül sterilizasyonunda %50 lik hidrojen peroksit ile 10-15-20 dk. aralıklarla çalkalanıp ve daha sonra MS ortamına kültüre alınan hem fiğ hem de bakla bitkilerinin nodüllerinde kontaminasyon görülmemiştir (Şekil 2).



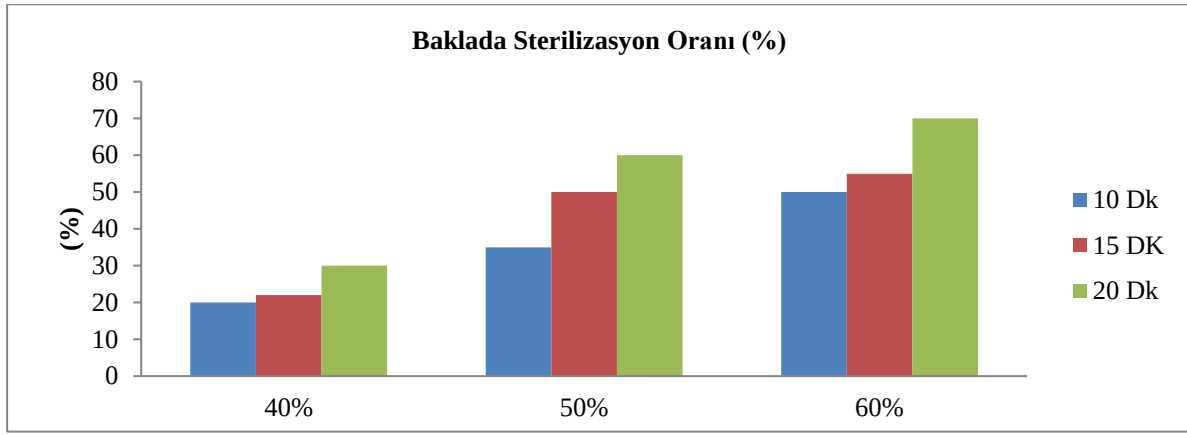
Şekil 2. Bakla ve Fiğ nodüllerinin farklı uygulama sürelerine göre hidrojen peroksit ile sterilizasyon oranları.

Diğer taraftan sodyum hipoklorit ile farklı oranlar (%40-%50-%60) ve farklı sürelerde (10, 15, 20 dk.) sterilizasyona tabi tutulan fiğ bitkisinin nodülleri, 10 dk.’lık sürede %40-%50-%60 sodyum hipoklorit oranlarında sırasıyla %65, %50 ve %25 oranda kontaminasyon gösterirken, diğer (15, 20 dk.) süreler ve konsantrasyonlarda herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Fiğ nodüllerinin farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonları ve uygulama sürelerine göre sterilizasyon oranları.

Bakla bitkisi nodüllerinden elde edilen sterilizasyon sonuçlarına göre sodyum hipokloritin tüm oranları (%40-%50-%60) ve sürelerinde (10, 15, 20 dk.) izole edilmiş nodüller üzerinde %30 ile %80 oranında kontaminasyon görülmüştür. Bu sonuçlara göre %40’lık sodyum hipoklorit 10, 15 ve 20 dk. sterilizasyon sürelerinde sırasıyla %80, %78 ve %70 oranında kontaminasyon gözlemlenmiştir (Şekil 4). %50’lik sodyum hipoklorit uygulamasının 10 dk.’lık süresinde %65, 15 dk.’lık süresinde %50 ve 20 dk.’lık süresinde ise %40 kontaminasyon gerçekleşmiştir. %60’lık sodyum hipoklorit uygulamasında 10 dk.’lık sürede %50, 15 dk.’lık süresinde %45 ve 20 dk.’lık süresinde ise %30 kontaminasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Bakla nodüllerinin farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonları ve uygulama sürelerine göre sterilizasyon oranları.

Bakla bitkisi nodüllerinde sterilizasyon amacıyla uygulanan sodyum hipokloritin doz ve uygulama süreleri arttıkça kontaminasyon oranının düştüğü, ancak tam sterilize nodül eldesi sağlanmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre uygulanan sterilizasyon materyalinin etkisi nodülün elde edildiği bitki türüne göre farklılık göstermektedir. Bu sebeple *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonu aşamasında minimum kontaminasyonu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan sodyum hipokloritin izolasyon yapılacak bitki türüne göre doz ve sürelerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Yousef ve Hussein [18] tarafından yapılan çalışmada, bakla (*Vicia faba* L.) tohumlarının yüzey sterilizasyonunda %3 H₂O₂ kullanılmış ve başarılı nodülasyon ile etkili *Rhizobium* kolonizasyonu elde edilmiştir. Bu durum, H₂O₂'nin uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında bitki dokularına zarar vermeden mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında etkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Mahdhi et al. [20] çalışmasında *Vicia sativa* kök nodüllerinden izole edilen bakterilerin yüzey sterilizasyonu sonrasında analiz edilmesiyle yüksek kaliteli *Rhizobium* izolatları elde edilmiştir. Burada da etkili sterilizasyonun doğru izolasyon için kritik olduğu vurgulanmıştır. Shalaby et al. [21] tarafından *Vicia sativa* ve *Vicia cinerea* bitkilerinden *Rhizobium* izolasyonu yapılan bir çalışmada, sterilizasyon sonrası elde edilen izolatlar genetik ve fenotipik olarak karakterize edilmiş ve sterilizasyon adımının izolasyon sürecindeki önemi vurgulanmıştır.

Sterilizasyon için kullanılan sodyum hipokloritin fığde olumlu sonuç vermesinin yanı sıra bakla bitkisinde göstermiş olduğu bu hassasiyet çalışmanın yapılacağı bitki türüne göre sterilizasyon materyal ve yöntemi seçmek gerekliliğini göstermektedir.

4. Sonuçlar

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak hayvan besleme açısından önemli baklagil yem bitkilerinden fığ (*Vicia sativa* L.) ve bakla (*Vicia faba* L.) bitkileri kullanılmıştır. Köklerden nodül izolasyonu ve çeşitli sterilizasyon yöntemleri her iki bitki üzerinde incelenmiştir. Bu doğrultuda sterilizasyon için sodyum hipoklorit (NaClO) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre her iki bitkinin yanıtı, kullanılan farklı kimyasalların oranlarına ve farklı sterilizasyon sürelerine göre değişik olmuştur. Sonuç olarak, %50'lik H₂O₂'nin her iki bitki üzerinde daha etkili bir sterilizasyon yöntemi olduğu öne çıkmıştır. Bu bulgular, tarım ve biyoteknoloji alanlarında *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonu ve kullanımı için uygun sterilizasyon yöntemlerinin seçilmesinde yol gösterici olacaktır.

5. Beyanname

5.1. Rakip Çıkarlar

"Bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması yoktur"

5.2. Yazarların Katkıları

Sorumlu Yazar Mehmet ÖTEN: Hipotezin oluşturulması, sonuçlara ulaşmak için gereç ve yöntemlerin planlanması, deneylerin yapılması, verilerin düzenlenmesi ve bildirilmesi için sorumluluk almak, bulguların mantıklı açıklanması ve sunumu için sorumluluk almak, araştırma sırasında literatür taraması ile ilgili sorumluluk almak, yazının tümü veya asıl bölümün oluşturulması için sorumluluk almak, makaleyi teslim etmeden önce sadece imla ve dil bilgisi açısından değil aynı zamanda entelektüel içerik açısından yeniden çalışma yapmak.

Yazar Zeynep DURAN: Deneylerin yapılması, verilerin düzenlenmesi ve bildirilmesi için sorumluluk almak, bulguların mantıklı açıklanması ve sunumu için sorumluluk almak, araştırma sırasında literatür taraması ile ilgili sorumluluk almak, yazının tümü veya asıl bölümün oluşturulması için sorumluluk almak.

Yazar Ferzat TURAN: Deneylerin yapılması, verilerin düzenlenmesi ve bildirilmesi için sorumluluk almak, bulguların mantıklı açıklanması.

5.3. Etik Kurul Onayı

Etik kurul izni gerektiren bir çalışma değildir.

5.4. Teşekkür

“Bu araştırma için, yazarlar dışında katkı yapan kişi veya kurum bulunmamaktadır”

6. Kaynakça

- [1] Yavaş İ., Ünay A. (2018). Baklagillerde Kök, Nodül Oluşumu ve Azot Fiksasyonu Üzerine Bazı Küresel İklim Değişikliği Parametrelerinin Etkisi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi* (UTYHBD), 4(2), 270 – 278.
- [2] Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R., Karadağ, Y. (2009). Baklagil Yem Bitkileri, Cilt II. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir.
- [3] Wery, J. and P. Grinac. (1983). Uses of Legumes and their economic importance. In Technical Handbook on Symbiotik Nitrogen Fixation. FAO, Rome, Italy.
- [4] Fritsche, W. 1990. Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag. Jena
- [5] İşler, E., 2009. *Farklı aşılama yöntemleri ile bakteri (Bradyrhizobium japonicum) aşılamasının azot fiksasyonuna ve tane verimine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s.
- [6] Uyanık, M., Rezaeieh, K. A. P., Delen, Y., Gürbüz, B., (2011). Baklagillerde Bakteri Aşılaması ve Azot Fiksasyonu, *Ziraat Mühendisliği Dergisi*, 357, 8-12.
- [7] Sarıoğlu, G., S. Özçelik, S. Kaymaz, 1993. Selection of effective nodosity bacteria (*Rhizobium leguminosarum* biovar.viciae) from lentil grown in Elazığ. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17: 569-573.
- [8] Gök, M., Onaç, I., 1995. Değişik *Bradyrhizobium japonicum* izolatları ile aşılamının farklı soya çeşitlerinde verime, nodülasyona ve N₂ fiksasyonuna etkisi. *İlhan Akalan Toprak ve Çevre Sempozyumu*, Cilt II, 237-246.
- [9] Açıkgöz, E., 2001. Yem Bitkileri (Ders Kitabı). Uludağ Üni. Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Vipaş AŞ.Yayın No: 58, 584 s, Bursa.
- [10] Albayrak, S. 2002. Karadeniz Bölgesinde Fiğ Tarımı. *Türk-KOOP. Ekin Dergisi*. 6:21, s 40-43.
- [11] Mwanamwenge, J. and Loss, S.P., Siddique, K. H. M., Cocks, P. S. 1998. Growth, seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba* L.) in a short-season Mediterranean-type environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38(2), 171-180.
- [12] Ögütçü, H. 2000. *Yabani baklagil bitkilerinden izole edilen rhizobium suşlarının baklagil bitkilerinden nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyellerinin araştırılması* (Master's thesis, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [13] Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legumes-Rhizobium Technology. Springer-Verlag, New York, Inc., 450. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- [14] Christiansen, I. and Graham, P.H. 2002. Variation in dinitrogen fixation among andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. *Field crop res.* 73, 133–142.
- [15] Türkoğlu, Z. 2009. *Bazı Rhizobium bakterilerinin melas besiyortamında poly-β-hidroksibütirat PHB üretimlerinin incelenmesi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (M.S. thesis)

- [16] Ögütçü, H., Algur, Ö. F., Güllüce, M., Adıgüzel, A. 2010. Mikrobiyal gübre olarak kullanılan ve yabani bitkilerden izole edilen *Rhizobium* suşlarının farklı sıcaklık şartlarında azot bağlama potansiyellerinin Araştırılması. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(1), 47-52.
- [17] Ali, E. 2002. *Bazı Rhizobium bakterilerin melası besi ortamında poli-beta-hidroksibütirat PHB üretimi ile protein profil ve plazmid DNA’larının incelenmesi*. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı (M.S. thesis)
- [18] Çetin Karaca, Ü. 2010. Konya yöresinde yetiştirilen kuru fasulyeden izole edilen *Rhizobium* bakterilerinin etkinliklerinin belirlenmesi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı (Ph.D. dissertation).
- [19] Naeima, Mh, Yousef, Nemmat, & Hussein. 2017. Impacts of inoculation with *rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae and phosphate on *vicia faba* L . Bangladesh J. Bot. 46(2): 599-605.
- [20] Mahdhi, M., Fterich, A., Rejili, M. et al. 2012. Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. *Ann Microbiol* 62, 61–68.
- [21] Moustafa, E., Shalaby Ismael, A., Khatab and Ahlam, A., Mehesen. 2014. Molecular and phenotypic characterization of symbiotic *Rhizobium* isolated from some wild *Vicia* species under Egyptian conditions. *Journal of applied sciences research* 10(1): 53-62.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)