

# Bitki İnfeksiyon Yöntemiyle *Rhizobium* Sayımı <sup>1</sup>

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

## 01. Genel Bilgiler

Kök nodül bakterilerinin (*Rhizobium*) diğer mikroorganizmalar ile karışık olmaları durumunda, sayımları için güvenilir bir katı besiyeri sayım yöntemi yoktur. *Rhizobium* bakterilerinin üretildiği katı besiyerlerinde diğer pek çok mikroorganizma da rahatlıkla gelişebildiği gibi, farklı *Rhizobium* türleri koloni yapılarından ayırt edilemez. Eğer *Rhizobium* bakterilerinin sayılacağı ortamda başka mikroorganizmalar da varsa (örneğin steril olmayan pit ile hazırlanmış *Rhizobium* inokülantında olduğu gibi), ve/veya sadece bir *Rhizobium* türünün sayımı isteniyorsa, EMS yöntemindeki yaklaşım ile geliştirilmiş olan bitki infeksiyon yöntemi en uygun sayım yöntemidir. Bu yöntemin prensibi; sayımı istenen *Rhizobium* türünün nodül oluşturduğu baklagil bitkisinin çimlendirilmiş tohumuna bakterinin aşılınması, bitki gelişimi tamamlandığında nodül oluşumunun saptanması, nodül oluşan toplam bitki sayısının EMS tabloları gibi hazırlanmış özel tablolardan hesaplanmasına dayanır. Bir kaç tür istisna olmak üzere, her *Rhizobium* bakterisi 1 çeşit baklagil kökünde nodül oluşturur. Bir diğer deyiş ile *R. cicer* sadece nohutta nodül oluşturabilir. Dolayısı ile sayımı yapılacak *Rhizobium* türünün gelişeceği baklagil bitkisinin seçimine özen gösterilmesi gerekir. Bu durumda bitki infeksiyon yöntemi ile *Rhizobium* sayımında, materyaldeki çeşitli *Rhizobium* türlerinin toplam sayısı değil, sadece kullanılan baklagil bitkisinde nodülasyon oluşturan bir tek *Rhizobium* türü sayılır.

Bu amaçla 100 gr inokülant tartılıp, 900 ml su içine alınır, 5-10 dakika kadar karıştırılıp,  $10^{-10}$ 'a kadar dilüsyonu yapılır. Diğer yandan her dilüsyon için 4 ayrı Leonard kavanozu, Pouch (zarf) veya tüp hazırlanır. Bunların içine, daha önce yüzey sterilizasyonu yapıp steril koşullarda çimlendirilmiş baklagil tohumlarından ekilir. Genellikle Leonard kavanozuna 3'er, Pouch'a 2'şer ve tüplere 1'er adet tohum ekilir. Dilüsyonu yapılan kültür çözeltilisinden tohum yuvalarına 1'er ml ilave edilip nodül oluşumu için beklenir (her Leonard kavanozuna 3'er tohum ekildi ise her tohum yuvası için 1 ml hesabı ile kavanozlara 3 ml ilave edilmelidir). 3. haftadan itibaren nodül oluşumu kontrol edilir. Ekimi yapılan tohum sayısı ve oluşan nodül sayısına bakılmaksızın, Leonard kavanozları (+) ya da (-) olarak değerlendirilir. Değerlendirmede toplam (+) sonuç veren kavanoz sayısı önemlidir.

Aşağıda çizelgede bitki infeksiyonu yöntemi ile yapılmış bir denemenin sonuçları verilmiştir.

Dilüsyon	Tekerrürlerdeki Nodülasyon				Nodülasyon Görülen toplam bitki sayısı
$10^{-1}$	+	+	+	+	4
$10^{-2}$	+	+	+	+	4
$10^{-3}$	+	+	+	+	4
$10^{-4}$	+	-	+	+	3
$10^{-5}$	-	-	+	+	2
$10^{-6}$	+	-	-	-	1
$10^{-7}$	-	-	+	-	1
$10^{-8}$	+	-	-	-	1
$10^{-9}$	-	-	-	-	0
$10^{-10}$	-	-	-	-	0
T o p l a m					20

<sup>1</sup> "[Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri](#); 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara" adlı kitaptan derlenmiştir.

Yukarıdaki örneğe göre hesaplanmış olan toplam (+) bitki sayısına göre *Rhizobium* sayısı aşağıdaki tablodan hesaplanır.

Ardışık 10 dilüsyondan (Standart 1:9 oranında dilüsyon) 4'er bitkiye yapılan inokülasyon sonrası nodülasyon görülen (+) toplam bitki sayısına göre en muhtemel *Rhizobium* sayısı.

Toplam (+) Bitki Sayısı	EMS	Toplam (+) Bitki Sayısı	EMS
40	$>7,0 \times 10^8$	20	$1,7 \times 10^4$
39	$7,0 \times 10^8$	19	$1,0 \times 10^4$
38	$6,9 \times 10^8$	18	$5,8 \times 10^3$
37	$3,4 \times 10^8$	17	$3,1 \times 10^3$
36	$1,8 \times 10^8$	16	$1,7 \times 10^3$
35	$1,0 \times 10^3$	15	$1,0 \times 10^3$
34	$5,9 \times 10^7$	14	$5,8 \times 10^2$
33	$3,1 \times 10^7$	13	$3,1 \times 10^2$
32	$1,7 \times 10^7$	12	$1,7 \times 10^2$
31	$1,0 \times 10^7$	11	$1,0 \times 10^2$
30	$5,8 \times 10^6$	10	$5,8 \times 10^1$
29	$3,1 \times 10^6$	9	$3,1 \times 10^1$
28	$1,7 \times 10^6$	8	$1,7 \times 10^1$
27	$1,0 \times 10^6$	7	$1,0 \times 10^1$
26	$5,8 \times 10^5$	6	5,8
25	$3,1 \times 10^5$	5	3,1
24	$1,7 \times 10^5$	4	1,7
23	$1,0 \times 10^5$	3	1,0
22	$5,8 \times 10^4$	2	0,6
21	$3,1 \times 10^4$	1	$<0,6$

Yukarıda verilen örnekte toplam (+) bitki sayısı 20 olduğuna göre, çizelgede 20 rakamının karşısına gelen  $1,7 \times 10^4$  değeri aşağıdaki formülde yerine konularak 1 g inokülanıtta bulunan *Rhizobium* sayısı tahmin edilir.

1 g inokülanıtta bulunan *Rhizobium* sayısı (EMS) =  $(m \times d) / V$  formülü ile hesaplanır,

Burada;

m = Çizelgeden bulunan değer

d = En düşük dilüsyon, yani aşılama kullanılan birinci dilüsyon faktörü

V = Her tohum için inoküle edilen hacim (ml).

Buna göre, yukarıda verilen örnek için 1 g pitte bulunan en muhtemel *Rhizobium* sayısı  $1,7 \times 10^5$  adettir.

Çizelgede görülen değerler ardışık 1:9 oranında yapılmış 10 dilüsyondan 4 'er kavanoza ekim (4 paralelli ekim) içindir. Standart EMS tablolarında olduğu gibi, bitki infeksiyonu yöntemi için de farklı dilüsyon oranları ve sayıları ile farklı paralel ekimler yapılması durumunda da kullanılabilir tablolardan hazırlanmıştır.

Bitki infeksiyonu yöntemi ile *Rhizobium* sayımında yukarıda açıklanan tekniğin modifiye edilmiş şekilleri de bulunmaktadır. Standart yöntem alternatif olarak en yaygın kullanılan bir başka yöntemde ardışık 4 dilüsyondan 3 paralelli nodülasyon denemesi yapılır. Bu yöntemde, en son (en düşük) dilüsyondan aşılama yapılan 3 kavanozda 3 (+) değer elde edilemeyecek şekilde

dilüsyonlar seçilmelidir. Çizelgede bu deneme planı için nodülasyon sayısına karşı gelen EMS değerleri verilmiştir.

Ardışık dilüsyonlarda (+) bitki sayısı				Toplam pozitif bitki sayısı	EMS
$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$		
3	3	3	3	12	>2300,0
3	3	3	2	11	919,0
3	3	3	1	10	424,0
3	3	3	0	9	230,0
3	3	2	1	9	147,0
3	3	2	0	8	91,8
3	2	1	0	7	42,4
3	3	0	0	6	23,0
3	2	1	0	6	14,7
3	2	0	0	5	9,2
3	1	0	0	4	4,2
3	0	0	0	3	2,3
2	1	0	0	3	1,5
2	0	0	0	2	0,9
1	0	0	0	1	0,4

Bu çizelgede de değerler en küçük dilüsyon için verilmiştir.  $10^0$ , ekim yapılan materyalin kendisidir. Sayım sırasında kullanılan dilüsyonların en küçüğü, dilüsyon faktörü olarak kullanılır.

Örnek

$10^{-6}$  dilüsyonda 3,  $10^{-7}$  dilüsyonda 3,  $10^{-8}$  dilüsyonda 2 ve  $10^{-9}$  dilüsyonda 1 adet bitkide nodülasyon oluşmuştur. Materyaldeki *Rhizobium* sayısı nedir?

Çözüm: 3 3 2 1 kodunun karşı geldiği değer çizelgeden 147 olarak bulunur. Buna göre, materyaldeki *Rhizobium* sayısı en muhtemel olarak  $147 \times 10^6 = 1,5 \times 10^8$ /g'dır.