

## RHİZOBİUM'LARDA ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ MUTANTLARIN ÖNEMİ VE EKOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILMASI

### THE IMPORTANCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT MUTANTS OF RHIZOBIA AND THEIR USE IN ECOLOGY

Kamuran AYHAN\*

**Özet:** Rhizobiumlarla ilgili olarak yapılan ekolojik çalışmaların hemen hemen pek çoğu suş tanısı üzerinedir. Marker teknikleri tam olarak 3 grupta toplanabilir. Bunlar a) serolojik farklılıklara dayandırılanlar, b) genetik markerlar ve c) diğer doğal markerlardır. Bu makalede, genetik olarak markalanmış Rhizobium suşları ve ekolojideki kullanımları tartışılacaktır.

**Summary:** Almost all aspects of research into the ecology of Rhizobia rests on the recognition of the strains. Marker techniques can be conveniently grouped into the three categories (a) those based on serological differences, (b) genetic markers, and (c) other natural markers.

In this article, the genetically marked strains of Rhizobia and their use in the ecology will be discussed.

### GİRİŞ

Rhizobiumlarla ilgili ekolojik çalışmaların önemli bir kısmını suşların tanımlanması ile ilgili olan araştırmalar oluşturmaktadır.

Özellikle tarla denemelerinde nodül oluşumundaki başarının ve toprak ile rizosfer bölgesinde rekabet eden suşların belirlenmesi ve bunların birbirleri arasındaki rekabetlerin açığa çıkarılması için toprakta bulunan doğal suşlardan, inokulanttan gelen suşun ayırdedilmesi gerekir. Bu gibi çalışmalarda nodül oluşturan etkin suşlar, en basit nodülün görüntüsüyle belirlenebilir. Efektif olmayan suşlar içleri beyaz veya yeşil renkli ve küçük nodül oluştururken, efektif suşlar pembe, kırmızı ve kahverengi nodül meydana getirirler (1).

Yüzey sterilizasyonu uygulanmış nodüllerden izole edilen suşların koloni görünüşündeki farklılık suş ayırımında diğer bir yararlı ve geçerli yöntemdir (2, 3).

\* Dr., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, Tarım Biyoteknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

Vincent (1) tarafından *Rhizobium* bakterilerinin kongo kormuzunu absorbe etmedikleri ve absorpsiyonun bir kontaminasyon belirtisi olduğu ileri sürülmüşse de, Kneen ve La Rue (4) özellikle *R. leguminosarum* suşlarının farklı derecelerde boyayı absorbe ettiklerini, bu özelliğin *Rhizobium* bakterilerini diğerlerinden ayırtmada kullanılamayacağını, ancak suşlar için belirleyici bir marker olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

*Rhizobium*ların antimikrobiyal maddelere karşı toleranslarının farklı olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (5). Bu toleransın derecesinin *Rhizobium* suşları arasında farklı olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (6, 7, 8, 9, 10).

İyi karakterize edilmiş ve genetik olarak işaretlenmiş bakteri suşları mikrobiyolojik çalışmalar için vazgeçilmez organizmalardır. Bunlardan antibiyotiklere dirençli mutantlar direkt seleksiyon yöntemleriyle kolayca elde edilebilirler.

### ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİLİK GÖSTEREN MUTANT SUŞLARIN DİREKT SELEKSİYON YÖNTEMİYLE İZOLASYONLARI

Mutagenler kullanılarak antibiyotiklere dirençli mutant elde edilmesi *Rhizobium*ların simbiyotik ve saprofitik özelliklerini değiştireceğinden nodül oluşturması istenen antibiyotik rezistant mutant suşlar direkt seleksiyon yoluyla kazanılmaktadır (11). Bu amaçla elde edilecek mutant suç için, ata suşun  $10^8$  hücre içeren kültüründen 1 ml'lik kısmının antibiyotiğin çeşitli konsantrasyonlarını içeren petri kaplarındaki agar yüzeyine sürülmesi konsantrasyonu, ata suşun gelişimini etkin olarak önleyen konsantrasyondur. Antibiyotik ile işaretlenmiş mutant suşları seçici gelişme koşullarında gelişirken ata suş ancak seçici özellik taşımayan (antibiyotik içermeyen) koşullarda gelişme gösterebilecektir. Antibiyotiğe dirençli suşların identifikasyonunda bazı problemlerle karşılaşılmaktadır. Doğal olarak rifampisine hassas olan *B. japonicum* suşlarından  $10^7$  ile  $10^8$  sıklıkta rifampisine dirençli mutantlar elde edilebilmektedir. Bu suşlar 100 mg/ml rifampisin varlığında az bir gelişme gösterdikleri halde tamamen inhibisyonları için 250-500 mg/ml'lik bir rifampisin konsantrasyonuna gereksinim duyulmaktadır. *B. japonicum* bakterisinden elde edilen rifampisin rezistant mutantları doğal olarak oluşan rifampisin rezistanlık özelliğine göre ayırdedilemezler. Bununla beraber bu iki grubu *Rhizobitoksin* oluşturması özelliğine göre (fenotipik özellik) ayırtmak mümkün olur. Buna göre bir tek genetik marker kullanılması bir bakteri suşunun diğerlerinden ayrılmasında yeterli olmayabilir. Pozitif suş identifikasyonu için çoğu kez iki genetik marker yeterlidir. Buna karşın, gen

## ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ RHİZOBİA

transfer çalışmalarında iki suşu ayırdetmede birbirinden farklı en az beş genetik marker kullanılmaktadır.

Genetik olarak işaretli bakterilerin tanınmasında sıcaklık, pH ve kullanılabilir karbon kaynakları gibi çevre koşulları bu suşun fenotipik özellikleri üzerine etkili olduğundan önemlidir. Diğer bir problem ise biyotik faktörler denilen diğer mikroorganizmalardır. Bunun yanısıra diğer bir olumsuz faktör bakteriyel genetik konusundaki bilgilerin sınırlı olmasıdır (5).

Ekolojik çalışmalarda mutantların kullanılabilmesi için bir takım özelliklere sahip olması gerekir. Bu nedenle antibiyotiğe dirençli mutantların bu özelliklerinin stabil olması ve nodül oluşturma ve N<sub>2</sub>-fiksasyon yeteneklerini kaybetmemeleri gerektiği için suş ile mutantlar arasındaki benzerliklerin araştırılması ve özellikle de tarla koşullarındaki sürekliliğinin kontrolü son derece önemlidir (5, 12).

### ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİLİK GÖSTEREN RHİZOBİUM SUŞLARININ KULLANIM ALANLARI

Rhizobiumlardan izole edilen antibiyotiğe dirençli mutantlardan baklagillerdeki nodül oluşum fizyolojisinin açıklanmasında yararlanılmaktadır. Eğer antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantların, simbiyotik özellikleri değişmiyorsa, bunlar suş identifikasyon çalışmalarında kullanılabilirler. Buna karşın, bu mutantların simbiyotik özellikleri kayboluyorsa bunlardan sadece bakterinin biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerinin açıklanmasında yararlanabilir (13).

Rhizobium bakterilerinin baklagil bitkileri ile başarılı bir simbiyotik ilişkiyi oluşturabilmeleri için, a) Bakteri hücresi bitki köküne girerek nodül oluşturabilmeli (enfeksiyon), b) atmosferdeki azotu amonyak halinde fikse edebilmek için baklagil-bakteri interaksyonuna katılabilmelidir (efektiflik). Yapılan bir çalışmada, *R. leguminosarum*, *R. trifolii* ve *R. meliloti* suşlarından spontan olarak (direkt seleksiyonla) streptomisin sülfat, kloramfenikol, viomisin sülfat, polimiksin B sülfat, neomisin sülfat ve kanamisin sülfata dirençlilik gösteren mutant suşlar elde edilmiştir. Her 3 suştan izole edilen viomisin ve neomisine dirençli mutantların efektifliklerini kaybettikleri, buna karşın kloramfenikol, polimiksin ve kanamisine dirençli mutantlarda bunun çok seyrek olduğu, streptomisine dirençli mutantlarda ise görülmediği anlaşılmıştır. Yine bir diğer çalışmada *R. leguminosarum* ve *R. trifolii*'nin efektif suşlarından 15 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilik gösteren mutant suşlar izole edilmiş ve bunların nodül oluşturma yeteneklerini büyük ölçüde korudukları açıklanmıştır. Bu çalışmada da streptomisin, spiramisin, kloram-

fenikol ve tetrasikline dirençli olan mutant suşların çok az veya hiç değişikliğe uğramadıkları, d-sikloserin, novobiosin, vankomisin ve basitrasine dirençli mutantların yarısının efektifliklerini kısmen veya tamamen kaybettikleri, viomisin ve neomisine dirençlilik gösteren mutantların ise efektifliklerini tamamen yitirdikleri saptanmıştır (7).

İlk kez DNA transformasyonu ile dirençliliğin transfer edilebildiğinin açıklanmasından beri (9) Rhizobiumların ekolojik ve genetik çalışmalarında en fazla kullanılan antibiyotik streptomisin olmuştur. Bu antibiyotiğin kullanılma nedeni, elde edilen mutant suşların stabil olması, yüksek düzeyde antibiyotiğe dirençlilik göstermeleri ve hem diğer antibiyotiklere çapraz rezistanslıklarının az olması, hem de simbiyotik yeteneklerde kayıpların ender olarak görülmesidir.

Yapılan bir çalışmada R. japonicum 122 suşundan 39 adet, 138 no'lu suşdan ise 53 adet streptomisine dirençli toplam 92 mutant suş izole edilmiştir. Bunların içinden 10.000 µg/ml streptomisin konsantrasyonuna dirençli 3 mutant suşun 25.000 ve 50.000 µg/ml streptomisin konsantrasyonundaki gelişme yetenekleri araştırılmış ve bu suşlardan ikisinin 25.000 µg/ml'de gelişebildikleri, buna karşın hiçbirinin 50.000 µg/ml'de gelişemedikleri saptanmıştır. Elde edilen mutant suşların sera koşullarındaki testleri sonucunda simbiyotik özelliklerinde herhangi bir kayıp olmadığı anlaşılmıştır (14). Yavaş ve hızlı gelişen Lotus grubu Rhizobium bakterilerinden 16 farklı antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlarla yapılan denemelerde protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden streptomisin, spektinomisin, kloramfenikol ve tetrasiklinden elde edilen suşların efektifliklerinin çok az veya hiç değişmediğini, buna karşın nükleik asit sentezini inhibe eden d-sikloserin, novobiosin ve penisilinden elde edilen mutant suşların efektiflerini % 20-100 arasında kaybettikleri belirlenmiştir. Diğer yandan viomisin, neomisin, kanamisin ve vibromisinden hızlı gelişen suşlar ile elde edilen mutantların efektifliklerini tamamen kaybettiklerini, buna karşın yavaş gelişen suşlardan elde edilen mutantların ise kaybetmedikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, Rhizobiumların antibiyotik rezistant mutantların simbiyotik efektiflikleri üzerine hem bakteri ve hem de bitki özelliklerinin etkili olduğunu göstermektedir.

Antibiyotik rezistant mutant suşlardan efektif ve inefektif suşların rekabet güçlerini ölçmede yararlanılabilmektedir. R. melilotinin efektif ve inefektif suşlarının nodül oluşturmada bir öncelikleri olmadığı bu suşların antibiyotiğe dirençli mutantlarıyla kıyaslanarak sera denemeleri ile gösterilmiştir (15).

## ANTİBİYOTİĞE DİRENÇLİ RHİZOBİA

Yapılan bir çalışmada, *R. leguminosarum* suşunun 13 adet ve *R. japonicum* suşunun 3 adet çift antibiyotikle markalanmış suşlarının azot fiksasyon etkinliği ve rekabet yetenekleri araştırılmıştır. Buna göre, elde edilen mutantların nodül oluşturma yeteneklerinin ata suşlara göre % 93 daha az olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *R. leguminosarum* suşlarının azot fiksasyon etkinliği sadece % 38 oranında azalmıştır. *R. leguminosarum* suşlarının üreme süreleri de uzamış, ancak üreme hızı ile nodülasyon rekabeti arasında bir korelasyon bulunamamıştır (16).

Rifampin antibiyotiği kullanılarak çeşitli *Rhizobium*ların işaretlendiği ve ekolojik çalışmalarda kullanıldığı bilinmektedir. Bir çalışmada, *R. meliloti*'nin rifampin antibiyotiğine dirençlilik gösteren mutantlarının nodülasyon ve N<sub>2</sub>-fiksasyon özellikleri araştırılmış ve sonuçta bazı baklagillerde inefektif nodül oluşumuna neden olduğu ve hatta nodül oluşturma rekabetini önemli ölçüde kaybettirdiği bulunmuştur. Bu nedenle *R. meliloti*'deki rifampin dirençliliğinin ekolojik çalışmalarda kullanılmayacağı ortaya konulmuştur (17, 18).

Direkt seleksiyon yoluyla elde edilen mutant suşlar doğal populasyondan inokulumda kullanılan suşların geri izolasyonunda kullanıldığı pek çok araştırma vardır (19, 20). Yine bu tip mutant suşlar yardımıyla yapılan bir çalışmada topraktaki yaşama ve canlı kalma süresi araştırılmış ve bu suşların toprakta daha uzun süre yaşayabildikleri ve nodül yapma yeteneklerini kaybetmedikleri anlaşılmıştır (21).

Ticari inokulant üretiminde sterilize olmayan pit kullanıldığında kontaminant bakterilerinin, üretiminin fermantasyon aşamasında büyük bir problem olduğu bilinmektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada 1000 ppm bavistin ve 65 ppm streptomisin ilavesiyle kontaminant bakterilerinin baskılanabildiği ileri sürülmüştür (22).

Sonuç olarak, antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların spontan mutasyon yoluyla izolasyon ve identifikasyonları basit ve direktir. İzolasyon aşamasında kullanılan kültürün saflığı ve iyi bir kültür ortamının varlığı önem taşımaktadır. Genetik olarak markalanmış ve iyi karakterize edilmiş bakteri suşlarının ekolojik çalışmalardaki yararı tartışılmazdır.

### KAYNAKLAR

1. Vincent JM: A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. p. 277 IBP Handbook No: 15, 1970, 7 Marylebone Road, London NW.
2. Kuykendall LD, Elkan GH: *Rhizobium* Derivatives. Differing in Nitrogen-Fixing Efficiency and Carbohydrate Utilization. *Appl Env Micr*, 32 (4): 511-519, 1976.
3. Stowers MD, Eagesham ARJ: Physiological and Symbiotic Characteristics of Fast-Growing *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, 77: 3-14, 1984.

4. Kneen BE, LaRue TA: Congo Red Absorbtion by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Env Micr*, 45: 340, 1983.
5. Eeglesham ARJ: The Use of Antibiotic Resistance for *Rhizobium* Study. p. 440 *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, 1987 Marcel Dekker Inc. New York.
6. Davis RJ: Resistance of *Rhizobia* to Antimicrobial Agents. *J Bacteriol*, 84: 187-188, 1962.
7. Schwinghamer EA: Association Between Antibiotic Resistance and Ineffectiveness in Mutants Strains of *Rhizobium* spp. *Can J Microbiol*, 10: 221-233, 1964.
8. Schwinghamer EA: Effectiveness of *Rhizobium* as Modified by Mutation for Resistance to Antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 33: 121-1376, 1967.
9. Schwinghamer EA, Dudman WF: Evaluation of Spectinomycin Resistance as a Marker for Ecological Studies with *Rhizobium* spp. *J Appl Bact*, 36: 263-272, 1973.
10. Cole MA, Elkan GH: Multiple Antibiotic Resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl Env Micr*, 37 (5): 867-870, 1979.
11. Çakmakçı ML: Biyolojik Azot Tespiti ve Ekolojik Araştırma Yöntemleri. s. 57, Tübitak-Tarmik Ünitesi Yayın No: 2, 1987.
12. Bushby HVA: Direct Quantitative Recovery of *Rhizobium* From Soil and Rhizosphere. p. 288 *Nitrogen Fixation in Legumes*, 1982 Academic Press, Avustralya.
13. Pankhurst CE: Symbiotic Effectiveness of Antibiotic-Resistant Mutants of Fast and Slow - Growing Strains of *Rhizobium* Nodulating Lotus Species. *Can J Microbiol*, 23: 1026-1033, 1977.
14. Gollobin GS, Levin RA: Streptomycin Resistance in *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol*, 101: 83-90, 1974.
15. Amarger N: Competition For Nodule Formation Between Effective and Ineffective Strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol Biochem*, 13: 475-480, 1981.
16. Turco RF, Moorman TB, Bezdicek DF: Effectiveness and Competitiveness of Spontaneous Antibiotic-Resistant Mutants of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol Biochem*, 18 (3): 259-262, 1986.
17. Lewis DM, Bromfield ESP, Barran LR: Rifampin Resistance and Nodulating Competitiveness in *Rhizobium meliloti*. p. 338 *Vermo DPS, Brisson N (eds) Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1987 (a) Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
18. Lewis DM, Bromfield ESP, Barran LR: Effect of Rifampin Resistance on Nodulating Competitiveness of *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol*, 33: 343-345, 1987 (b).
19. Beynon JL, Josey DP: Demonstration of Heterogenity in a Natural Population of *Rhizobium phaseoli* Using Variation in Intrinsic Antibiotic Resistance. *J Gen Micr*, 148: 437-442, 1980.
20. Kremer RJ, Peterson HL: Nodulation Efficiency of Legume. Inoculation as Determined by Intrinsic Antibiotic Resistance. *Appl Env Micr*, 43 (3): 636-642, 1982.
21. Kuykendall LD: Influence of Glycine Max. Nodulation on Persistence in Soil of a Genetically Marked *Bradyrhizobium japonicum* Strain. *Plant and Soil*, 116: 275-277, 1989.
22. Jauhri KS, Gupta M: Antimicrobial Agents to Suppress Contaminants in Carrier - Based *Rhizobial* Inoculants. *Zentralbl Mikrobiol*, 144 (5): 331-335, 1989.