

## **Isolation and Characterisation of Some Bacteria and Microfungus Solving Tricalcium Phosphate**

Mehmet Nuri AYDOĞAN <sup>\*,1</sup>, Ömer Faruk ALGUR<sup>1</sup>,  
Mustafa ÖZDEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240 Erzurum*

### **ABSTRACT**

In this study some plants species roots and rhizospher soils were collected from different habitats have different temperature, pH, salinity properties etc. From these samples were prepared root extracts and soil dilutions. After that it was inoculated to general mediums (Nutrient agar, Potato dextrose agar) prepared for bacteria and microfungi. After the incubation, 300 bacteria species and 34 microfungi species were isolated and purified from these samples. The ability of inorganic phosphate solubilisation bacteria and microfungy were tested using an effective and rapid method (NBRIP-BPB selective medium) quantitively. 24 bacteria and 6 microfungi species were determined and identified having ability of solubilization of tricalcium phosphate effectively.

**Keywords:** Inorganic phosphate, Phosphate solubilizing microorganisms, phosphate solubilization

### **Trikalsiyum Fosfat Çözöbilen Bazı Bakteri ve Mikrofungusların İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

### **ÖZET**

Bu çalışmada; sıcaklık, pH, tuzluluk vb. özellikler bakımından farklılık gösteren habitatlardan çeşitli bitkilere ait kök örnekleri ve rizosfer toprakları toplandı. Toprak dilüsyonları ve kök özütlerinden, bakteri ve mikrofunguslar için önerilen genel besi yerlerine ekim yapıldı. İnkübasyon sonunda 300 bakteri ve 34 mikrofungus türü izole edilerek saflaştırıldı. Hızlı ve etkin bir yöntem olarak önerilen NBRIP-BPB selektif besiyerleri kullanılarak, 24 bakteri ve 6 mikrofungus türünün, trikalsiyum fosfat çözünürlüğünde etkili oldukları kalitatif olarak belirlendi ve bu türlerin tanıları yapıldı.

**Anahtar kelimeler:** İnorganik fosfat, fosfat çözücü mikroorganizmalar, fosfat çözünürlüğü

\*Corresponding Author/ Yazışmalardan Sorumlu Yazar: Mehmet Nuri AYDOĞAN  
Adres: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240 Erzurum  
e-mail: mnaydogan@hotmail.com

## GİRİŞ

Fosfor, biyolojik büyüme ve gelişme için en önemli makro elementlerden birisidir (Reddy et al., 2002). Bütün canlılarda hücre zarlarının temel yapı elemanı olan fosfolipidlerin önemli bir bileşeni olan fosfor, aynı zamanda hücredeki en önemli makromoleküller olan DNA ve RNA'nın da temel yapı elemanlarından birisidir. Ayrıca canlıların kullandıkları enerji çeşidi olan ATP molekülünde de birbirlerine yüksek enerji bağlarıyla bağlanan üç adet fosfat grubu bulunur. Hayatın devamı için temel fizyolojik olaylar olan fotosentez ve solunum reaksiyonlarında önemli rol oynayan NAD ve FAD koenzimlerinde de fosfor önemli bir yapı taşıdır (Kadioğlu, 1998).

Toprakta çözülmüş olarak bulunan fosfat konsantrasyonu genellikle çok düşük olup 1 ppm veya daha azdır. Fosfatın birkaç şekli bitki kök hücreleri tarafından alınmakla beraber, en çok absorbe edilebilenler  $HPO_4^{2-}$  veya  $H_2PO_4^-$  formlarıdır (Beever and Burns,1980). Jeolojik devirlerde oluşan ve dünyanın çeşitli bölgelerinde bulunan fosfat içerikli kayaların yapısında; kalsiyum apatit, oksijen apatit ve hidroksi apatit gibi mineral fosfat bileşikleri bulunmaktadır. Bu bileşikler, topraktaki mineral fosfatın esas kaynağı olduğu gibi, tarımsal gübre üretiminde de en bol ve ucuz materyal olarak kullanılırlar (Rodriguez and Fraga, 1999; Halder et al.,1990). Apatitlerin dışında topraktaki mangan fosfat, demir fosfat ve alüminyum fosfat formları da az çözünen fosfat bileşikleridir (Kadioğlu, 1998; Rodriguez and Fraga, 1999). Ayrıca tarım topraklarında düzenli olarak uygulanmakta olan fosfatlı gübreler de önemli bir rezerv oluşturmaktadır. Ancak bu kimyasal gübreler uygulamadan kısa bir süre sonra toprak moleküllerine bağlanarak veya çökerek bitkiler için elverişsiz ve çevre için zararlı hale gelirler (Kadioğlu,1998). Bağlanma veya çökme, daha çok toprak tipine ve pH'ya bağlıdır. Asidik topraklarda fosfor, serbest oksitlerle veya demir ve alüminyum hidroksitlerle bağlanırken, alkali topraklarda kalsiyumla bağlanarak çökler ve çözünürlüğü oldukça azalır (Goldstein, 1986; Jones et al., 1991).

Birçok mikroorganizmanın, kaya yüzeyleri ve mineral formdaki metalleri parçalayıp ayrıştırdıkları ve çözünebilir hale getirdikleri bilinmektedir. Aynı şekilde çözünmeyen inorganik fosfat yataklarının yani kaya fosfatının da mikroorganizmalar tarafından çözünebilir hale getirildiği yıllardan beri bilinmektedir. Kaya fosfatının çözünürlüğünde; trikarboksilik asit, glukonik asit, 2- ketoglukonik asit, laktik asit, izobütirik asit, izovalerik asit ve asetik asit gibi mikrobiyal orijinli organik asitler etkili olmaktadır. Ayrıca glikolik, oksalik, malonik ve süksinik asit gibi fosfat çözücü organik asitler de belirlenmiştir (Massimiliano et al.,1999; Rodriguez and Fraga, 1999; Illmer and Schinner, 1992; Goldstein, 1993; Halder and Chakrabarty, 1993; Banik and Dey, 1982; Bosecker, 1997). Yukarıda sıralanan organik asitler içerisinde özellikle trikarboksilik asit'in fosfat çözücülüğünde daha etkili olduğu toprak ve fermantasyon şartlarında gösterilmiştir (Kucey et al., 1987; Asea et al., 1988; Nahas, 1996). Ayrıca *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Burkholderia* gibi bakteri cinslerine ait türlerin, inorganik fosfat çözünürlüğünü, en çok glukonik asit salgılayarak gerçekleştirdikleri rapor edilmektedir (Rodriguez and Fraga,1999; Illmer and Schinner,1992; Goldstein, 1993;).

Kaya fosfatı, trikalsiyum fosfat, dikalsiyum fosfat ve hidroksi apatitler gibi çözünmez inorganik fosfat bileşiklerini ayrıştırabilen birçok bakteri türü bulunmaktadır (Goldstein, 1986). Özellikle *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter* ve *Flavobacterium* gibi cinslere ait türler en yaygın olanlardır. Bunların önemli bir kısmı toprakta bitki kök bölgesinde yani rizosferde toplanmaktadır. Bitki büyümesindeki faydalı etkilerinden dolayı bunlara "Plant growth promoting rhizobacteria" (bitki büyümesini

teşvik eden bakteriler) denilmektedir. Söz konusu yararlı etkilerinden dolayı bu bakterilerin bir kısmı günümüzde birçok ülkede biyogübre olarak kullanılmakta ve dolayısıyla bu konuda tarımsal amaçlı birçok araştırma yapılmaktadır (Rodriguez and Fraga,1999; Kloepper and Schroth, 1978; Glick, 1995).

Toprakta birçok fosfat çözücü bakteri olmasına rağmen, bunların sayısı genellikle rizosferde yaygın olarak bulunan diğer bakterilerle rekabet edecek yeterlilikte değildir. Bu nedenle bitkiler için gerekli miktarda fosfat çözünürlüğü gerçekleşmez ve esaslı bir büyüme sağlanamaz. Yeterli miktarda fosfat çözünürlüğünün sağlanması ve bitkisel verimin artırılması için bitkilerin, uygun mikroorganizmalarla toprakta bulunduğundan daha yüksek yoğunlukta inoküle edilmesi önemli avantaj sağlayacaktır. Bu konuda yapılan birçok araştırmada; inorganik veya organik fosfat çözebilen bakterilerin toprağa veya bitki tohumlarına inokülasyonu ile bitki büyümesinin teşvik edildiği rapor edilmiştir (Rodriguez and Fraga, 1999; Kloepper et al., 1988; Gaur and Ostwal, 1972; Subba, 1982; Kucey et al., 1989). Ayrıca bu mikroorganizmaların fosfat çözücü rollerinin yanı sıra, oluşturdukları bitki hormonları, antibiyotikler, sideroforezler (siderophores) gibi faydalı metabolitler ile de büyümede spesifik bir rol oynadıkları belirlenmiştir (Kloepper et al., 1989). Bazı araştırmacılar da fosfat çözücü ve azot fikse edici bakterileri birlikte inoküle ettiklerinde, hedef bitkinin daha fazla miktarda azot ve fosfat bağladığını ve ürün veriminin ayrı ayrı inokülasyonlara oranla çok daha arttığını belirlemişlerdir (Kundu and Gaur, 1984; Alagawadi and Gaur, 1992; Belimov et al., 1995). Diğer taraftan bazı fosfat çözücü bakterilerin de, bitki kök dokularında simbiyotik yaşayan mikorizalar ile etkileşime girdikleri ve kök çevresindeki toprakta, serbest hale getirdikleri fosfat iyonları ile diğer besin elementlerini mikorizalara ileterek bir köprü rolü oynadıkları belirlenmiştir. Bu suretle daha fazla besin elementi alan bitkinin büyüme ve gelişmesi de pozitif olarak etkilenmektedir (Ray et al., 1981; Piccini and Azcon, 1987). Toro et al. (1997) radyoaktif işaretli fosfat ( $P^{32}$ ) kullanarak mikorizalar ile birlikte bulunan fosfat çözücü bakterilerin azot ve fosfat minerallerini, bitki dokularında biriktirdiklerini belirlemişlerdir. Sonuç olarak günümüzde, fosfat çözücü ve azot bağlayıcı bakterilerin karışık kültürlerinden oluşan "Phylazonit-M" , "Kyusei EM" gibi ticari biyogübreler çeşitli ülkelerde üretilip kullanılmaktadır (Rodriguez and Fraga, 1999).

Bakterilerde olduğu gibi bazı toprak mikrofunguslarının trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğünde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Yapılan bazı araştırmalarda "Heterotropik fungi" olarak tanımlanan *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin en iyi fosfat çözücü mikrofunguslar olduğu rapor edilmiştir. Mikrofungusların da inorganik fosfat çözünürlüğünü, sentezledikleri çeşitli organik asitler aracılığıyla gerçekleştirdikleri belirlenmiştir (Massimiliano et al., 1999; Kucey et al., 1989).

## MATERYAL VE METOD

### Materyal

Trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğünde etkili olan bakteri ve mikrofungusların izolasyonu için, Erzurum il merkezi, Tortum, Uzundere ilçe merkezleri ve çevre köylerinden toprak örnekleri ve çeşitli bitkilerin kök materyalleri (toprağı ile birlikte) toplandı. Bu örneklerin; yükseklik, sıcaklık, tuzluluk, nem ve pH gibi parametreler açısından benzerlik göstermeyen farklı habitatlardan alınmasına özen gösterildi (Johri, J.K. et al., 1999; Nautiyal, C.S., et al., 2000) . Ayrıca farklı bölgelerden kanalizasyon, dere, nehir, göl vb. çeşitli su örnekleri alındı. Steril plastik poşetler içerisinde laboratuara taşınan örnekler, kültüre alınmak üzere 1-2 gün süreyle +4 °C'de muhafaza edildi (Nahas, 1996).

İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinde bakteriler için; nutrient agar, *Pseudomonas* izolasyon agar, Trypton-glucos-yeast extract (TGY) agar; mikrofunguslar için de patates dekstroz agar ve Czapek agar gibi genel besi yerleri kullanıldı.

## Metod

### Bakterilerin izolasyonu ve saflaştırılmaları

Daha önce araziden alınan toprak ve su örnekleri iyice karıştırılıp homojenize edildikten sonra her birinden, %0.9' luk steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ 'lük seri dilüsyonlar hazırlandı. Bitki kökleri de çeşme suyu ile iyice yıkanarak üzerlerindeki çamur ve toprak partikülleri uzaklaştırıldı. Son kez steril FTS ile yıkandıktan sonra havanda bir miktar FTS içerisinde iyice ezilerek homojenize edildi ve seri dilüsyonları hazırlandı (Mehta and Nautiyal, 2000). Bu örneklerin her birinden, daha önce hazırlanan petrilere, çizgi ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Petriler  $30^{\circ}\text{C}$ ' de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gelişen çok sayıda bakteri kolonileri, belirgin morfolojik karakterlerine göre, ayrı ayrı AT besi yeri; [ Glikoz, 10.0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10.9 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.011 g/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.002 g/L ] içeren petri plaklarına transfer edilmek suretiyle saflaştırıldı (Mehta and Nautiyal, 2000). Bu saf kültürlerin her birisine ayrı bir kod numarası verildi. Daha sonra teşhis edilmek üzere de her saf kültürün, aynı kod numarasıyla, stok kültürleri (Eppendorf tüpleri ve Yatık agarda) hazırlanarak  $-22^{\circ}\text{C}$  ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

### Mikrofungusların izolasyonu ve saflaştırılmaları

Mikrofungusların saflaştırılmaları için de Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Czape Dox Agar (CzA) gibi genel besi yerleri kullanıldı. Bu saf kültürlerin her birisine ayrı bir kod numarası verildi. Daha sonra teşhis edilmek üzere de her saf kültürün, aynı kod numarasıyla, stok kültürleri (Yatık agarda) hazırlanarak buzdolabında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de koruma altına alındı.

### Mikroorganizmaların trikalsiyum fosfat çözübilme etkinliklerinin kalitatif olarak belirlenmesi

AT besiyerinde ve patates dekstroz agarda gelişen saf bakteri ve mikrofungus kültürlerinin her birinden, içerisinde pH'sı otoklav öncesi 7'ye ayarlı 10 ml NBRIP-BPB (Brom fenol mavisi ilaveli National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [Glikoz, 10.0 g/L;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5 g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g/L;  $\text{KCl}$ , 0.2 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 g/L; BPB, 0.025 g/L] bulunan tüplere, 50 mikrolitre (yaklaşık  $1-2 \times 10^9$  cfu/ml) inokülasyon yapılarak, New Brunswick Scientific marka çalkalayıcıda,  $30^{\circ}\text{C}$ 'de ve 180 rpm'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra aşağıdaki fotoğraflarda da görüldüğü gibi kontrol grubu tüplerin (inokülüm yapılmamış tüpler) orijinal mavi renklerinde herhangi bir açılma olmadığı gözlenirken (Fotoğraf 1), inokülüm yapılan tüplerin (Fotoğraf. 2) bazılarında farklı derecelerde bir renk açılımı meydana gelmiş ve trikalsiyum fosfat ortamında üreyemeyenlerde ise kontrol grubunda olduğu gibi herhangi bir renk değişimi olmamıştır. Renginde açılma gözlenen sıvı kültürlerin her birisi 10.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi, Santrifüj işlemi sonucu ayrıştırılan süpernatantların, saf su ile 1/3 oranında seyreltildikten sonra Shimadzu marka, Model UV-1601, spektrofotometrede, 600 nm.de absorbans değerleri okunarak kaydedildi. Bu değerler aynı zamanda kültürlerdeki inorganik

fosfatın (trikalsiyum fosfat), mikrobiyal yolla çözünmesi beklenen miktarı için de kalitatif bir analiz olarak değerlendirildi (Mehta and Nautiyal, 2000).



**Fotoğraf 1.**

**Fotoğraf 2.**

### **Trikalsiyum fosfat çözünürlüğünde etkili olan mikroorganizmaların tanısı**

Trikalsiyum fosfat çözünürlüğünde etkili oldukları belirlenen bakterilerin tür teşhisleri MIS (Microbial Identification System) yöntemi ile yapıp biyokimyasal yöntemler ile de desteklenmiştir. MIS yönteminin esası; mikroorganizmaların yağ asitleri profiline göre tiplendirilmesidir. Buna göre teşhisi yapılacak olan saf bakteri kolonileri TSA (Trypticase soy agar) besiyerine tekniğine uygun olarak transfer edilerek 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerin her birisinden ayrı ayrı birer öze dolusu hücre, teflon kapaklı steril tüplere aktarıldı ve sırasıyla; hücre parçalama, metilleştirme, saflaştırma, bazik yıkama işlemleri ile bakterilerin, yağ asitleri metil esterlerinin serbest kalmaları sağlandı ve 2 ml'lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilerek ağızları sıkıca kapatıldı. Etiketlenen gaz kromatografi tüpleri, MIS cihazı üzerindeki yerlerine yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılıp örnekler tek tek analiz edilerek tanı sonuçları alınmıştır (Kotan 2002). Mikrofungusların ise koloni morfolojileri ve mikroskobik özellikleri incelenerek, Hasenekoğlu (1991)'e göre tanıları yapılmıştır. İzole edilen ve teşhisi yapılan saf kültürler, PDA besiyeri içeren yatık agarlara alınarak 25 °C'de bir haftalık inkübasyondan sonra +4 °C' de saklanmıştır.

### **ARAŞTIRMA BULGULARI**

Çeşitli habitatlardan alınan toprak ve su örnekleri ile bitki köklerinin ekstraksiyonundan, toplam 312 adet bakteri, 34 adet de mikrofungus türü izole edilmiştir. İzolatların her birisi içerisinde NBRIP-BPB sıvı besi yeri bulunan tüplere aşılınarak, trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğünde etkili olup olmadıkları test edilmiştir. İnkübasyon sonunda NBRIP-BPB içeren tüplerin mavi renginde açılma gözlenenler, santrifüj edilerek, spektrofotometrede 600 nm.'de absorbanlarına bakılmıştır. Tablo. 1.A ve 1.B'de görüldüğü gibi; 0.078 - 0.408 arasında absorbands veren 24 bakteri, 0.070 - 0.239 arasında absorbands veren 6 mikrofungus türünün, trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğünde etkili oldukları belirlenmiştir. 0.420 - 800 arasında absorbandsı kaydedilen ve önemsiz derecelerde etkili olan suşlar da, daha sonra değerlendirilmek üzere koruma altına alınmıştır.

Tablo 1A: NBRIP-BPB besi yerinde kültüre alınan bakteri suşlarının, trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğündeki etkinliklerinin, spektrofotometrik sonuçları.

Suş Kodu:	Tanımlanan türler ve absorbans değerleri (600 nm.'de)
KNTR.	KONTROL (1.100)
MRPSB1*	<i>Bacillus megaterium</i> (0.078)
MRPSB2	<i>Enterobacter agglomerans</i> (0.138)
MRPSB3	<i>Bacillus cereus</i> (0.225)
MRPSB4	<i>Pseudomonas putida</i> (0.229)
MRPSB5	<i>Aeromonas hydrophila</i> (0.243)
MRPSB6	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (0.247 )
MRPSB7	<i>Arthrobacter agilis</i> ( 0.258)
MRPSB8	<i>Serratia grimesii</i> (0.259)
MRPSB9	<i>Cedecea davisae</i> (0.261)
MRPSB10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (0.267)
MRPSB11	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (0.272)
MRPSB12	<i>Brewibacillus brevis</i> (0.295)
MRPSB13	<i>Vibrio furnissii</i> (0.303)
MRPSB14	<i>Photobacterium leiognathi</i> (0.325)
MRPSB 15	<i>Chromobacterium violaceum</i> (0.327)
MRPSB16	<i>Acinetobacter Iwoffii</i> (0.330)
MRPSB17	<i>Erwinia chrysanthemi</i> (0.356)
MRPSB18	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (0.357)
MRPSB19	<i>Aeromonas salmonicida</i> (0.366)
MRPSB20	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (0.385)
MRPSB21	<i>Serratia fonticola</i> (0.386)
MRPSB22	<i>Brewibacillus agri</i> (0.390)
MRPSB23	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (0.394)
MRPSB24	<i>Pseudomonas syringae</i> (0.408)

Tablo 1B: NBRIP-BPB besi yerinde kültüre alınan mikrofungus suşlarının, trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat) çözünürlüğündeki etkinliklerinin, spektrofotometrik sonuçları.

Suş Kodu:	Tanımlanan türler ve absorbans değerleri (600 nm.'de)
KNTR.	KONTROL (1.100)
MRPSF1*	<i>Gliocladium roseum</i> (0.070)
MRPSF2	<i>Penicillium jensenii</i> (0.185)
MRPSF3	<i>Aspergillus niger</i> (0.205)
MRPSF4	<i>Rhizopus oryzae</i> (0.210)
MRPSF5	<i>Mucor hiemalis</i> (0.218)
MRPSF6	<i>Trichoderma aureoviride</i> (0.239)

## TARTIŞMA

Araştırma sonuçlarına göre, çözünmez formdaki trikalsiyum fosfat (inorganik fosfat)'ın çözünmesinde, mikroorganizmaların; besi ortamındaki karbon kaynağından ürettikleri organik asit salgıları ve okso asitleri şelatlamaları etkili olmaktadır (Katznelson et al., 1962; Leyval and Barthelin, 1989; Yadav and Dadarwal, 1997). Buna göre brom fenol içeren  $Ca_3(PO_4)_2$  'lı seçici besi ortamında üreyebilen mikroorganizmalar,  $Ca_3(PO_4)_2$ 'ün çözünürlüğünü sağlayıp metabolizmalarında kullanırken, salgıladıkları organik asitlerle ortamın pH'sını da düşürmektedirler. Ortamda asiditenin artması aynı zamanda brom fenol mavisi ilaveli sıvı besi yerinin mavi renginde de açılma meydana getirmektedir. Renkteki açılmanın şiddeti ile mikroorganizmaların organik asit üretimi, çoğalmaları ve dolayısıyla inorganik fosfat çözünürlüğündeki etkinlikleri birbirleriyle doğru orantılıdır. Nitekim bu çalışmanın devamı olarak yapmış olduğumuz araştırmalarda; daha önce NBRIP-BPB ortamında inorganik fosfat içeren selektif besi yerlerinde kültüre alınan izolatların, 3 günlük inkübasyondan sonra pH'ları ölçüldüğünde; üreme görülen erlenlerde asiditenin arttığı ve buna bağlı olarak pH'nın oldukça düştüğü (2.96 - 5.27) ve çözünen inorganik fosfat miktarının da daha fazla olduğu kantitatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca PVK (Pikovskaya) medyum olarak tanımlanan metotla açık zon oluşturmayan bazı mikroorganizmaların, NBRIP-BPB sıvı besiyerinde kültüre alındıklarında, inorganik fosfat çözücülüğünde oldukça etkin oldukları belirlenmiştir (Nautiyal, 1999). Bu nedenle araştırmamızda, fosfat çözücü mikro organizmaların izolasyonu için, NBRIP-BPB sıvı besiyeri kullanımı tercih edilmiştir.

Sonuç olarak bakterilerden; *Bacillus megaterium*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter radioresistens*, *Arthrobacter agilis*, *Serratia grimesii*, *Cedecea davisae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Vibrio furnissii*, *Brewibacillus brevis*, *Photobacterium leiognathi*, *Chromobacterium violaceum*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Erwinia chrysanthemi* *Paenibacillus polymyxa* *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia fonticola*, *Brewibacillus agri*, *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas syringae* türlerinin, mikrofunguslardan ise; *Gliocladium roseum*, *Penicillium jensenii* *Aspergillus niger* *Rhizopus oryzae*, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma aureoviride* türlerinin trikalsiyum fosfat çözdükleri belirlenmiştir.

Bu mikroorganizmaların birçoğunun başta trikalsiyum fosfat olmak üzere çeşitli inorganik fosfat bileşiklerini ve muhtelif kaya fosfatlarını çözebildikleri daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Gyaneshwar et al., 2002; Vessey 2003). Ancak inorganik fosfat çözme yeteneklerinin ilk defa bu çalışmada belirlendiğini tahmin ettiğimiz bazı türlerin yanı sıra bütün suşların Erzurum ve çevresinden izole edilmiş olmasını önemli bir aşama olarak değerlendirmekteyiz. Zira ileride bu türlerle yapılacak tarla denemelerinde adaptasyon sorununun asgari seviyede olacağını ve daha verimli sonuçlar alınabileceğini öngörmekteyiz.

## SONUÇ

Bu çalışmada; trikalsiyum fosfatı (inorganik fosfat) etkili bir şekilde parçalayarak, bitkilerin kullanabileceği forma dönüştürebilen bazı bakteri ve mikrofungus türlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve tanıları yapılmıştır. Trikalsiyum fosfat (İnorganik fosfat) çözdüğü belirlenen ve teşhisleri yapılan 24 bakteri türü arasında en etkili izolatın *Bacillus megaterium* olduğu, mikrofunguslarda ise 6 izolatın inorganik fosfat çözme potansiyellerinin olduğu ve en etkili izolatın *Gliocladium roseum* olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki aşamalarda bu

mikroorganizmaların çeşitli monokotil ve dikotil kültür bitkilerinin tohumlarına inokülümü yapılarak saksı ve tarla şartlarında bitki büyüme ve gelişmesine etkileri araştırılacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde ihtiyaç duyulan makine, teçhizat ve çeşitli sarf malzemelerinin sağlanabilmesi için 2002-46 nolu proje ile mali destek sağlayan Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığına, Mikrofungusların tanılanmasında yardımcı olan Prof. Dr. İsmet Hasenekoğlu'na teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Alagawadi, A.R., Gaur, A.C. 1992, Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor*(L.) Moench] in dry Land, Tropical Agriculture, 69; 347-350.
- Algur, Ö.F., 1992, Temel Biyoteknoloji Ders Notları., s. 77-100 Erzurum.
- Asea, P.E.A., Kucey R.M.N., Stuart, J.W. 1998, Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil, Soil Biology and Biochemistry, 20: 459-464.
- Beever, R.E., Burns, DJV., 1986, Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi, Advances in Botanical Research, 8:127-219.
- Belimov, A.A., Kojemiakov A.P., Chuvarliyeva, C.V., 1995, Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate - solubilizing bacteria, Plant and Soil, 173:29-37
- Bosecker, K., 1997, Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 20: 591-604.
- Gaur, A.C., Ostwal, K.P. 1972, Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. Indian Journal of Experimental Biology, 10: 393-394.
- Glick, B.R. 1995, The enhancement of plant growth by free living bacteria, Canadian Journal of Microbiology, 41: 109-117.
- Goldstein, A.H., 1986, Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects, American Journal of Alternative Agriculture, 1:51-57.
- Goldstein, A.H., Rogers, R.D., Mead, G. 1993, Mining by microbe, Bioresource Technology, 11, 1250-1254.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S., 2002, Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil, 245: 83-93
- Haider, A.K., Mishra, A.K., Bhattacharyya, P., Chakrabartty, P.K., 1990, Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Journal of General Applied Microbiology, 36:81-92.
- Haider, A.K., Chakrabartty, P.K., 1993, Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. Folia Microbiologica, 38:325-330.
- Hasenekoğlu, İ., 1991, Toprak Mikrofungusları, 1-7 Cilt. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 689, Erzurum.
- Illmer, P., Schinner, F., 1992, Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil, Soil Biology and Biochemistry, 24: 389-395.
- Johri, J.K., Surange, S., Nautiyal, C.S., 1999, Occurrence of salt, pH and temperature – tolerant, phosphate - solubilizing bacteria in alkaline soils. Current Microbiology, 39: 89-93.
- Jones, D.A., Smith, B.F.L. Wilson, M.J., Goodman, B.A., 1991, Solubilizer fungi of phosphate in rise soil. Mycological Research, 95:1090-1093.



- Kadioğlu, A., 1998. Trabzon., Bitki Fizyolojisi., s. 82-83.
- Katznelson, H., Peterson, E., Rouatt, J.W., 1962, Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants, Canadian Journal of Botany, 40: 1181-1186.
- Kloepper, J.W., Scroth, M.N., 1978, Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de Pathologie vegetale et Phyto-bacteriologie, editor. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II. Tours: Gilbert- Clary, pp. 879-882.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, K., Schroth, M.N., 1988, *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas of Science, Animal and Plant Sciences, pp. 60-64.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, K., Zablutowicz, R.M., 1989, Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, 7: 39-43.
- Kotan, R., 2002, Doğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen patojenik ve saprofitik bakteriyel organizmaların klasik ve moleküler metotlar ile tanısı ve biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, sayfa, 57-60), Erzurum.
- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H., Leggett, M.E., 1989, Microbially mediated increases in plant-available phosphorus, Advances in Agronomy, 42:199-228.
- Kundu, B.S., Gaur, A.C., 1984, Rice response to inoculation with N<sub>2</sub> fixing and solubilizing microorganisms, Plant and Soil, 79:227-234.
- Leyval, C., Barhelin, J., 1989, Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg and Fe mobilization from mineral and plant growth. Plant and Soil, 17: 103-110.
- Massimiliano, F., Laura, S., Federico, F., Nikolay, V., 1999, Application of encapsulated *Penicillium variable* PI6 in solubilization of rock phosphate, Bioresource Technology, 73: 157-162.
- Mehta, S., Nautiyal, C.S., 2000, An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria, Current Microbiology, 43: 51-56.
- Nahas, E., 1996, Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 12:567-572.
- Nautiyal, C.S., 1999, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 170: 265-270.
- Nautiyal, C.S., Bhaduria, S., Kumar, P., Lai, H., Mondal, R., Verma, D., 2000, Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiology Letters, 182: 291-296.
- Piccini, D., Azcon R., 1987, Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular mycorrhizal (VAM) on the utilization of bayoran rock phosphate by alfalfa plants using a sand-vermiculite medium, Plant and Soil, 101:45-50.
- Ray, J., Bagyaraj, D.J., Manjunath, A., 1981, Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) and a phosphate dissolving bacteria on plant growth and 32 P uptake, Soil Biology and Biochemistry, 13:105-108.
- Reddy, M.S., Kumar, S., Babita, K., Reddy, M.S., 2002, Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*, Bioresource Technology, 84: 187-189.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, Biotechnology Advances, 17: 319-339.
- Toro, M., Azcon, R., Barea, J.M., 1997, Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate - solubilizing rhizobacteria to improve rock - phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling, Applied and Environmental Microbiology, 63:4408-4412.
- Vessey, J.K., 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, Plant and Soil 255:

571–586

Yadav, K.S., Dadarwal, K.R., 1997, Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: Dadarwal KR (ed) : Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production, Jodhpur, India: Scientific Publishers, pp 293-308.