

# Farklı Bakteri Uygulamalarının Kaya Fosfatının Çözünürlüğü Üzerine Etkisi

Adem Güneş<sup>1</sup>, Metin Turan<sup>2\*</sup>, Medine Güllüce<sup>3</sup>, Fikretin Şahin<sup>2</sup>, Mehmet Rüştü Karaman<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Erzurum

<sup>2</sup>Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul

<sup>3</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Erzurum

<sup>4</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Tokat

## Özet :

Bu çalışmada, iki farklı kaynaktan sağlanan fosfat kayasının çözünürlüğü üzerine *Azospirillum brasilense* SP-245, *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus megaterium* M3, *Raoultella terrigena*, *Burkholderia cepacia* BA-7 fosfor çözücü bakterilerin çözelti ortamındaki etkisi araştırılmıştır. Laboratuvar koşullarında yürütülen denemede uygulamaları takiben deneme süresince 3 örnekleme (10., 20. ve 30. gün) yapılarak, elektriksel iletkenlik (EC) ve pH değerleri ile suda çözünebilir kalsiyum ve fosfor miktarları ölçülmüştür. Bakteri uygulamaları her iki fosfor kaynağının kullanıldığı çözelti pH'sında azalışa neden olurken, elektriksel iletkenlik, fosfor ve Ca içeriğinde artışa neden olmuştur. En düşük pH değeri BA-7 uygulamasından elde edilirken, en yüksek P, Ca, çözünebilir tuz konsantrasyonu en yüksek asit ve alkalın fosfataz enzim aktivitesi ve organik asit salgılama kapasitesine sahip *B. megaterium* M3 uygulamasının 30. gün inkübasyonundan elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim aktivitesi, Fosfat kayası, fosfor çözünürlüğü,

## Effects of Different Bacteria Application on Solubility of Rock Phosphate

### Abstract

In the present study, the capacity of phosphate solubilizing bacterial strain, *Azospirillum brasilense* SP-245, *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus megaterium* M3, *Raoultella terrigena*, *Burkholderia cepacia* BA-7 have been tested solution culture containing two different rock phosphate sources. Experiment was carried out under laboratory conditions during experiment period 3 times sample was collected (10th, 20th, and 30th day). The phosphorus solubilizing bacteria inoculation decreased solution pH and increased electrical conductivity, and Ca and P concentrations in solution culture of both P source. While the largest pH decrease was found with *B. cepacia* BA-7, the highest EC values, Ca and P concentrations were found applications of *B. megaterium* M3 which has the highest acid-alkaline phosphatase enzyme activities and organic acid compound when compared to control during the 30th day of the experiment.

**Key Words:** Enzyme activity, Phosphate rock, phosphorus solubilization,

### GİRİŞ

Toprakta bitkiye yarayışlı fosfor konsantrasyonu genellikle çok düşük seviyelerde bulunması bitkiler tarafından ihtiyaç duyulan P miktarının tarım topraklarında düzenli olarak uygulanmasına, uygulanan fosfatlı gübrelerin ise toprakta bir rezerv oluşturmasına neden olmaktadır. Bu durumda ihtiyaç duyulan P'lu gübrenin giderek artan konsantrasyonlarda fazla düzeylerde uygulanması yerine, en önemli strateji var olan mevcut P rezervinin veya gübre olarak uygulanacak P'lu gübre kaynaklarının etkinliğinin artırılmasıdır (Goldstein, 1986; 1994).

Toprakta fosfor eksikliğinin giderilmesinde fosfor çözücü mikroorganizmaların kullanımı, sürdürülebilir tarım ve çevreye dost tarım sisteminde bitkinin fosfor alımına önemli derecede etki etmektedir (Narsian ve Patel, 2000; Turan vd., 2006, 2009, 2012a, b). Bitki gelişmesini teşvik eden bakterilerin (plant growth promoting rhizobacteria; PGPR) bitki gelişmesini üzerine etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, bu bakterilerin oksin, sitokinin, giberallin ve etilen gibi bitkisel hormonları üretebildiği (Çakmakçı vd., 2006), asimbiyotik olarak N fiksettiği (Şahin vd., 2004, Turan vd., 2012 b), bitki enzim

aktivitesini artırdığı (Çakmakçı vd., 2009; Turan vd., 2012a), mineral fosfatı ve demiri çözebildiği ve organik fosfat ve diğer besin elementlerini mineralize ettiği (Turan vd., 2012b); tuz stresinin bitki gelişmesi ve beslenmesi üzerine olan olumsuz etkilerini azalttığı (Yıldırım vd., 2008; Yıldırım vd., 2011a, b); vitamin üretimi, siderofor, antibiyotik, enzim ve fungusit bileşikler sentezleyerek veya rekabet gibi mekanizmalarla patojenlere karşı antagonistik etki gösterdiği (Kotan ve Şahin, 2002; Akgül ve Mirik, 2008) bilinmektedir.

Fosfor noksanlığı ya da fiksasyonu özellikle toprak pH'sı yüksek, CaCO<sub>3</sub> miktarınca zengin topraklarda görülmektedir. Bu topraklarda mevcut fosfor miktarının yeterli olması durumunda bile fosfor yarayışlılığının sınırlı olması ve kireç miktarındaki fazlalıktan dolayı fosfor elverişliliği azalmaktadır. Bu özelliklere sahip büyük toprak gruplarında fosfor yarayışlılığını ve fosfor fiksasyonunu azaltacak önlemlerin alınması ve buna bağlı olarak uygun gübre yönetiminin uygulanması gerekmektedir. Fosfor etkinliğini artırmak için bugüne kadar yapılan organik madde düzeyini artırıcı kültürel önlemler yanında, ahır gübresi, münavebe, gübre uygulamaları gibi (serpme, ocak usulü vs.) pek çok kültürel uygulamalar da yapılmaktadır. Ancak bu uygulamalar sonucunda arzu edilen etkinlik seviyelerine ulaşamamıştır. Bu nedenle özellikle son 15 yıldır kullanılan temel gübre parametrelerinden özellikle P etkinliğinin artırılması için farklı yaklaşımlar ortaya konmuştur. Bu yaklaşımlardan biriside kök rizosfer bölgesinde etkin olan bazı yararlı mikroorganizmaların biyolojik gübre olarak kullanımınıdır.

Türkiye'de en yaygın çalışılan bakteri grubu, azot fikse edici, fosfat çözücü ve bitkisel hormon üretici *Bacillus* cinsine ait türlerdir. *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *Bacillus* FS-3, *Bacillus* M3, *Bacillus* OSU-142, *B. amyloliquefaciens* ve *Bacillus* spp, gibi *Bacillus* ırkları ile yürütülen araştırmalarda (Güneş vd., 2009; Turan vd., 2012b), çeşitli bitkilerde bakteri uygulaması ile kontrole göre gelişme ve verimde önemli derecede artışlar sağlandığını belirtmişlerdir. Bitki ve topraklardan izole edilen bazı mikroorganizmalar, organik ve inorganik formda bulunan ortofosfatları çözme yeteneğine sahiptirler (Kucey vd., 1989). Bu fosfat çözücü mikroorganizmalar, hidroksi ve flor apatit içeren Ca-fosfat (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) ve kaya fosfatı ile Fe ve Al fosfatları kolaylıkla çözebilme yeteneğine sahiptirler. Bu kaynaklardan çözünen fosfor miktarı fosfor kaynağı ile mikroorganizma çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Tarımda biyogübrelerin kullanımının bitki gelişimine artırıcı etkisinin belirlenmesi üzerinde yapılan çalışmalarda, Eşitken vd., (2003, 2006) kayısı ve kiraz ağaçlarında, Orhan vd., (2006) ahududu bitkisinde, Pırlak vd., (2007) ile Karlıdağ vd., (2007) elma ağacında, Turan vd., (2007) domates bitkisinde, Güneş vd., (2009), çilek bitkisinde uygulanan biyogübrelerin verim ve verim parametreleri üzerine önemli derecede etki ederek büyük oranlarda artış sağladıklarını belirtilmişlerdir.

Fosfor kaynağı olarak kullanılan kimyasal gübrelerin bitkisel üretimde ürün artırıcı özellikleri bulunmasına rağmen, toprakların sürdürülebilir kullanımı üzerine oldukça olumsuz etkileri bulunmaktadır. Organik tarımın önemini arttırdığı günümüzde de, bu fosfat kayasının tarımda kullanımının gerekliliği ortaya konulmuştur. Toprağa uygulanan bu fosfat kaynaklarının çözünürlüklerinin düşük olması tarımda kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada, çözünürlüğü güç ve sınırlı olan fosfat kayasının organik tarımda fosforlu gübre kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi ve bu etkide biyogübrelerin önemini ortaya konulması hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Ülkemizde bulunan farklı fosfat kaynaklarının mikrobiyal gübrelemeye bağlı olarak çözünürlüklerinin değerlendirilmesi amacıyla, Mardin-Mazıdağı (300 milyon ton rezerv, pH 8,30, EC 75 µmhos cm<sup>-1</sup>, % 14,24 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % 16,75 CaO) ile Bitlis (70 milyon ton rezerv, pH 8,13, EC 55 µmhos cm<sup>-1</sup>, % 15,36 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % 15,32 CaO) bölgelerinden olmak üzere iki farklı fosfat yatağından alınan fosfat kayaları üzerinde deneme yürütülmüştür.

İki farklı bölgeden alınan fosfat kaynaklarının farklı bakteri çeşitleriyle çözünürlüklerinin araştırılması ve artırılması amacıyla, laboratuvar koşullarında çözelti ortamında 1000 mg kg<sup>-1</sup> P konsantrasyonunda olacak şekilde 2 farklı fosfat kayası tartılmış ve kontrol ile 5 farklı bakteri çeşidi (*Azospirillum brasilense* SP-245, *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus megaterium* M3, *Raoultella terrigena*, *Burkholderia cepacia* BA-7) hazırlanan fosfat kayalarına 3 tekrarlamalı olarak uygulanmıştır. Bu uygulamada, -80 °C'de, % 30 gliserol ve sıvı besiyeri (Lauryl Broth) içerisinde muhafaza edilen bakteriler nutrient agar katı besi ortamına çizgi ekim yapılarak 27 °C'ye ayarlı inkübatörde 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası gelişen her bir bakteriden bir öze dolusu alınarak 250 ml nutrient broth içeren erlenmayerlere aktarılmıştır. Bakteri ile kontamine edilen sıvı besiyerleri, bakterilerin

aerobik gelişimi için 27 °C'ye ayarlı çalkalayıcıda 91 devir/dakikada 24 saat inkübe edilerek hazırlanan bakteriyel süspansiyonlar steril saf su ile seyreltilerek, spektrofotometrik ölçümle son konsantrasyon 108 CFU ml<sup>-1</sup>'ye ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteri solüsyonlarından 100 ml alınarak içerisinde 1000 mg kg<sup>-1</sup> P içeren fosfat kayası konulan erlenmayerlere ilave edilmiştir.

Uygulamaları takiben 40 gün boyunca 3 örnekleme (10. gün, 20. gün ve 30. gün). 24 °C'ya ayarlı çalkalayıcıdan alınan solüsyonlarda EC değerleri elektriksel iletkenlik aleti ile (Demiralay, 1993), pH değerleri cam elektrotlu pH metre ile (McLean, 1982) ve çözünebilir fosfor ve kalsiyum içerikleri ise ICP OES (Inductively Couple Plasma Optical Emission Spectrometry) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) (Mertens, 2005), asit ve alkalın fosfat enzim aktivitesi spektrofotometrede (Tabatabai, 1982), mikroorganizmalar tarafından salgılanan organik asit miktarları ise HPLC'de (High-Performance Liquid Chromatography) belirlenmiştir (Şekil 1). Üç farklı dönemde alınan örneklerde yapılan pH, EC, asit ve alkalın fosfat enzim aktivite, çözünebilir fosfor ve kalsiyum miktarları, ile organik asit miktarları varyans analizine ve çoklu karşılaştırma testlerine tabi tutularak, önem seviyeleri belirlenmiştir (SPSS, 2004).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

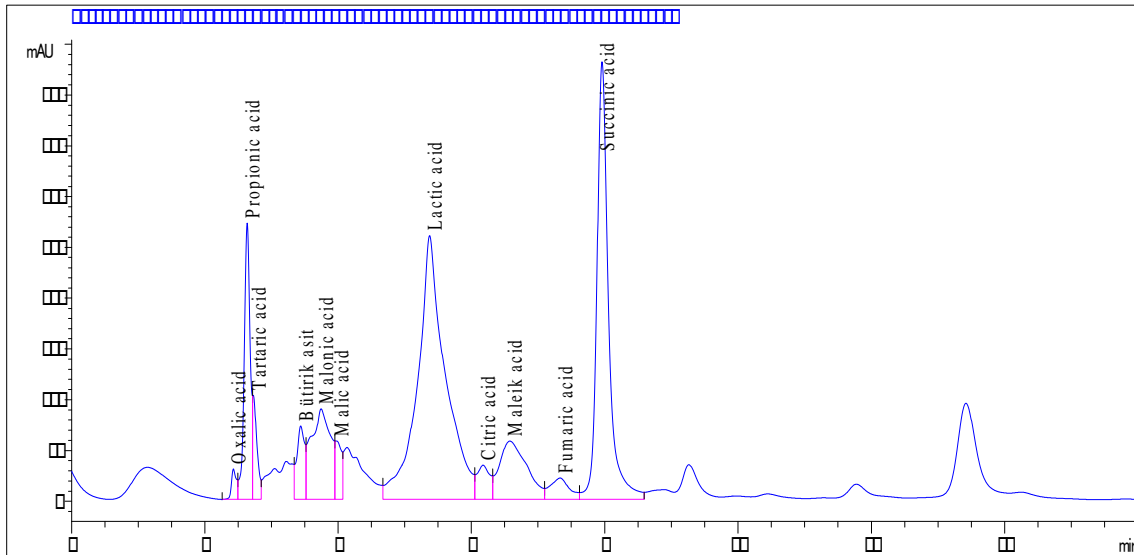
### Bakteri Uygulamalarının Kayası Fosfatının pH, EC ve Ca İçeriği Üzerine Etkileri

Mardin ve Bitlis fosfat yataklarından elde edilen ham fosfatların tarımda kullanılabilirliği ile

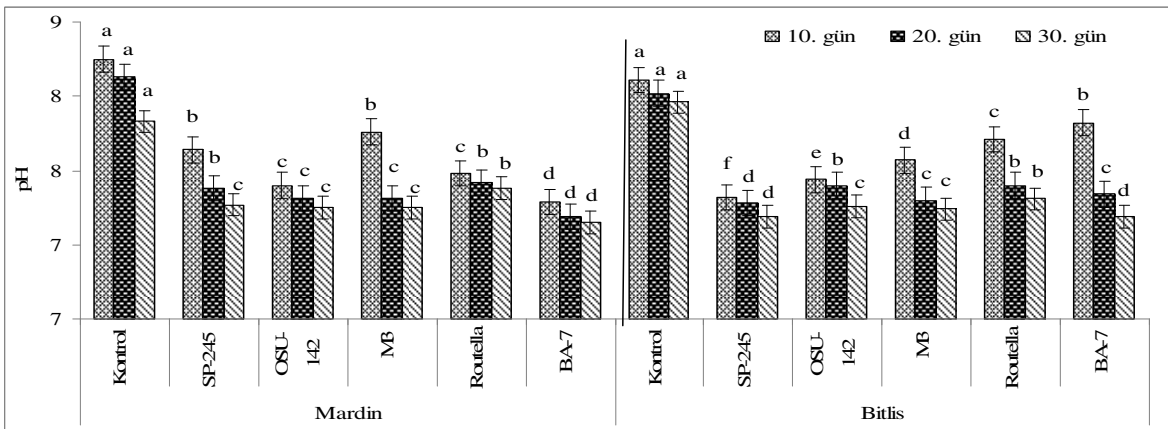
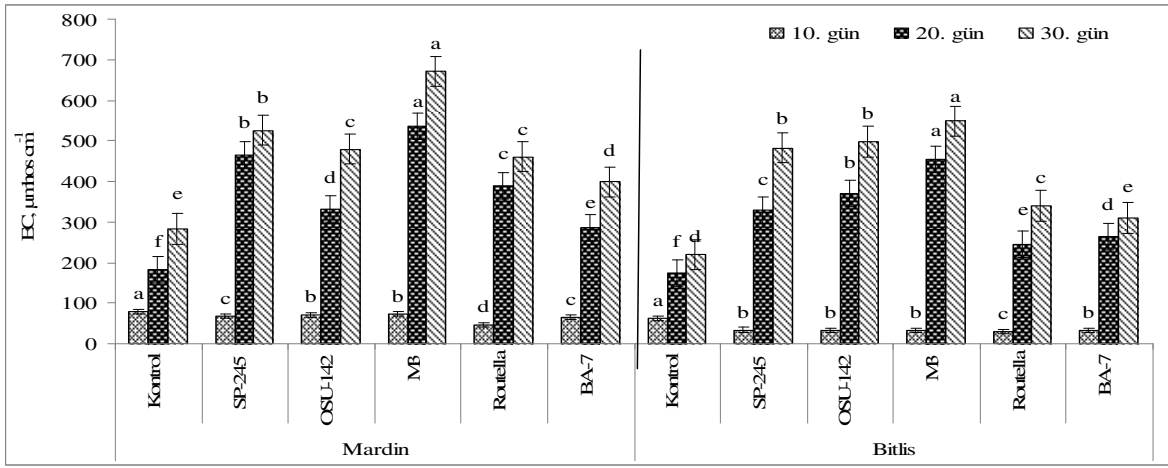
elverişliliğinin artırılması amacıyla uygulanan 5 farklı bakteri uygulamasının, fosfat çözeltilerinin pH, EC ve Ca değerleri üzerine olan etkileri istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur (p<0,05). Yapılan ölçümler sonucunda, bakteri uygulamasına bağlı olarak fosfat kayası ilave edilen çözeltilerin EC değerleri, artan inkübasyon süresine bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 2). Mardin ve Bitlis fosfat kayasında, 10. günde EC değeri 80 ve 62 µmhos cm<sup>-1</sup> iken 30. günde bu değer sırasıyla % 72 ve % 69 oranında artarak 283 ve 197 µmhos cm<sup>-1</sup> değerine ulaşmıştır. Ancak bu çözeltilere bitki gelişimini düzenleyici bakterilerin (PGPR) ilave edilmesi durumunda, 30 günlük inkübasyon süresinde EC değeri, kontrole göre % 137 düzeyinde artış göstermiştir. İnkübasyon süresinin 30. gününde en yüksek EC değeri her iki fosfat kayasında da *B. megaterium* M3 bakteri uygulamasından elde edilmiştir (Şekil 2).

İki farklı fosfat kayası çözeltisinin pH değerleri inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0,05) azalma göstermiştir. Mardin ve Bitlis fosfat kayasında, 10. günde pH sırasıyla 8,25 ve 8,11 iken 30. günde 7,83 ve 7,96 değerlerine düşmüştür. Fosfat kayasının çözümlülüğünü artırmak amacıyla uygulanan biyogübreler çözeltilerinin pH'sının düşmesine neden olmuştur. *Burkholderia cepacia* BA-7 biyogübre uygulaması ile inkübasyon periyodunun 30. gününde en düşük pH değeri Mardin ve Bitlis fosfat kayası sırasına göre 7,15 ve 7,18 olarak elde edilmiştir.

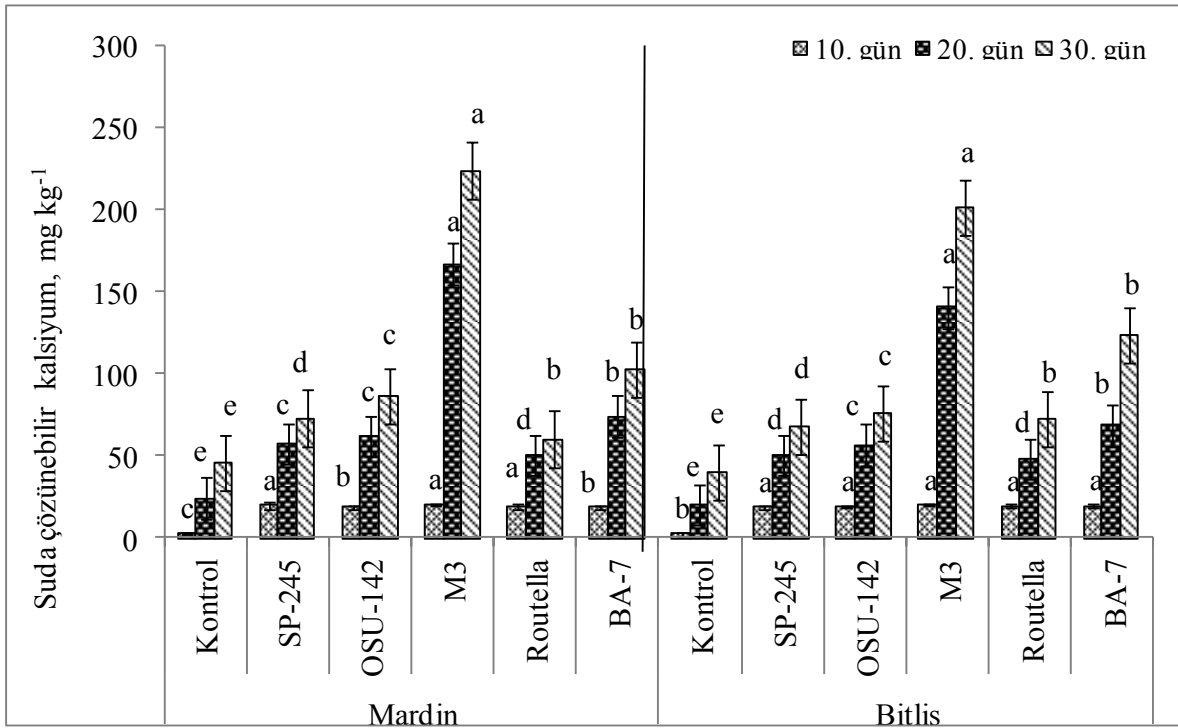
İki farklı fosfat kayasından çözelti ortamına geçen suda çözünebilir Ca miktarı, inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0,05) artış göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 1 Biyogübreler tarafından salgılanan organik asit miktarlarına ait HPLC standart okuma grafiği



Şekil 2 Farklı biyogübre uygulamalarında fosfat kayası çözeltilerinin EC ve pH değerlerindeki değişimler (n=5, ± standart sapma) (p<0,05)



Şekil 3 Farklı biyogübre uygulamalarında fosfat kayasının çözeltilerinin Ca içeriği üzerine etkisi

Mardin ve Bitlis fosfat kayasında, 10. günde suda çözünebilir Ca içeriği sırasıyla 2,90 ve 2,56 mg kg<sup>-1</sup> iken 30. günde 45,34 ve 40,32 mg kg<sup>-1</sup> değerlerine yükselmiştir. Fosfat kayasının çözünürlüğünü artırmak amacıyla uygulanan biyogübreler çözelti ortamına geçen suda çözünebilir Ca miktarının artışına neden olmuştur. *B. megaterium* M3 biyogübre uygulaması ile inkübasyon periyodunun 30. gününde en yüksek suda çözünebilir Ca değeri Mardin ve Bitlis fosfat kayası değerleri 224,32 ve 202,10 mg kg<sup>-1</sup> olarak elde edilmiş ve Ca çözünürlüğünde kontrole göre 5 katlık bir artış elde edilmiştir.

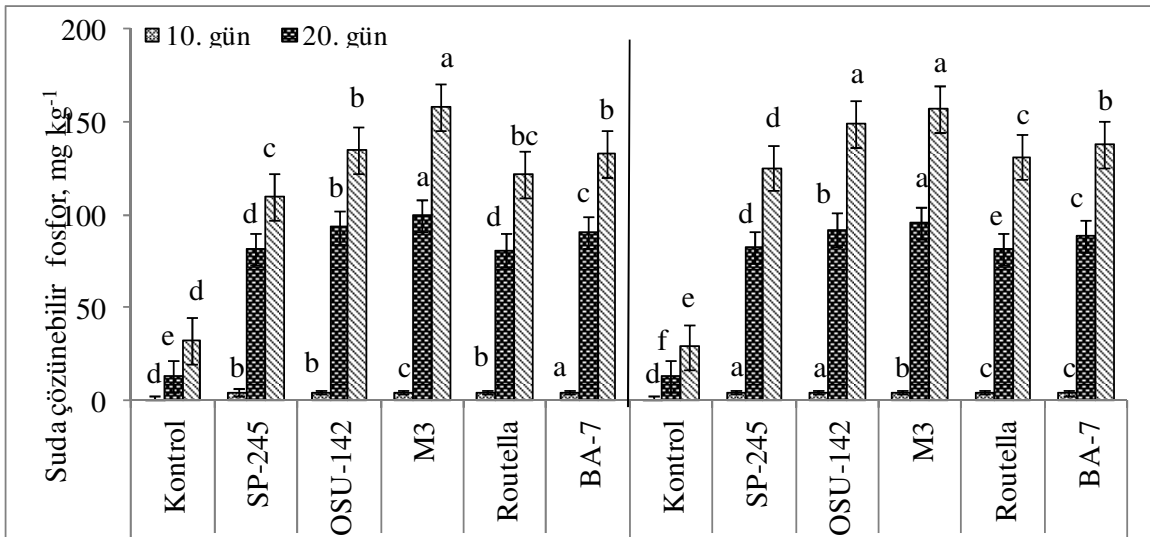
Bitki gelişim düzenleyici bakterilerin kalsiyum ve fosfor çözmedeki yetenekleri, asit ve alkalın fosfataz aktiviteleri, hormon kapasiteleri ve organik asitlerin salgılayabilme yeteneklerinden ileri gelebileceği öne sürülmektedir (Seshadri vd., 2004). Fosfor çözücü bakterilerin bitkilere inoküle edilmesi, çözünürlüğü düşük fosforlu gübrelemenin yapıldığı topraklarda fosforun yayırlılığının artırılması bakımından faydalı bir uygulama olarak belirlenmiştir (Reyes vd., 2002). Jones (1998), yaptığı bir çalışmada organik anyonların çözeltiye geçen fosfor miktarını artırdığını belirtmiştir. Yine aynı çalışmada, ortam koşullarının pH düzeyinin Ca fosfatların çözünmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Organik fosfat bileşikleri ve çözünürlüğü düşük inorganik fosfat bileşiklerinin mikroorganizmalar tarafından çözünürlüğünün artırılması ile ilgili yapılan pek çok çalışmada, bu etkinin trikarboksilik asit, glukonik asit, 2-ketoglukonik asit, laktik asit, izobütirik asit, izovalerik asit, glikolik asit, oksalik asit, malonik asit, süksinik asit ve asetik asit gibi mikrobiyal orijinli organik asitlerin ileri gelebileceği öne sürülmüştür (Halder, 1993; Massimiliano vd., 1999; Rodriguez ve Fraga, 1999).

### Bakteri Uygulamalarının Kayası Fosfatının Fosfor İçeriği Üzerine Etkileri

Mardin ve Bitlis fosfat yataklarından alınan iki farklı fosfat kayasının çözünürlükleri üzerine bakteri uygulamaları ile inkübasyon sürelerinin etkileri incelendiğinde, meydana gelen etkinin istatistiksel açıdan çok önemli olduğu ( $p < 0,01$ ), artan inkübasyon süresi ile bakteri uygulamasına bağlı olarak bu etkinin daha da arttığı belirlenmiştir (Şekil 4). Yapılan regresyon analizi sonucunda 30 günlük inkübasyon periyodu sonucunda çözelti ortamına geçen fosfor miktarının en yüksek düzeyde olduğu, bu süreden sonraki inkübasyon sürelerinde çözeltiye geçen fosfor miktarının sabitleşmeye başladığı ve önemli değişimlerin görülemeyeceği tespit edilmiştir.

Fosfat kaynaklarının mevcut yayırlılığını artırıcı faktör olarak uygulanan bakteri uygulamalarına bağlı olarak fosfor çözünürlüğü artış göstermiştir. Kontrol uygulamasına göre bütün bakteri uygulamalarında fosfor yayırlılığın artmıştır (Şekil 4). Mardin fosfatında kontrol uygulamasında 1000 mg kg<sup>-1</sup> olarak uygulanan fosforun 0,61 mg kg<sup>-1</sup>'i 10 gün içinde serbestlenirken, ortama *B. megaterium* M3 bakterisinin uygulanması ile serbestlenen fosfor miktarı 4,12 mg kg<sup>-1</sup>'e yükselmiştir. Inkübasyon periyodunun artışı ile birlikte 30. günde kontrol uygulamasında 32 mg kg<sup>-1</sup> fosfor yayırlılığında dönüşürken, *B. megaterium* M3 bakteri uygulamasında bu değer 158,01 mg kg<sup>-1</sup>'e yükselmiştir.

Bitlis fosfatında da benzer sonuçlar görülmüş ve kontrol uygulamasında 0,62 mg kg<sup>-1</sup> yayırlılığında fosfor miktarı mevcut iken *B. megaterium* M3 bakteri uygulaması ile bu değer 4,10 mg kg<sup>-1</sup>'e yükselmiştir. Inkübasyon periyodu sonucunda (30.gün sonunda) ise kontrol uygulamasında 28,41 mg kg<sup>-1</sup> olan fosfor yayırlılığında *B. megaterium* M3 bakteri uygulaması ile 156,74 mg kg<sup>-1</sup>'e yükselmiştir (Şekil 4).



Şekil 4 Farklı bakteri uygulamalarında inkübasyon süresine bağlı olarak fosfor yayırlılığına etkileri

Yapılan çalışmalarda bitki ve topraklardan izole edilen bazı mikroorganizmalar, organik ve inorganik formda bulunan ortofosfatları çözme yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir (Barea vd., 2005). Bu fosfat çözücü mikroorganizmalar, hidroksi ve flor apatit içeren Ca-fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ve kaya fosfatı ile Fe ve Al fosfatları kolaylıkla çözebilme yeteneğine sahip oldukları yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu kaynaklardan çözünen fosfor miktarı, fosfor kaynağı ile mikroorganizma çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Kucey, 1983; Nahas, 2007).

Topraklardaki organik fosforun mineralizasyonu genellikle mikroorganizmalar tarafından yönlendirilir ve bu mikroorganizmalar bitkiye yarıyıllı fosfor miktarının sürekliliğinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu konuda yapılan pek çok çalışmada bitki gelişimini düzenleyici bakterilerin uygulanması ile, farklı formlardaki organik fosforun hızlı bir şekilde mineralize olmasına neden olduğu (Macklon vd., 1997; Richardson vd., 2005) ve elverişli fosfor miktarının artırılmasına bağlı olarak pek çok üründe verim artışına neden olduğu Eşitken vd., (2003, 2006) kayısı ve kiraz ağaçlarında, Orhan vd., (2006) ahududu bitkisinde, Pırlak vd., (2007) ile Karlıdağ vd., (2007) elma ağacında, Turan vd., (2007) domates bitkisinde, Güneş vd., (2009), çilek bitkisinde yaptıkları çalışmalarla belirtilmişlerdir.

### Bakterilerin Çözelti Ortamına Salgıladıkları Organik Asit ve Enzim Aktivite Değerleri

Fosfat kayasının suda çözünebilir fosfor miktarının artırılması amacıyla uygulanan mikroorganizmaların, çözelti ortamına salgıladıkları organik asit miktarları ve asit-alkalin fosfataz aktivite değerleri inkübasyon süresince takip edilmiş olup en yüksek etkinin

görüldüğü 30. gün değerleri değerlendirmeye alınmıştır. Bakteriler tarafından çözelti ortamına salgılanan organik asit miktarları bakterilerin özelliklerine bağlı olarak farklılık gösterdiği ve istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Bakteriler tarafından çözelti ortamına salgılanan toplam organik asit miktarı en fazla *B. megaterium* M3 bakteri uygulamasından ( $230,44 \text{ mg } \mu\text{l}^{-1}$ ) elde edilirken, en düşük organik asit salgısı ise *A. brasilense* Sp-245 bakteri uygulamasından ( $119,06 \text{ mg } \mu\text{l}^{-1}$ ) elde edilmiştir.

*B. megaterium* M3 bakterisi tarafından okzalik, laktik asit tartarik, sitrik ve maleik asit; *A. brasilense* SP-245 fumarik asit ve *R. terrigena* tarafından ise malonik asit ve malik asit salgılarının diğer bakteriler tarafından salgılanan organik asit miktarlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Bu çalışma sonucunda, *B. megaterium* M3, *B. subtilis* Osu-142, *A. brasilense* Sp-245, *B. cepacia* BA-7, *R. terrigena* gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından salgılanan (okzalik asit, tartarik asit, sitrik asit, maleik asit, fumarik asit, malonik asit, malik asit ve laktik asit) organik anyonların serbestlenmesi sonucunda ortam pH'sının düştüğü ve asitlik ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalar tarafından salgılanan organik anyonlar ise çözünmez durumda bulunan fosfor formlarının çözünebilir hale gelmesini ve elverişli fosfor miktarının artmasına katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Whitelaw, 2000). Denemede kullanılan bu bakteriler organik asit (okzalik asit, tartarik asit, sitrik asit, maleik asit, fumarik asit, malonik asit, malik asit ve laktik asit) üreterek ve çözeltinin pH'sını düşürerek fosforun çözünürlüğünü artırdıkları bu konuda yapılan pek çok çalışma ile uyum içindedir (Deubel vd., 2000; Nahas, 1996).

**Çizelge 1.** Denemede kullanılan PGPR'lerin çözelti ortamına salgıladıkları organik asit miktarları

mg $\mu\text{l}^{-1}$	Kontrol	<i>B. megaterium</i> M3	<i>B. subtilis</i> Osu-142	<i>A. brasilense</i> Sp-245	<i>B. cepacia</i> BA-7	<i>R. terrigena</i>
Okzalik asit	1.05±0.002e	1.14±0.002a	0.364±0.001e	0.75±0.001c	0.58±0.001d	1.02±0.002b
Tartarik asit	0.620±0.001f	2.99±0.002a	1.70±0.003c	2.39±0.003b	1.25±0.004e	1.44±0.003d
Malonik asit	1.33±0.005f	11.10±0.005b	3.33±0.004e	8.70±0.005c	6.28±0.007d	29.55±0.007a
Malik asit	1.12±0.003f	2.07±0.004c	2.52±0.002b	1.51±0.001d	1.36±0.003e	4.53±0.003a
Laktik asit	4.82±0.004e	186.58±0.01d	124.81±0.02a	99.40±0.004c	112.41±0.025b	125.79±0.03a
Sitrik asit	2.14±0.002f	12.78±0.003a	8.13±0.005b	3.41±0.005e	5.44±0.002d	7.42±0.003c
Maleik asit	3.41±0.006f	6.72±0.002a	4.21±0.005b	1.63±c	0.65±e	1.14±0.002d
Fumarik asit	0.10±0.001e	7.06±0.004b	0.46±0.001c	1.25±a	0.42±c	0.35±0.002d
Toplam	14.60E	230.44A	145.53C	119.04D	128.17D	171.23B

\* Harfler sütunlardaki önem düzeyini ( $p<0.05$ ) ifade etmektedir.

Fosfat kayasının çözünürlüğünü artırmak için uygulanan farklı bakterilerin, çözeltili ortamına salgıladıkları asit ve alkalın fosfataz enzim aktivite değerleride bakterilerin özelliklerine göre değişiklik göstermiştir (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Denemede kullanılan PGPR'lerin çözeltili ortamına salgıladıkları asit ve alkalın fosfataz enzim aktivitesi

	Asit fosfataz mmol PNP L <sup>-1</sup>	Alkalın fosfataz mmol PNP L <sup>-1</sup>
Kontrol	0.05±0.0002d	0.10±0.0008c
<i>B. megaterium</i> M3	0.66±0.0003a	2.13±0.0006a
<i>B. subtilis</i> Osu-142	0.60±0.0003c	1.39±0.0005b
<i>A. brasilense</i> Sp-245	0.63±0.0002b	1.40±0.0005b
<i>B. cepacia</i> BA-7	0.65±0.0002a	1.50±0.0007b
<i>R. terrigena</i>	0.66±0.0002a	1.32±0.0006bc

\* Küçük harfler bakteriler arasındaki önem seviyesini (p<0.05) göstermektedir.

En yüksek asit fosfataz enzim aktivitesi *B. megaterium* M3 ve *R. terrigena* uygulamasından (0,66 mmol PNP L<sup>-1</sup>) elde edilirken, en düşük asit fosfataz enzim aktivitesi (0,60 mmol PNP L<sup>-1</sup>) *B. subtilis* Osu-142 bakterisi uygulananlardan elde edilmiştir. Alkalın fosfataz enzim aktivitesi bakımından değerlendirme yapıldığında, *B. megaterium* M3 bakterisi (2,13 mmol PNP L<sup>-1</sup>) en yüksek etkiye sahip, *R. terrigena* bakterisi ise en düşük (1,32 mmol PNP L<sup>-1</sup>) etkiye sahip uygulama olarak belirlenmiştir.

Organik fosfor doğal ortamlarda işlenen alanlara göre daha hızlı ve serbest kalan P miktarında daha fazladır. Organik substratlardaki fosforu açığa çıkaran enzimler genel olarak fosfatazlar olarak bilinir. Mikroorganizmaların asit ve alkalın fosfataz enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak organik fosforun daha kolay elverişli forma dönüşebildiği (Pant ve Warman, 2000), düşük fosfor içeriğine sahip çözeltiler enzim aktivitesi, bitki için gerekli olan fosforun, organik kaynaklı fosfordan serbestlenmesinde oldukça önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Speir ve Cowling, 1991). Organik fosforun inorganik fosfora dönüştürülmesinde asit ve alkalın fosfatazın önemli rol oynadığı (Hilda ve Fraga, 2000) ve PGPR'lar tarafından üretilen asit veya alkalın fosfatazın organik rezidüallardan fosforu ayırarak fosfor elverişliliğini artırdığı belirtilmiştir (Tarafdar vd., 1988; Rodriguez vd., 1996).

## SONUÇ

Bu çalışma ülkemizde yaklaşık 425 milyon ton potansiyele sahip olan ham fosfat kayası rezervlerinin organik tarımda kullanılabilirliği ve mevcut çözünebilir fosfor miktarlarının

artırılabilmesine yönelik yürütülmüştür. Ülkemiz tarım topraklarının büyük çoğunluğunun fosfor bakımından fakir olduğu göz önüne alındığında, tarım alanlarından yüksek verim alınabilmesi için kesinlikle fosforlu gübrelemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu amaçla kullanılan kimyasal gübrelerin bitkisel üretimde ürün artırıcı özellikleri bulunmasına rağmen, toprakların sürdürülebilir kullanımı üzerine oldukça olumsuz etkileri bulunmaktadır. Organik tarımın önemini arttırdığı günümüzde bu fosfat kayasının tarımda kullanımının gerekliliği ortaya konulmuştur. Toprağa uygulanan bu fosfat kaynaklarının çözünürlüklerinin düşük olması tarımda kullanımını sınırlandırmaktadır.

Bu çalışma sonucunda, topraktaki mevcut fosforun ve ham fosfat kayalarının çözünürlüğünü artırmak amacıyla uygulanan bakterilerin önemli düzeyde çözünürlüğe katkıda bulunduğu, bu nedenle sürdürülebilir ve organik tarım sistemlerinde toprağın yapısını bozmadan hem yüksek ürün miktarı hem de kaliteli ürün almak amacıyla kullanılacak ham fosfat kaynakları uygulandıktan sonra çözünürlüğünü artırmak için *B. subtilis* OSU-142, *B. cepacia* BA-7 ile *B. megaterium* M3 bakterisi uygulamalarının kontrol ve diğer bakteri uygulamalarına göre etkin sonuç verdiği belirlenmiştir. Özellikle, bu bakterilerin fosforun elverişliliğini artırmak için organik asitlerden yüksek miktarda okzalik asit, tartarik asit, laktik asit ve sitrik asit salgıladıkları, ayrıca fosfat kayasının çözünürlüğünde bakteriler tarafından üretilen alkalın fosfataz enzim aktivitesinin etkili olduğu ve çözeltili ortamına geçen çözünebilir fosfor miktarını, kontrole göre 5 kat ve Ca içeriğini ise 4 kat artırdığı belirlenmiştir. Sera ve tarla koşullarında basınçlı sulama sistemleri yaygın bir şekilde kullanıldığı için bu uygulamanın sıra üzeri ekilen damla sulama veya basınçlı sulama sistemlerinde rahatlıkla kullanılabilme özelliğini artıracaktır. Ancak elde edilen bu sonuçların tarla çalışmaları ile kalibre edilmesi uygulanacak gübre miktarı ve etkinliği bakımından önemli olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Akgül D S, Mirik M (2008). Biocontrol of Phytophthora capsici on pepper plants by Bacillus megaterium strains. J. Plant Pathology 90: 29-34.
- Barea J M, Jose Pozo M, Rosario Azcon, Azcon-Aguilar C (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere, J. Exper. Botany 56: 1761-1778.
- Çakmakçı R, Dönmez F, Aydın A Şahin F (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biol. Biochem 38: 1482-1487.
- Çakmakçı R, Erat M, Oral B, Erdoğan U Şahin F (2009). Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole 3 acetic acid producing rhizobacteria. J. Hort. Sci. Biotech 84: 375-380.

Demiralay İ, (1993). Toprak Fiziksel Analizleri. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları No:143, Erzurum.

Deubel A, Gransee A, Merbach, W (2000). Transformation of Organic Rhizodeposits by Rhizoplane Bacteria and its Influence on the Availability of Tertiary Calcium Phosphate. *J. Plant Nutr. Soil Sci* 163: 387–392.

Eşitken A, Karlıdağ H, Erciği S, Turan M, Şahin F (2003). The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu), *Aus. J. Agric. Re.* 54: 377–380.

Eşitken A, Pırlak L, Turan M, Şahin F (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Sci. Hortic* 110: 324–327.

Goldstein A H (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Alter. Agric* 1: 51–57.

Goldstein A H (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani–Gorini A, Yagil E, Silver, S, editors. *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM Press, 197–203.

Güneş A, Ataoğlu N, Turan M, Eşitken A, Ketterings Q M (2009). Effects of phosphatesolubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. *J. Plant Nutr. Soil Sci* 173: 385–392.

Halder A K, Chakrabarty P K (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol* 38: 325–30.

Hilda R, Fraga R (2000). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Advan* 17: 319–359.

Jones DL (1998). Organic acids in the rhizosphere: A critical review. *Plant Soil* 205: 25–44.

Karlıdağ H, Eşitken A, Turan M, Şahin F (2007). Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Sci. Hort* 114: 16–20.

Kotan R, Şahin F (2002). Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bakteriyel organizmaların kullanılması. *Ata.Üniv. Ziraat Fak. Der.* 31: 111–119.

Kucey R M N (1983). Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta Soil. *Can. J. Soil Sci* 63: 671–678.

Kucey R M N, Janzen H H, Leggett M E (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron* 42: 199–228.

Macklon A E S, Grayston S J, Shand C A, Sim A, Sellars S, Ord B G (1997). Uptake and transport of phosphorus by *Agrostis capillaris* seedlings from rapidly hydrolysed organic sources extracted from P32-labelled bacterial cultures. *Plant Soil* 190: 163–167.

Massimiliano F, Laura S, Federico F, Nikolay V (1999). Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Techn* 73: 157–162.

Mclean E O (1982). Soil pH and Lime Requirement. *Methods of Soil Analysis Part2. Chemical and Microbiological Properties Second Edition. Agronomy. No: 9 Part 2. Edition p: 199–224.*

Mertens D (2005). AOAC Official Method 975.03. Metal in Plants and Pet Foods. *Official Methods of Analysis, 18th edn.* Horwitz, W., and G.W. Latimer, (Eds). Chapter 3, pp 3–4, AOAC–International Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877–2417, USA.

Nahas E (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms Isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotech* 12: 567–572.

Nahas E (2007). Phosphate solubilising microorganisms: Effect of carbon, nitrogen and phosphorus sources. In: Valazquez E, Rodriguez–Barrueco C (eds) *First international meeting on microbial phosphate solubilization. Developments in Plant Soil Sci* 102: 111–115.

Narsian V, Patel H H (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem* 32: 559–565.

Orhan E, Eşitken A, Erciği S, Turan M, Şahin F (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic* 111: 38–43.

Pant H K, Warman P R (2000). Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. *Biol. Fertility Soils* 30: 306–311.

Pırlak L, Turan M, Şahin F, Eşitken A (2007). Floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to apples increases yield, growth, and nutrient element contents of leaves. *J. Sustain. Agric* 30: 145–155.

Reyes I, Bernier L, Antoun H (2002). Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology* 44: 39–48.

Richardson A E, George T S, Hens M, Simpson R J (2005). Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, UK, 165–184.

Rodriguez C E A, Gonzales A G, Lopez J R, Ciacco C A D, Pacheco B J C, Parada J L (1996). Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. *Soil Fertility* 5: 800–805.

Rodriguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Advan* 17: 319–339.

Seshadri S, Signacimuthu C, Lakshminarasimhan C (2004). Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chem. Eng. Com* 191: 1043–1052.

Speir T W, Cowling J C (1991). Phosphatase activities of pasture plants and soils: relationship with plant productivity and P fertility indices. *Biol. Fertil. Soils* 12: 189–194.

SPSS (2004). SPSS 13.0 for Windows Evaluation version. (SPSS Inc., Illinois, USA).

Şahin F, Çakmakçı R, Kantar F (2004). Sugar beet and barley yields in relation to inoculation N2-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265: 123–129.



Tabatabai M A (1982). *Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Chapter 43 Soil Enzymes. Second Edition. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America–Madison, Wisconsin, USA, 903–947.

Tarafdar J C, Rao A V, Bala K (1988). Production of phosphatases by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiol* 33: 453–457.

Turan M, Ataoglu N, Şahin F (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungus different forms of phosphorus in liquid culture. *J. Sustain. Agric* 28: 99–108.

Turan M, Ataoglu N, Şahin F (2007). Effects of *Bacillus* FS-3 on Growth of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Plants and Availability of Phosphorus in Soil. *Plant Soil Environ* 53: 58–64.

Turan M, Eşitken A, Şahin F (2009). Effects of Phosphate Solubilizing Microorganism on Soil Phosphorus Fractions. Chapter 3. *Phosphate Solubilizing Microbes For Crop Improvement*. Editor; Khan M.S and Almas Zaidi Nova Science Publishers, Inc. New York.

Turan M, Eşitken A, Şahin F (2012a) Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alleviators for Soil Degradation Chapter 3. *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Editor; Dinesh K. Maheshwari, Springer Heidelberg Dordrecht London New York.

Turan M, Güllüce M, von Wiren N, Şahin F (2012b). Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. *J. Plant Nutr. Soil Sci* 75: 818–826.

Whitelaw M A (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advan. Agron* 69: 99–151.

Yıldırım E, Turan M, Dönmez M F (2008). "Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus Sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. *Roman. Biotech. Lett* 13: 3933–3943.

Yıldırım E, Karlıdağ H, Turan M, Dursun A, Göktepe F (2011a). Growth, nutrient uptake and yield promotion of broccoli by Plant Growth Promoting Rhizobacteria with manure. *HortScience* 46: 932–936.

Yıldırım E, Turan M, Ekinçi M, Dursun A, Çakmakçı R (2011b). Plant growth promoting rhizobacteria ameliorate deleterious effect of salt stress on lettuce. *Sci. Res. Essays* 6: 4389–4396.