



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)

<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>



Araştırma Makalesi (Research Article)

Toprakta Laktik Asit ve Fumarik Asit Salgılayan Önemli Bazı Fosfat Çözücü Fungusların Belirlenmesi

İdris BEKTAŞ*¹

¹Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Amasya, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-7409-4837>

*Sorumlu yazar e-posta: idris.bektas@amasya.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 17.02.2020
Kabul: 06.08.2020
Online Yayınlanma 30.09.2020
DOI:10.29133/yyutbd.689363

Anahtar kelimeler

Fosfor çözücü fungus,
Fumarik asit,
Laktik asit,
NBRIP,
Organik asit.

Öz: Bu çalışma, Amasya ilindeki farklı tarım alanlarında yetişen farklı bitkilerin rizosfer kısmındaki topraktan fosfor (P) çözen fungusların izolasyonu, mikroskopik tanımlanması ve organik asit sentezlerinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Rizosfer toprağından NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) katı besiyeri kullanılarak 8 farklı fosfor çözen fungus izole edilmiştir. Funguslar spor karakteristik özelliklerine göre cins düzeyinde *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. ve *Cladosporium* spp. olarak belirlenmiştir. İzolatlar arasında nicel olarak en yüksek oranda P çözen izolatın 52.98 mg/ml ile *Penicillium* spp izolatu belirlenirken en düşük miktarda P çözen 29.8 mg/ml ile *Cladosporium* spp. izolatu belirlenmiştir. Aynı zamanda fungus izolatlarının salgıladıkları toplam Laktik ve Fumarik organik asit miktarlarının çözünen P ile doğru orantılı ve pH ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında en yüksek oranda organik asit sentezleyen 12.475 mg/ml ile *Penicillium* spp. izolatu olurken, en düşük oranda 10.268 mg/ml ile *Cladosporium* spp. izolatu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada fungusların çözdüğü P ile sentezledikleri toplam organik asit miktarı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Determination of Some Important Phosphorus Solubilising Fungi Secreting Lactic Acid and Fumaric Acid in Soil

Article Info

Received: 17.02.2020
Accepted: 06.08.2020
Online Published 30.09.2020
DOI:10.29133/yyutbd.689363

Keywords

Phosphorus solubilising
Fungi,
Fumaric acid,
Lactic acid,
NBRIP,
Organic acid.

Abstract: This study was carried out with the aim of isolation, microscopic identification and determination of organic acid synthesis of phosphorus (P) solubilising fungi from rhizosphere soil part of different plants grown in different agricultural areas in Amasya province. Eight different phosphorus-solubilising fungi were isolated from the rhizosphere soil using NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) solid medium. Fungi were identified at the genus level as *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp. according to spore characteristics. *Penicillium* spp isolate was determined quantitatively the highest rate of P soluble isolates with 52.98 mg/ml and *Cladosporium* spp. isolate the lowest amount of P dissolving with 29.8 mg/ml. At the same time, the total amount of Lactic and Fumaric organic acid secreted by fungus isolates is directly proportional to P and inversely proportional to pH. It was determined *Penicillium* spp isolate with 12.475 mg/ml, which synthesizes the highest amount of organic acid, while *Cladosporium* spp. with the lowest rate of 10.268 mg/ml. As a result, it was determined that the identified fungi were associated with the total amount of organic acid they synthesized with the P solubilising.

1. Giriş

Fosfor (P), bitki büyüme ve gelişmesini sağlayan Azot (N)'dan sonra bitki kuru ağırlığının %0.2'sini oluşturan en önemli besin elementidir. Toprakta çözünmüş halde bulunan ve bitki tarafından alınan P oranı ise oldukça düşük olup 0.05 ile 10 ppm arasında değişmektedir. Toprağa uygulanan P'nin de %80'inden fazlası diğer elementler tarafından fikse edilerek veya organik forma dönüşmesi nedeniyle bitki için kullanılamaz hale gelmektedir. P'nin fikse edilmesi alkali topraklarda Ca tarafından tutularak tri-kalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) şeklinde olurken, asidik toprakta Demir (Fe) ve Alüminyum (Al)'ye bağlanarak $FePO_4$ ve $AlPO_4$ şeklinde olmaktadır. Fiske edilen P'nin bitki tarafından alınabilmesi için çözünebilir iyonik fosfatlara veya düşük molekül ağırlıklı fosfor bileşiklerine dönüşmesi gerekmektedir (Holford, 1997).

Birçok araştırmacı bitki köklerinde fosfat çözücü mikroorganizmalar olan bakteri, fungus, aktinomiset türlerinin bulunduğu ve bu mikroorganizmaların bitki için P alımında öneme sahip olduğu belirlemiştir (Sujatha ve ark., 2004). Günümüzde tarımda kullanılan yoğun sentetik kimyasalların toprak kalitesine olan olumsuz etkisini azaltabilmek; besin elementlerin bitkiler tarafından kullanılabilirliğini arttırabilmek adına fosfat çözen bu mikroorganizmaların organik tarımda biyogübre olarak kullanımları tavsiye edilmektedir (Öztekın ve ark., 2015). Rizobakterilerin bitki büyümesini, verimi ve meyve kalitesini arttırmada faydalı ve ekonomik olduğu belirlenmiştir (İpek ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda fungusların kaya fosfatını bakterilerden daha fazla çözme kabiliyetine sahip oldukları bildirilmiştir (Anil ve Lakshmi, 2010). Rizosfer mikroorganizmaları arasında bulunan *Penicillium* spp. ve *Aspergillus* spp. önemli fosfat çözücü funguslar olarak değerlendirilmektedir. *Aspergillus niger* ve bazı *Penicillium* türleri fosfat çözümlülüğü biyokontrol ve diğer biyoteknolojik önemlilikleri bakımından üzerinde çalışılan önemli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Chuang ve ark., 2007).

Fosfat çözücü mikroorganizmaların fosfat çözündürme mekanizmasının genellikle düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin salınması ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Goldstein,1995). Mikroorganizmalar tarafından salınan bu organik asitler hidroksil ve karboksil grupları yoluyla fosfata bağlı kanyonları şelatlar, böylece onu çözümlü formlara dönüştürmektedirler (Kpombekou ve Tabatabai,1994). Mikroorganizmalar tarafında üretilen organik asitler, aynı zamanda ortamın pH'sını düşürmesi sonucu oluşan asidik ortam, fosfat çözümlmesini sağlamaktadır (Halder ve ark., 1991). Bar-Yosef ve ark. (1999), çalışmalarında toprak fosfatının mikrobiyal çözülmesinin genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen organik asitler nedeniyle olduğunu göstermiştir. Birçok farklı çalışmada organik asitlerden olan oksalik asit, sitrik asit, laktik asit, glukonik asit vb. mikroorganizmalar tarafından salgılandığı High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile belirlenmiştir (White ve ark., 1999). HPLC metodu ile sıvı besi ortamda mikroorganizmalar tarafından salgılanan organik asit çeşitleri ve miktarları belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile her organik asit farklı bir pik ile diğerinden ayrılabilir. Bu neden ile HPLC kullanımı organik asitler dahil organik bileşiklerin miktarının belirlenmesi ve tanımlanması için doğru ve uygun bir tekniktir (Zaky ve ark., 2017).

Yapılan bu çalışmada Amasya ilinde tarım alanlarında yetişen bitkilerin rizosfer toprağında bulunan fosfat çözücü funguslar izole edilerek mikroskobik tanısı yapılmıştır. Tanısı yapılan fungusların P çözme değerleri National Botanical Research Institute Phosphate (NBRIP) besi ortamı kullanılarak nicel olarak belirlenmiştir. Fungus izolatlarının fosfor çözmede en önemli mekanizması olan organik asit sentezleri ve miktarları HPLC analizi ile belirlenerek P çözümlülüğünün organik asit miktarı ile ve pH arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1.Toprak Örneklerinin Alınması

Araştırma, Amasya ilinin Suluova ilçesinde 2019 yılında farklı aylarında soğan, buğday, mısır ve şekerpancarı yetişen bitkilerin rizosfer toprağının incelenmesi ile yapılmıştır. Fungus izolasyonu yapılacak toprak örnekleri farklı tarım alanlarında diğerlerine göre daha fazla gelişmiş 8 soğan, 9 buğday, 7 mısır ve 9 şekerpancarı bitkisini rizosfer kısmından 10-30 cm derinlikten alınmıştır. Bitki rizosfer kısmındaki yumuşak toprak bitkiden ayrılarak 33 adet toprak örneği fungus izolasyon işlemi

için laboratuvara getirilmiştir. Toprak numuneleri izolasyon çalışmalar yapılana kadar oda sıcaklığında tutulmuştur.

2.2. Fosfat Çözücü Fungusların İzolasyonu

Toprakta fosfat çözücü fungusların izolasyonu her bir toprak örneğinin 1 gr alınarak 9 ml fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl) dilüsyon yapılması ile izole edilmiştir. Toprak örnekleri bu şekilde 10 kat seri dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyon serilerinin 4. ve 5. serilerinden 1 ml alınarak çözünmeyen Trikalsiyum fosfat (TCP) içeren NBRIP (Glikoz, 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$ 5 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g; KCl, 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g ve Agar ,15 gr; saf su 1000 mL; pH 7.0) besi ortamına yüzeysel olarak ekilmiş ve 27-30 °C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir (Nautiyal, 1999). Etrafında zon oluşturan kolonilerden iğne ucu ile bir miktar miselyum alınarak steril lam üzerindeki 100 µl saf su ile karıştırılarak spor solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra içerisinde su agarı bulunan petri kutularına bir öze dolusu spor solüsyonu çizilerek ekim yapılmıştır (Akgül, 2008). Bu şekilde geliştirilerek saflaştırılan funguslar çalışmalar için PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde +4 °C saklanmıştır.

2.3. Fosfat Çözücü Fungusların Tanısı

Saf olarak elde edilen ve PDA besiyerinde geliştirilen fungus kolonilerinin, misel ve spor yapıları mikroskopik olarak incelenmiştir. İzole edilen tüm fungus kolonilerinin mikroskopik tanısı spor morfolojilerine göre ışık mikroskopunda 40X'lik ve 400X'lik büyütmede (Samson ve ark.,2004)'den yararlanılarak yapılmıştır.

2.4. Fosfat Çözücü Fungusların Fosfat Çözme Değerlerinin Hesaplanması

PDA besiyerinde geliştirilen saf fungus kültürlerinin her birinden, 1 cm çaplı fungus delici kullanılarak alınan 1 cm çaplı fungus örnekleri, içerisinde 50 ml NBRIP sıvı besi yeri bulunan erlenlere inokülasyon yapılmıştır. Fungus kültürleri besiyerinde 150 rpm'de çalkalayıcıda, 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Deneme, izole edilen her bir fungus için üç tekrarlı bir şekilde yapılmıştır. Besiyerinde çözünmez halde bulunan çözdüğü P'yi hesaplamak için fungus hücrelerini, suda çözülmemeyen katı maddeleri ve $Ca_3(PO_4)_2$ 'yi çöktürmek amacı ile besiyeri tüplere aktararak 10.000 dev/dak'da 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant kısmından pipet yardımı ile 1 ml alınarak 10 ml'lik yeni tüplere aktarılmıştır. İçinde 1 ml süpernatant bulunan tüplere 5 ml saf su eklenerek seyreltilmiştir. Oluşan karışım üzerine 1 ml Barton çözeltisi eklendikten sonra 30 dak. karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik analizler için stok fosfor çözeltisi ile farklı ppm dozlarında (0, 10, 25, 50, 100, 200 ppm) beş standart P çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler spektrofotometre ile 430 nm'de ölçülmüş ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. Karanlık ortamda inkübe edilen çözeltilerde çözünmüş halde ne kadar fosfor bulunduğu 430 nm'de ölçülerek elde edilen absorbans değerleri, standart çözeltilerin absorbans değerleri ile kıyaslanarak çözünen P değerleri seyreltme faktörü dikkate alınarak mg/ml düzeyinde hesaplanmıştır (Barton, 1948). Her bir cinsten en yüksek miktarda P çözme değerine sahip fungus seçilerek, P çözmedeki organik asit sentezi incelenmiştir.

2.5. Fosfat Çözünürlüğü, pH ve Organik Asitlerin Tanımlanması

Sentezlenen organik asit çeşidi ve ortam pH'sının fosfat çözünürlüğü üzerine etkisini belirlemek için TCP içeren sıvı NBRIP sıvı besi ortamına funguslar inokule edilmiştir. İnkübasyona bırakılan fungus kültürlerinin 10. gününde sıvı ortamın pH'sı ölçülerek kaydedilmiştir. Suda çözülmemeyen katı maddeleri ve çözünmemiş halde bulunan kalan TCP'yi çöktürmek amacı ile tüpler 10.000 dev/dak'da 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant içerisindeki organik asitler, Bevilacqua ve Califano (1989), tarafından verilen yöntem kullanılarak HPLC cihazında (Agilent HPLC 1100 G 1322) analize tabi tutulmuştur. Süpernatant kısım önce kaba filtre kağıdından, daha sonra iki kez 0.45 µm membran filtreden (Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF, Millipore, ABD) ve son olarak SEP-PAK C18 kartuşundan geçirilmiştir. HPLC sisteminde İnertsil

ODS-3, C18 (4.6x250 mm) kolon (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ABD), kullanılmış ve cihaz Agilent paket program içeren bilgisayarla kumanda edilmiştir. Dedektör 190 ve 250 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. Çalışmada mobil faz olarak 0.45 µm membran filtreden geçirilen %5 lik 1 mL/dk akış hızında sahip MeCN (Asetonitril), pH: 2.0 kullanılmıştır. Filtre edilmiş sıvıda organik asitler %85'lik aseto nitril sıvı faz yardımıyla refraktif indeks detektörüne sahip HPLC cihazında belirlenmiştir. Örnekteki organik asit pikleri standart pikler ile kontrol edilip değerlendirilerek sonuçlar mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

2.6. İstatistiksek Analiz

Çalışmada elde edilen değerler varyans analizine tabi tutularak gruplar arasındaki karşılaştırmalar Duncan testi SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Grupların önemlilikleri $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Fosfat Çözücü Fungusların İzolasyonu ve Tanısı

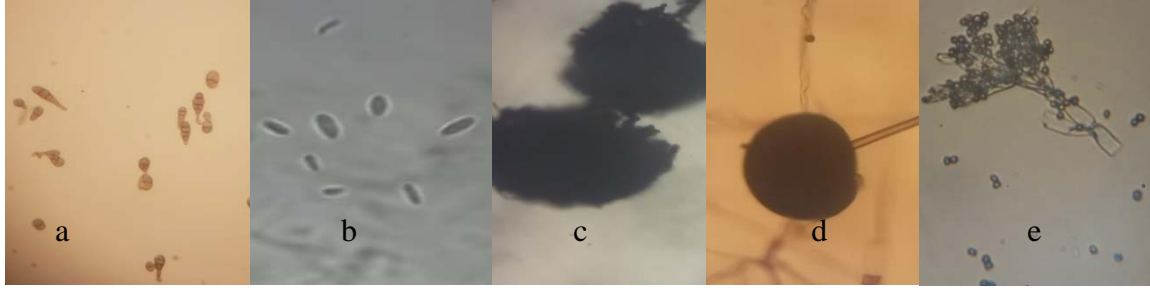
Bitki rizosferlerinden alınan 33 adet toprak örneğinden, NBRIP besi yerinde fosfat çözme belirtisi olarak zon oluşturan, birbirinden farklı olarak 8 farklı cinste fungus izole edilmiştir. Toprak izole edilen fosfat çözen fungusların mikroskop altında 40X'lik ve 400X'lik büyütmede spor ve hif yapıları incelenmiştir. Saf kolonilerin Samson (2004)'a göre morfolojik tanısı yapılması ile funguslar cins düzeyinde; *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis* spp., *Rhizopus* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., ve *Alternaria* spp. olarak tanılanmıştır (Çizelge 1). Morfolojik olarak tespit edilen 8 farklı fungus cinsine ait bazı spor ve hif yapıları Şekil 1.'de verilmiştir.

Çizelge 1. Bitki rizosfer topraklarından izole edilen fungus cinsleri

Toprak Örneği	Bitki	İzole edilen fungus cinsleri	Toprak Örneği	Bitki	İzole edilen fungus türleri	Toprak Örneği	Bitki	İzole edilen fungus cinsleri
1	Soğan	P,A,R,F	12	Buğday	A,F,C	23	Mısır	A,B,Al,T
2	Soğan	A,B,F,T,C	13	Buğday	P,Al,	24	Mısır	P,A,R
3	Soğan	P,B,R,F	14	Buğday	B,R,F	25	Şekerpancarı	Al,R,T
4	Soğan	A,Al,F	15	Buğday	P,A,T	26	Şekerpancarı	P,R,F,
5	Soğan	B,R,F,T,C	16	Buğday	Al,R,F	27	Şekerpancarı	A,B,T
6	Soğan	P,Al,F	17	Buğday	A,B,T,C	28	Şekerpancarı	P,Al,F
7	Soğan	A,B,R,F	18	Mısır	P,A,Al,F	29	Şekerpancarı	P,B,C
8	Soğan	P,A,Al,F	19	Mısır	A,B,F	30	Şekerpancarı	R,F,T
9	Buğday	P,B,T,C	20	Mısır	P,B,Al,T	31	Şekerpancarı	P,A,Al,R
10	Buğday	A,B,R	21	Mısır	P,A,F,C	32	Şekerpancarı	P,B,F
11	Buğday	P,Al,F,T	22	Mısır	P,R,T	33	Şekerpancarı	A,R,F,T

Penicillium spp.(P), *Aspergillus* spp.(A), *Botrytis* spp.(B), *Alternaria* spp.(Al), *Rhizopus* spp.(R), *Fusarium* spp.(F), *Trichoderma* spp.(T), *Cladosporium* spp.(C).

Penicillium spp. 18, *Aspergillus* spp. 17, *Botrytis* spp.14, *Alternaria* spp. 12, *Trichoderma* spp. 13, *Rhizopus* spp. 14, *Fusarium* spp. 20 ve *Cladosporium* spp.7 rizosfer toprağında izole edilmiştir. Bitki rizosfer topraklarından yoğun olarak *Fusarium* spp. izolatları izole edilirken en az yoğunlukta *Cladosporium* spp. izolatları izole edilmiştir.



Şekil 1. Fosfat çözen fungusların bazılarının konidi ve kondiofor yapılarının görünüşleri (a: *Alternaria* spp., b: *Fusarium* spp., c: *Aspergillus* spp., d: *Rhizopus* spp., e: *Botrytis* spp) (400X).

3.2. Fosfat Çözünürlüğü ve pH

Fungusların P çözünürlüğünün belirlenmesinde NBRIP sıvı besiyerinde 7 gün inkübasyondan sonra besi yerinin pH'sı ölçülmüş ve çözülmüş P konsantrasyonu hesaplanmıştır (Çizelge 2). Elde edilen değerler kendi aralarında ve fungus uygulaması yapılmamış negatif kontrol ile istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. TCP içeren sıvı besi ortamının başlangıçta pH'sının 6.8-7.1'dan inkübasyon sonunda 5.1-5.9'a kadar belirgin bir şekilde düştüğü belirlenmiştir. Fungus izolatlarının sıvı ortamda çözdüğü P konsantrasyonu ise, farklı izolatlar arasında 29.8 mg/ml ve 52.98 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan uygulamada ise ortamın pH'sı 7.1 olarak ölçülmüştür ve çözülmüş P konsantrasyonu 0.018 mg/ml olarak belirlenmiştir. İzolatlarının çözdüğü P miktarları arasında istatistiki olarak farklar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Fungus izolatları arasında en fazla P çözme miktarına sahip *Penicillium* spp. (52.98 mg/ml) belirlenip ve bu izolatın bulunduğu ortamın pH'sı en fazla düşüş göstererek 5.1 olarak ölçülmüştür. *Aspergillus* spp. izolatı ise 50.4 mg/ml P çözmesine rağmen *Penicillium* spp.'nin çözdüğü P miktarı ile arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p < 0.05$). Seçilen izolatlar arasında en düşük fosfor çözme miktarına sahip (35.38 mg/ml) *Cladosporium* spp. fungus izolatı olarak belirlenmiş ve ortamın pH'sı ise seçilen diğer bakterilerin ortam pH'sına göre daha yüksek olduğu (5.9) belirlenmiştir. Buna bağlı olarak pH ile fungus izolatlarının çözdüğü P konsantrasyonu arasında güçlü bir negatif korelasyon gözlemlenmiştir.

Çizelge 2. Fosfor çözen ve morfolojik olarak tanımlanan fungusların çözdüğü P miktarı, besiyeri pH'sı ve salgıladıkları organik asit miktarları

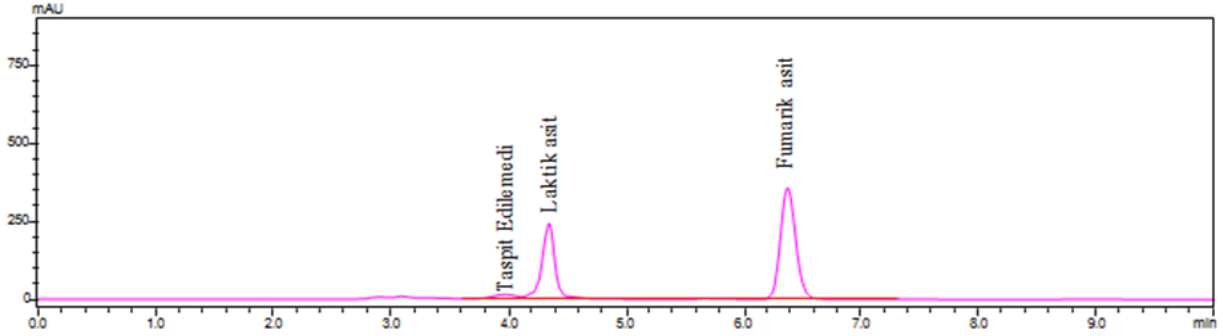
Toprak Örneği	İzole edilen funguslar	İzole edildiği bitki	Fosfat çözünürlüğü (mg/ml±SH)	pH	Fumarik Asit (mg/ml)	Laktik asit (mg/ml)	Toplam organik asit (mg/ml)
11	<i>Penicillium</i> spp.	Buğday	52.98±1.46 ^g	5.1	0.051	12.423	12.475
18	<i>Aspergillus</i> spp.	Mısır	50.4±0.73 ^g	5.3	0.051	11.980	12.032
23	<i>Botrytis</i> spp.	Mısır	47.15±0.48 ^f	5.4	0.048	11.505	11.554
33	<i>Alternaria</i> spp.	Ş.pancarı	46.59±0.80 ^f	5.3	0.050	11.804	11.854
14	<i>Rhizopus</i> spp.	Buğday	43.46±0.56 ^e	5.6	0.048	11.410	11.459
1	<i>Fusarium</i> spp.	Soğan	38.1±0.85 ^d	5.6	0.049	11.191	11.241
5	<i>Trichoderma</i> spp.	Soğan	32.96±1.56 ^c	5.8	0.045	10.547	10.592
21	<i>Cladosporium</i> spp.	Mısır	29.8±0.94 ^b	5.9	0.041	10.227	10.268
	Kontrol	-	0.018±0.01 ^a	7.1	-	-	-

*Aynı sütunda benzer harfle ifade edilen değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiki açıdan fark yoktur ($p < 0.05$) (SH:Standart Hata).

3.3. Fungus izolatlarının organik asit üretimlerinin belirlenmesi

Besiyerlerinin içerindeki organik asitlerinin belirlenmesinde HPLC'de elde edilen pikler, hazırlanan standart organik asit çözeltilerinden elde edilen pikler ile karşılaştırıldığında izolatların iki farklı organik asit (Fumarik asit, Laktik asit) ve bunları farklı oranlarda sentezlediği saptanmıştır. İzolatların tamamı Fumarik asit, Laktik asit organik asitlerini sentezlediği ve tespit edilemeyen farklı

bir organik asit sentezlediği tespit edilmiştir (Şekil 2). İzolatlar arasındaki P çözme değeri en fazla olan *Penicillium* spp.en yüksek miktarda (12.475 mg/ml) toplam organik asit sentezlediği ve buna bağlı olarak pH düzeylerinin en düşük olduğu belirlenmiştir.P çözme değeri en küçük olan *Cladosporium* spp. izolatu ise en az miktarda (10.268 mg/ml) organik asit sentezlediği ve ortamın pH sınırın diğer ortamlara oranla yüksek bir değer olan 5.9 olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda üretilen toplam organik asit miktarı ile pH arasında negatif bir korelasyon gözlemlenmiştir.



Şekil 2.HPLC analizinde *Penicillium* spp. izolatının sentezlediği organik asitlerin belirlenmesi.

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuç, bitkilerin rizosferik topraklarında farklı cinsten fosfat çözen fungusların varlığını tespit edilmiştir. Çalışmada topraktaki fosfor çözen fungusların hızlı bir şekilde belirlenmesinde doğrudan katı NBRIP besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri benzer şekilde farklı çalışmalarda fosfor çözen mikroorganizmaların hızlı bir şekilde belirlemek için kullanılan besiyeri çeşididir (Marra ve ark., 2019). Çalışmamıza benzer şekilde yapılan bir çalışmada Xiao ve ark. (2009), topraktaki fosfor çözen fungusların belirlenmesinde katı NBRIP besiyeri kullanmışlardır. Besiyeri üzerinde çevresinde açık zon oluşturan funguslar fosfor çözme özelliğine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise fosfor çözen fungusların belirlenmesinde Pikovskaya(PVK) katı besiyeri kullanılmıştır. Onyia ve Anyanwu(2013), topraktan izole ettikleri 12 farklı fungal izolatın fosfat çözme etkisinin belirlenmesinde PVK katı ve NBRIP sıvı besiyerleri kullanmışlardır. Çalışmalarında çalışmamıza paralel şekilde çözünen fosfor miktarı arttıkça ortamın pH'sının ters orantılı bir şekilde düştüğünü saptamışlardır. Yine benzer şekilde toplam organik asit miktarının çözünen fosfor miktarı ile doğru orantılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Fungusların tanımlamalarında birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan biriside fungus koloni morfolojileri ve spor karakteristik özellikleridir. Tambekar ve Wate (2007), yaptıkları çalışmada topraktaki inorganik formdaki fosforu çözen fungusların belirlenmesinde mikroskop altında koloni morfolojilerini ve spor karakteristik özelliklerini incelemişlerdir. Fungus cinslerini çalışmamıza benzer şekilde *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve *Fusarium* spp. olarak belirlemişlerdir. Fungusların fosfor çözme özellikleri cinsine ve türüne göre değişmektedir. Yapılan bir çalışmada Khatoon ve ark. (2014), topraktaki bazı fungusların çözdüğü fosfor miktarının nicel olarak belirlenmesinde sıvı NBRIP besiyeri kullanmışlardır. Çalışmalarında topraktan izole ettikleri ve fosfor çözme özelliğine sahip izolatlardan olan *Aspergillus niger* ve *A. fumigatus* izolatlarının çözdüğü fosfor miktarını sırası ile 246 µg/ml ve 290 µg/ml olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda organik asit üreten tüm fungus izolatlarının, çözünmeyen fosfatı çözdüğünü ve çözünen fosfat miktarını, üretilen organik asit ile orantılı olduğunu belirlenmiştir. Ortam pH düşüşleri ise, fosfat çözen funguslar tarafından salınan organik asitlerinden salgılanmasından dolayıdır (Sharma, 2012). Besiyerinde pH azalmasının organik asit sentezine bağlı olduğunu belirten bir çalışmada, Ramachandran ve ark. (2003), çözünmeyen fosfatın sıvı ortamda mikrobiyal çözündürülmesinin, organik asitlerin salınımına bağlı olduğunu ve bunun sonucunda pH'da bir azalmanın meydana geldiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız fungus izolatların, çözünmeyen fosfatı çözüdüren organik asitler üretebildiği sonucu ile tutarlıdır. Fosfat çözünmesinin organik asit ile ilişkili olduğunu belirten bir çalışmada Varsha ve ark. (2010), bazı funguslar tarafından organik asit üretiminin, pH'daki düşüşe ve fosfat çözünmesi olarak adlandırılan çözünmeyen fosfatın ayrışmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Organik asit üretimi olmadan da bazı mikroorganizmalar fosfat çözebilmektedir. Bu durum bu mikroorganizmaların fosfat çözümünde salgıladıkları fosfataz enzimi varlığı ile gerçekleştirebilirler (Ma ve ark., 2011). Çalışmamıza benzer şekilde fosfor çözmeye en önemli mekanizma olarak kabul edilen organik asit sentezinin araştırıldığı bir çalışmada, Scervino ve ark. (2011), fosfor çözmeye özelliğine sahip *Penicillium purpurogenum* fungus izolatının sentezlediği organik asit ve çeşidini HPLC de analiz etmişlerdir. Çalışmalarında *P.purpurogenum* organik asit olarak glukonik asit (29-32 mg/L, sitrik asit (1-52 mg/L) ve fumarik asit (0-0.3 mg/L) olarak belirlemişlerdir.

Yapılan bu çalışmada, topraktaki çözünmez formda bulunan organik fosfatı çözen toprakta fungusların olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu fungus izolatları bitkideki fosfor beslemesinde kullanılarak biyogübre adayı olabilirler. Mevcut çalışmada belirlenen fungus izolatların iki farklı (Fumarik asit, Laktik asit) organik asit sentezleyerek ortamın pH'sını düşürerek çözünmez formda bulunan trikalsiyum fosfatın çözülmesinin sağlandığı sonucuna varılmıştır. Yapılacak olan ileriki çalışmalar ile P çözücü fungusların fosfat çözmeye başka mekanizmalarının araştırılması ve izolatların tür düzeyinde tanımlanması yapılarak organik tarımda kullanılabilirliği tarla koşullarında denenmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmayı FMB-BAP 18-0373 proje numarası ile destekleyen Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Akgül, D.(2008). Çukurova bölgesi buğday ekim alanlarında kök, kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalığının durumu, bazı buğday çeşitlerinin hastalığa karşı reaksiyonları, farklı gübreleme pratikleri ve fungusit uygulamalarının hastalık gelişimine etkileri. *Çukurova Üniversitesi FBE Bitki Koruma Anabilim Dalı*, 94.
- Anil, K., & Lakshmi, T. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 787.
- Bar-Yosef, B., Rogers, R., Wolfram, J., & Richman, E. (1999). Pseudomonas cepacia-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1703-1708.
- Barton, C. J. (1948). Photometric analysis of phosphate rock. *Analytical Chemistry* 20, 1068-1073.
- Bevilacqua, A., & Califano, A. (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* 54, 1076-1076.
- Chuang, C.C., Kuo, Y.L., Chao, C.C., & Chao, W.L. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43, 575-584.
- Goldstein, A.H.(1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hort.* 12, 185-193.
- Halder, A., Mishra, A., & Chakrabarty, P. (1991). Solubilization of inorganic phosphates by Bradyrhizobium. *Indian journal of Experimental Biology* 29, 28-31.
- Holford, I. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research* 35, 227-240.
- İpek, M., Arıkan, Ş., Eşitken, A., & Pırlak, L. (2018). Bitki Gelişimini Artırıcı Rizobakterilerin "Heritage" Ahududu (*Rubus idaeus* L.) Çeşidinde Bitki Gelişimi, Verim ve Meyve Kalitesi Üzerine Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(1), 42-48.
- Khatoon, N., Md, M. K., & Khan, M. M. (2014). Isolation of potential thermotolerant phosphate solubilizing fungal strains from agricultural soils. *J. Environ. Res. Develop* 8, 853-858.
- Kpombekou, K., & Tabatabai, M.A. (1994). Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 158, 442-453.
- Ma, D., Zhu, R., & Ding, W. (2011). Alkaline phosphatase activity in ornithogenic soils in polar tundra. *Adv Polar Sci*, 22: 92-100.
- Marra, L. M., de Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., Olivares, F. L., & Moreira, F. M. d. S. (2019). The amount of phosphate solubilization depends on the strain, C-source, organic acids and type of phosphate. *Geomicrobiology Journal* 36, 232-242.

- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265-270.
- Nenwani, V., Doshi, P., Saha, T. & Rajkumar, S. (2010). Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity. *J Yeast Fungal Res* 1, 009-014.
- Onyia, C. E., & Anyanwu, C. U. (2013). Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *Journal Yeast Fungal Research* 4, 52-57.
- Öztekin, G., Tüzel, Y., & Mehmet, E. (2015). Fosfat çözücü bakteri aşılamaalarının sera domates yetiştiriciliğinde bitki gelişimi, verim ve meyve kalitesi üzerine etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 25, 148-155.
- Ramachandran, K., Srinivasan, V., Hamza, S., & Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. *Paper presented at the First international meeting on microbial phosphate solubilization*.
- Samson, R., Hoekstra, E., & Frisvad, J. (2004). Introduction to Food-and Airborne Fungi, Laboratory Manual Series 2. *Food and Indoor Fungi*, 389pp.
- Scervino, J., Papinutti, V., Godoy, M., Rodriguez, M., Della Monica, I., Recchi, M., Pettinari, M., & Godeas, A. (2011). Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1215-1223.
- Sharma, B., Subba, R., & Saha, A. (2012). In vitro solubilization of tricalcium phosphate and production of IAA by phosphate solubilizing bacteria isolated from tea rhizosphere of Darjeeling Himalaya. *Plant Sci Feed* 2, 96-99.
- Sujatha, E., Girisham, S., & Reddy, S. (2004). Phosphate solubilization by thermophilic microorganisms. *Indian Journal of Microbiology* 44, 101-104.
- Tambekar, P., & Wate, S. (2007). Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Puma river basin. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3, 701-703.
- Xiao, C., Chi, R., He, H., Qiu, G., Wang, D., & Zhang, W. (2009). Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159, 330-342.
- White, P. F., Nesbitt, H. J., Ros, C., Seng, V., & Lor, B. (1999). Local rock phosphate deposits are a good source of phosphorus fertilizer for rice production in Cambodia. *Soil Science and Plant Nutrition* 45, 51-63.
- Zaky, A. S., Pensupa, N., Andrade-Eiroa, Á., Tucker, G. A., & Du, C. (2017). A new HPLC method for simultaneously measuring chloride, sugars, organic acids and alcohols in food samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 25-33.