

Toprakta Bazı Bakterilerin Fosfat Çözünürlüğü ile Organik Asit Üretimi Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

İdris BEKTAŞ^{1*}

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

*Sorumlu Yazar: idris.bektas@amasya.edu.tr

Geliş Tarihi: 23.01.2020 Düzeltme Geliş Tarihi: 04.01.2021 Kabul Tarihi: 10.01.2021

Öz

Bitki rizosfer kısmında bulunan Fosfor(P) çözücü mikroorganizmalar, topraktaki bitki tarafından alınamayan çözünmez haldeki P'nin çözünmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada 35 farklı bitki rizosfer toprağından izole edilen 117 fosfat çözücü bakterinin *in vitro* ortamda hücre yoğunlukları ve salgıladıkları organik asitlerin fosfat çözme değerlerine etkileri araştırılmıştır. İzolatların TCP içeren NBRIP besiyerinde fosfat çözme değerlerinin 35.6 ve 387.9 mg L⁻¹ arasında değiştiği tespit edilmiştir. İzolatlar çözdüğü fosfor miktarı ile doğru orantılı şekilde ortamın pH sın 6.8-7.0 dan 4.5-5.7 arasına düşürdükleri görülmüştür. Yüksek derecede fosfat çözen 15 adet bakteri seçilerek tanılması MALDI-TOF MS tanılama sistemi ile yapılmıştır. Tanısı yapılan izolatlar *Enterobacter cloacae*(2), diğer izolatlar ise *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Microbacterium laevaniformans*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Lelliottia amnigena*, *Agromyces rhizosphaerae*, *Agromyces cerinus* ssp *cerinus*, *Arthrobacter tecti*, *Microbacterium hominis* ve *Microbacterium liquefaciens* şeklinde tanılanmıştır. İzolatların fosfat çözmede en önemli mekanizma olan organik asit(Fumarik asit, Laktik asit, Tartarik asit, Malik asit, Sitrik asit, Glasiyal asetik asit, Suksinik asit ve Maleik asit) sentezlerinin farklı miktarda ve çeşitte olduğu HPLC ile belirlenmiştir. Bakteriler arasındaki *Enterobacter cancerogenus* toplam organik asitmiktarı(10.758 mg ml⁻¹) en yüksek, *Microbacterium liquefaciens* izolatu ise en düşük miktarda(2.964 mg ml⁻¹) olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda izolatların organik asit olarak yüksek miktarda(5.128-0.652 mg ml⁻¹) laktik asit salgıladıkları belirlenmiştir. Toplam organik asit miktarının izolatların çözdüğü fosfor miktarı ile doğru orantılı pH ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fosfat çözücü bakteriler, maldi-tof ms, organik asit, toprak bakterileri

Determination of the Relationship Between Phosphate Solubilizing with Organic Acid Production of Some Soil Bacteria

Abstract

In this study, were investigated the effects of 117 phosphate solubilising bacteria isolated from 35 different plant rhizosphere soil on phosphate solubilising the cell density and the release of organic acids at the *in vitro* conditions. It was determined that the phosphate solubilising containing TCP ranged between 35.6 and 387.9 mg L⁻¹ values of the isolates in the NBRIP medium. It was observed that the pH of the medium decreased from 6.8-7.0 to 4.5-5.7 in accurate ratio with the amount of phosphorus solubilising. 15 high phosphorus solubilising bacteria were selected and identified by MALDI-TOF MS identification system. Among the identified isolates as *Enterobacter cloacae*(2), *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Microbacterium laevaniformans*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *lagus* spp. *Microbacterium liquefaciens*. The synthesis of organic acid(Fumaric acid, Lactic acid, Tartaric acid, Malic acid, Citric acid, Glasial acetic acid, Succinic acid and Maleic acid) which is the most important mechanism in phosphate solubilising of isolates, was determined by HPLC. Among the bacteria *Enterobacter cancerogenus* total amount of organic acid (10.758 mg ml⁻¹) was the highest, the lowest amount of *Microbacterium liquefaciens* (2.964 mg ml⁻¹) was determined. It was determined that total amount of organic acid was directly

proportional to the amount of phosphorus solubilising by isolates and inversely proportional to pH. It was also determined that the isolates secrete high amounts of lactic acid (5.128-0.652 mg ml⁻¹) as organic acid.

Keywords: Phosphate solubilizing bacteria, maldi-tof ms, organic acid, soil bacteria

Giriş

Fosfor (P), bitkiler için; büyüme, verim ve tohum oluşumu için gereken en önemli besin elementlerinden biridir. Birçok tarım topraklarında yüksek miktarda inorganik ve organik P bulunmasına rağmen; primer, hidroksi ve oksiapatit benzeri minerallerde (Demir ve Alüminyum) bulunduğu bitkiler tarafından alınabilir formda değildir (Adesemoye ve Kloepper, 2009). Toprağa düzenli olarak gübreleme yapılsa bile uygulanan inorganik P'nin % 90'a yakını Fe, Al ve Ca elementleri tarafından fikse edilmektedir (Gyaneshwar ve ark., 2002). Fikse edilen mineral P bitkiler tarafından verimli bir şekilde alınmaz ve buna bağlı olarak aşırı şekilde P uygulaması birçok çevresel ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır (Sharpley, 1995).

Fosforun bitki için önemini belirten çalışmalarda, bitkide fosfor eksikliğinin meydana gelmesi, bitkinin hastalık etmenlerine karşı daha dayanıksız hale geldiği ve ürün veriminin düştüğü belirtilmiştir (Gaffaroğlu ve ark., 2019; İdikut ve Yıldız, 2018). Yapılan çalışmalarda bazı mikroorganizmaların toprakta P döngüsünde önemli oldukları belirlenmiştir. Fosfat çözen mikroorganizma olarak adlandırılan bu bakterilerin, izole edilmesi, fosfor çözme mekanizmalarının araştırılması, tanılanması, geliştirilmesi ve tarımda kullanımı önem arz etmektedir. *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, vb. gibi bakteri türlerinin birçok türü P çözüme aktivitesi göstermektedir (Rodríguez ve Fraga, 1999). P çözen bu mikroorganizmaların tarımda doğal biyogübre amacı ile kullanılması kimyasal gübrelerin meydana getirdiği toprak kirliliğinin azalmasına yönelik bir adım olarak kabul edilmektedir (Vassilev ve ark., 2006). Mikroorganizmaların mineral fosfatların çözünürlüğünde mikroorganizma tarafından üretilen çeşitli organik asitlerin temel mekanizma olduğu kabul edilmektedir (Acevedo ve ark., 2014). Bar-yosef (1991) fosfat çözen mikroorganizmaların fosfat çözme mekanizmasının genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen organik asitler olduğunu belirtmiştir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu organik asitler mikrobiyal hücrelerin etrafını asitleştirerek P çözünmesini sağlamaktadır (Zeng ve ark., 2016). Fosfor çözücü bakterilerden olan *Pseudomonas* sp., *Erwinia* (Liu ve ark., 1992) ve *Ps. cepacia* (Goldstein, 1995) olduğu; *R. leguminosarum*, *R. meliloti* (Halder ve Chakrabarty, 1993), *B. firmus* (Banik ve Ninawe,

1988) gibi fosfat çözücülerin 2-keto glukonik asit salgıladığı ortaya konulmuştur.

Yapılan farklı çalışmalarda mikroorganizmalar tarafından salgılanan organik asitlerden olan oksalik asit, sitrik asit, laktik asit, glukonik asit vb. belirlenmesinde High Performance Liquid Chromatography (HPLC) kullanılmıştır (White et al., 1999). HPLC yöntemi ile sıvı besi yerinde mikroorganizmalar tarafından salgılanan organik asit çeşitleri ve miktarları belirlenebilmektedir. Kullanılan HPLC analizi ile her organik asitin oluşturduğu pik farklı bir organik asitin bir piki ile birbirinden ayrılabilir. Bu nedenle HPLC yöntemi organik asitler dahil olmak üzere birçok farklı organik bileşiklerin miktarının, çeşidinin belirlenmesi ve tanımlanması için doğru ve uygun bir yöntemdir (Zaky et al., 2017). Bektaş (2020) toprakta laktik asit ve fumarik asit salgılayan önemli bazı fosfat çözücü fungusların belirlenmesi amacı ile yaptığı çalışmada fungusların farklı oranlarda organik asit salgıladıklarını ve salgılanan organik asit miktarı ile fosfor çözünürlüğünün birbirleri ile orantılı olduğunu belirlemiştir. Aynı zamanda salgılanan organik asit miktarı ve çeşidi belirlemek için HPLC yöntemi kullanmıştır. Farklı türde P çözen mikroorganizmaların P çözmede en önemli mekanizma olan organik sentezlerinin araştırılarak birbiri ile kıyaslanması gerekmektedir.

Yapılan bu çalışmada Amasya ilinde tarım alanlarında yetiştirilen bitkilerin rizosfer kısmındaki topraktan P çözen mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin sıvı National Botanic Research Institute Phosphate (NBRIP) besi ortamda P çözme değerleri belirlenmiştir. Yüksek miktarda P çözen mikroorganizmaların tanılanması MALDI-TOF MS tanılama sistemi ile yapılmıştır. Bakterinin P çözmede en önemli mekanizması olan Organik asit sentezleri (Fumarik asit, Laktik asit, Tartarik asit, Malik asit, Sitrik asit, Glasiyal asetik asit, Suksinik asit ve Maleik asit) ve miktarlarının belirlenmesi HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) analizi ile yapılarak, P çözünürlüğünün organik asit miktarı ile ve pH arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Fosfat çözen bakterilerin izolasyonu

Fosfat çözen bakterilerin izolasyonu, 2019 yılında Amasya ilinde Suluova ilçesinde tarımı yapılan bitkilerin (soğan, buğday, mısır ve şekerpancarı) rizosfer bölgesinden alınan toprak örneklerinden, Mirik (2005) tarafından belirtilen

yönteme göre yapılmıştır. Bakteri izolasyonu için yapılacak toprak örnekleri tarım alanlarında diğerlerine göre daha fazla gelişmiş 8 soğan, 9 buğday, 8 mısır ve 10 şekerpancarı bitkisini rizosfer kısmından 20-30 cm derinlikten alınmıştır. Bitki rizosfer kısmındaki yumuşak toprak bitkiden ayrılarak 35 adet toprak örneği bakteri izolasyon işlemi için laboratuva getirilip kurutulmuş, tahta tokmakla dövülüp ezilmiş ve 2 mm çaplı eleklerden eilenmiştir. İzolasyon işlemi için 10 g toprak örneği alınarak 90 ml fizyolojik su (%0.85 NaCl) içerisinde iki saat 160 dev dak.⁻¹'de çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Süspansiyondan 1.0 ml alınıp içinde 9.0 ml fizyolojik su bulunan tüpe ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 10 kat dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Üçüncü ve dördüncü dilüsyon serilerinden 100 µl alınarak, P çözen bakterilerin belirlenmesi için trikalsiyum fosfat(TCP) içeren NBRIP; Glikoz, 10 g; Ca₃(PO₄)₂ (TCP) 5 g; MgCl₂.6H₂O, 5 g; MgSO₄.7H₂O, 0.25 g; KCl, 0.2 g ; (NH₄)₂SO₄, 0.1 g ve Agar, 15 g; saf su 1000 mL; pH 7.0) besi ortamına yüzeysel ekim yöntemiyle ekim yapılmıştır(Nautiyal ve ark., 2000). Besi ortamları 27±1 °C'de 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besi ortamında çevresinde fosforu çözme belirtisi olarak zon oluşturan koloniler seçilerek çizgi ekim yöntemiyle saf kültür elde edinceye kadar katı King B (KB) besi ortamında ekim yapılmıştır. İzole edilen tüm bakterilerin fosfor çözme indeksleri katı NBRIP besi ortamına üç tekrarlı nokta ekimi yapılarak; Çözülebilir fosfor indeksi= koloni çapı+şeffaf zon çapı / koloni çapı şeklinde hesaplanmıştır(Johri ve ark., 1999).

Bakterilerin P çözme değerlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemde, 10⁸ CFU ml⁻¹ bakteri yoğunluğuna ayarlanmış süspansiyondan 100 µl alınarak, sıvı NBRIP besi ortamı içeren tüplere inokule edilmiştir. Deneme üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Besiyerleri 150 dev.dak.⁻¹ çalkalayıcıda 27±1°C'de 10 gün inkübe edilmiştir. Aynı şekilde *E. coli* ekilen besiyerleri ise kontrol amacı ile kullanılmıştır(Nautiyal, 1999). Bakterilerin çözdüğü P'yi hesaplamak için besiyerindeki bakterileri, suda çözülmeyen katı maddeleri ve Ca₃(PO₄)₂'yi çöktürmek amacı ile tüpler 10.000 dev. dak.⁻¹'de 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant elde edilmiştir. Supernatant kısımdan pipet yardımı ile 1 ml alınarak 10 ml'lik yeni tüplere aktararak üzerine 9 ml saf su eklenerek seyreltilmiştir. Oluşan karışım üzerine 1 ml Barton çözeltisi eklendikten sonra 30 dak. karanlık ortamda 25±1°C'de inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik analizler için stok fosfor çözeltisi ile farklı ppm dozlarında (0, 10, 25, 50, 100, 200 ppm) beş standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 430 nm'de ölçülmüş ve absorbans

değerleri kaydedilmiştir. Karanlık ortamda inkübe edilen çözeltilerde çözünmüş halde ne kadar fosfor bulunduğu 430 nm'de spektrofotometrede ölçülerek elde edilen absorbans değerleri, standart çözeltilerin absorbans değerleri ile kıyaslanarak çözünen P değerleri ppm düzeyinde hesaplanmıştır(Barton, 1948).

Bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS sisteminde tanımlanması

Yüksek miktarda fosfor çözen 15 adet bakteri izolatının tanısı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) mikroorganizma tanımlama cihazı kullanılarak yapılmıştır. MALDI-TOF MS son yıllarda mikrobiyolojik tanılamada hızlı ve güvenilir olan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süreli kütle spektroskopisi cihazıdır(Ahmad ve ark., 2012). MALDI-TOF sistemi doğrudan bakteriden lazer ile elde edilen protein profillerinin cihaz tarafından kütüphanesinde tanımlı izolatlar ile karşılaştırılma prensibine dayanan en son teknolojik bir tanılama sistemidir. Saf kültürden alınan ve katı TSA besi ortamında gelişen 1 günlük bakteri kolonisinden alınan örnekler ethanol/formik asit yöntemi ile muamele edildikten sonra (Pavlovic ve ark., 2012) cihazın örnek tablasına yüklenerek cihazın kütüphanesindeki mikroorganizmalar ile BioTyper™ 1.1 software (BrukerDaltonics, Bremen, Almanya) yazılımı ile karşılaştırılarak teşhisleri yapılmıştır. Tanılama sonucunda, yüksek olasılıklı tür teşhisi; 2 000-3 000(yeşil renk), cins düzeyinde ve muhtemel tür düzeyinde teşhis; 1 700-1 999 (sarı renk) arasındaki skala değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir(Uysal ve ark., 2008).

Fosfat çözünürlüğü, pH ve organik asitlerin tanımlanması

Fosfor çözücü bakteriler tarafından sentezlenen organik asit çeşidi, miktarı ve ortam pH'sının fosfat çözünürlüğü üzerine etkisini belirlemek için, TCP içeren sıvı NBRIP besi ortamına 10⁸ CFU ml⁻¹ yoğunluktaki bakterilerden 100 µl inoküle edilmiştir. İnkübatörde 27±1°C'de inkübasyona bırakılan bakteri kültürlerinin pH'ya etkisini belirlemek için, inkübasyonun 10. gününde sıvı besiyerinin pH'sı, pH metrenin(Hanna - pH 211) probunun alkol(% 70) ile dezenfekte edilerek besiyerine daldırılarak ölçülmesi ile kaydedilmiştir. NBRIP besi ortamındaki, suda çözülmeyen katı maddeleri ve çözünmemiş halde bulunan kalan TCP'yi çöktürmek amacı ile tüpler 10.000 dev dak

¹'da 10 dakika santrifüj(Hermle Z206A) 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 kâğıdından, 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 Inertsil ODS-3, C18 (4.6x250 mm) kolon(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ABD), kullanılmış ve cihaz CBM-20 Alite paket program içeren bilgisayarla kumanda edilmiştir. Dedektör 190 ve 800 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. Çalışmada mobil faz olarak 0.45 µm membran filtreden geçirilen % 5'lik 1 mL dak⁻¹ 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, cihaza okutulan organik asit standartlarından oluşan pikleri ile karşılaştırılarak

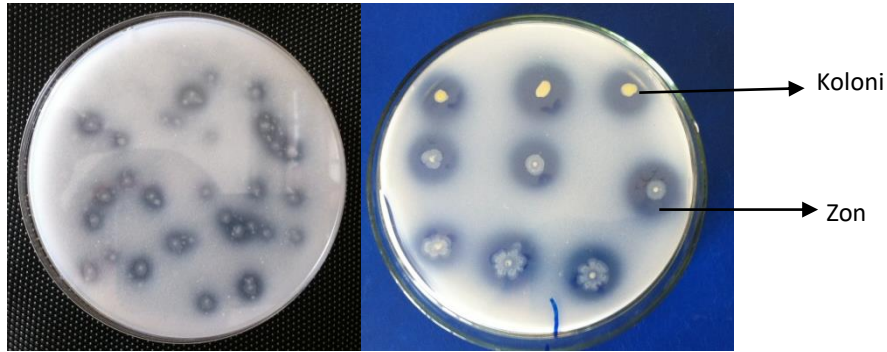
organik asit tayini yapılmıştır. Elde edilen değerler ppm cinsinden hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz

Araştırmadan elde edilen verilerin varyans analizi ve gruplar arasındaki karşılaştırmalar (Duncan testi) SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Spss, 2011). Grupların etkileri (önemlilikleri) p<0.05 önem düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Fosfor çözücü bakterilerin izolasyonu Amasya ili Suluova ilçesinde tarımı yapılan 35 adet bitkinin kök çevresindeki topraktan yapılmıştır. Alınan toprak örneklerinden elde edilen 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ dilüsyon sıvılarının katı NBRIP besi ortamına yüzeysel ekilmesi ile koloni çevresinde farklı miktarda zon oluşturan 117 adet fosfor çözen bakteri izolatu elde edilmiştir(Şekil 1). İzolatın fosfor çözme indekslerinin ise 1.08-6.78 arasında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 1. Fosfor çözen bakterilerin katı NBRIP besi ortamında oluşturduğu zonlar(a) ve izolatların fosfor çözme indekslerinin belirlenmesi(b)

P çözünlülüğü ve pH

Bakterilerin ppm cinsinden P çözünlülüğünün belirlenmesinde sıvı NBRIP besi ortamında 10 gün inkübasyonundan besi ortamındaki hücre yoğunlukları, pH ve çözülmüş P konsantrasyonları ölçülmüş hesaplanmıştır (Çizelge 1). TCP içeren sıvı ortamda ortamın pH'sının 6.8-7.0'den 5.7-4.5'ye kadar belirgin bir şekilde düştüğü belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının sıvı ortamda çözdüğü P konsantrasyonu ise, farklı izolatlar arasındaki 35.6 ve 387.9 mg L⁻¹ arasında değiştiği belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan *E.coli* uygulamasında ise ortamın pH sı 6.6 olarak ölçülmüştür ve çözülmüş P konsantrasyonu 15.1 mg L⁻¹ olarak hesaplanmıştır. İzolatlar arasında en fazla P çözme miktarına sahip *Enterobacter cancerogenus* (387.9 mg L⁻¹) ardından *Enterobacter ludwigii* (383.1 mg L⁻¹) olarak belirlenip ve bu iki

izolatın bulunduğu ortamın pH'sı en fazla düşüş göstererek 4.5 olarak ölçülmüştür. Seçilen izolatlar arasında en düşük fosfor çözme miktarına sahip (304.7 mg L⁻¹) *Microbacterium liquefaciens* izolatu olarak belirlenmiş ve ortamın pH'ı ise seçilen diğer bakterilerin ortam pH'sına göre daha yüksek olduğu(5.7) belirlenmiştir. Buna bağlı olarak pH ile çözülmüş P konsantrasyonu arasında güçlü bir negatif korelasyon gözlemlenmiştir. Hücre yoğunlukları ve çözünen P konsantrasyonu arasında da pozitif korelasyon gözlemlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan *E. coli* izolatının P çözme özelliği çok düşük olduğundan dolayı hücre yoğunluğu artmasına rağmen çözülmüş P konsantrasyonu 15.7 mg L⁻¹ olarak kaydedilmiştir.

Bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS sisteminde tanımlanması

Sıvı besi ortamında yüksek miktarda P çözen ve tanısı yapılan 15 izolatın MALDI-TOF MS analizlerinde skor değerleri incelendiğinde, bu 15 türün yüksek olasılıklı olarak; *Enterobacter cloacae*(2), *Enterobacter cancerogenus*,

Enterobacter ludwigii, *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Microbacterium laevaniformans*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Lelliottia amnigena*, *Agromyces rhizosphaerae*, *Agromyces cerinus*, *Arthrobacter tecti*, *Microbacterium hominis* ve *Microbacterium liquefaciens* şeklinde belirlenmiştir(Çizelge 1).

Çizelge 1.Yüksek miktarda P çözen mikroorganizmaların P çözme indeksleri, sıvı ortamda çözdüğü P miktarı ortam pH sı, hücre yoğunlukları ve MALDI-TOF MS tanı sonucu

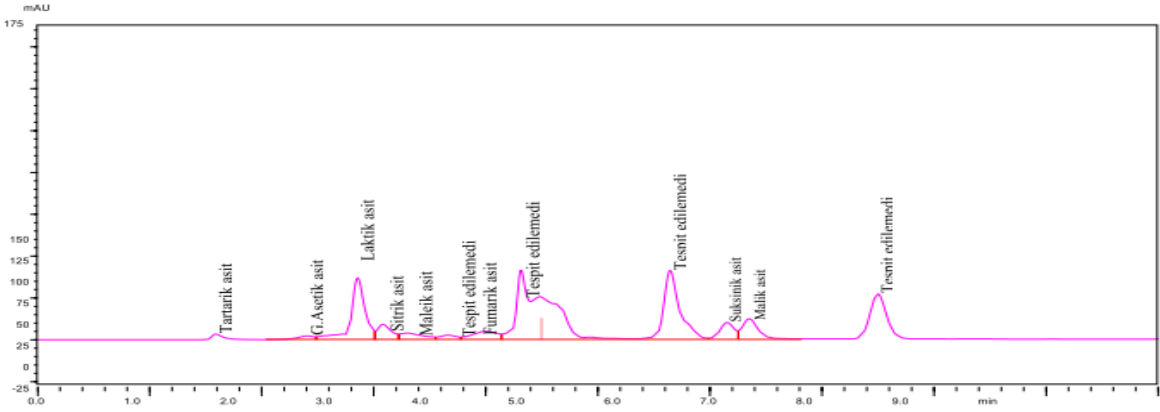
İzolat no	MALDI-TOF MS tanılama sonucu	NCBI No	İzole edildiği bitki	MALDI TOF MS değeri	P Çözme indeksi	P çözme miktarı (mg L ⁻¹)	pH	Hücre yoğunluğu (log CFU ml ⁻¹)
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	0	15,7±0.7 ^a	6.6	5.9
12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	69218	Soğan	2.417	1.35	387.9±1.4 ^j	4.5	6.3
14	<i>Enterobacter ludwigii</i>	550	Soğan	2.189	1.42	383.1±1.1 ^h	4.5	5.9
25	<i>Enterobacter asburiae</i>	61645	Soğan	2.653	1.69	380.5±0.6 ^h	4.7	6.0
26	<i>Citrobacter koseri</i>	545	Mısır	2.137	1.65	378.4±1.5 ^h	4.9	5.7
44	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1282	Şeker pancarı	2.354	1.70	373.8±1,02 ^g	5.1	5.8
63	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	36807	Buğday	2.149	1.70	368.2±1,4 ^f	5.1	5.9
70	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	53406	Buğday	2.568	1.72	366.3±1,2 ^f	5.3	5.8
75	<i>Lelliottia amnigena</i>	61646	Mısır	2.351	1.80	356.7±1,09 ^e	5.4	5.7
96	<i>Agromyces rhizosphaerae</i>	88374	Şeker pancarı	2.146	1.95	353.1±1,8 ^e	5.4	5.5
102	<i>Agromyces cerinus</i>	232089	Şeker pancarı	2.294	1.96	356 ±2,1 ^e	5.4	5.5
105	<i>Arthrobacter tecti</i>	271433	Soğan	2.527	1.90	353.5±1,1 ^e	5.4	5.6
112	<i>Enterobacter cloacae</i>	550	Mısır	2.341	2.1	352,8±1,4 ^e	5.4	5.3
113	<i>Microbacterium hominis</i>	162426	Mısır	2.194	2.5	340,1±2.2 ^d	5.6	5.3
115	<i>Enterobacter cloacae</i>	550	Soğan	2.651	2.78	334.2±2.4 ^c	5.6	5.0
117	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	33918	Soğan	2.257	2.96	304.7±2.08 ^b	5.7	4.9

* Elde edilen değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Her sütundaki aynı harf içeren veriler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre p<0.05 önem düzeyine göre aradaki fark önemli değildir.

Bakterilerin organik asit üretimleri

Bakterilerin P çözmede en önemli mekanizması olan organik asitlerin tayininde HPLC de elde edilen pikler, hazırlanan standart organik asit çözeltilerinden elde edilen pikler ile karşılaştırıldığında izolatların sekiz farklı organik asit(Fumarik asit, Laktik asit, Tartarik asit, Malik

asit, Sitrik asit, Glasiyel asetik asit, Suksinik asit ve Maleik asit)'i farklı oranlarda sentezlediği saptanmıştır(Şekil 2). İzolatların çoğu, birden farklı organik asit sentezlediği ve tespit edilemeyen farklı organik asitler sentezlediği tespit edilmiştir (Çizelge 2). HPLC analizi yapılan izolatların özellikle diğer organik asitlere göre yüksek miktarda laktik asit salgıladığı tespit edilmiştir.



Şekil 2. *Enterobacter cancerogenus* izolatının salgıladığı organik asitlerin belirlenmesinde oluşan HPLC pikleri

İzolatlar arasındaki P çözme değeri en fazla olan *E. cancerogenus*, *E. ludwigii*, *E. asburiae* ve *Citrobacter koseri* izolatları en fazla çeşitte ve miktarda organik asit sentezlediği ve buna bağlı olarak pH düzeylerinin en düşük olduğu belirlenmiştir. P çözme değeri en küçük olan *Microbacterium liquefaciens* izolatı ise en az çeşitte ve miktarda organik asit sentezlediği ve ortamın pH'sının diğer ortamlara göre yüksek bir değer olan 5.7 olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda üretilen toplam organik asit miktarı ile pH arasında negatif

bir korelasyon gözlemlenmiştir. Belirlenen organik asitlerden, tartarik asit (0.923 mg ml^{-1}) ve sitrik asit (0.785 mg ml^{-1}) *Microbacterium laevaniformans*; Laktik asit (5.128 mg ml^{-1}), Malik asit (1.854 mg ml^{-1}), Fumarik asit (0.997 mg ml^{-1}), Maleik asit (0.098 mg ml^{-1}) ve Suksinik asit (1.100 mg ml^{-1}) *Enterobacter cancerogenus*; Glasiyal asetik asit 0.986 mg ml^{-1} ile *Microbacterium hominis* izolatları tarafından diğer izolatlara göre daha fazla salgılanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Fosfat çözücü izolatların NBRIP besiyerine salgıladıkları organik asit çeşitleri ve miktarlarının HPLC analizi

İzolatlar	Organik Asitler (mg ml^{-1})								Toplam Organik asit (mg ml^{-1})
	TA	LA	GAA	SA	SUA	MA	FA	MLA	
<i>E. cancerogenus</i>	0.538	5.128	0.258	0.785	1.100	1.854	0.997	0.098	10.758
<i>E. ludwigii</i>	0.747	4.184	0.256	0.198	0.987	0.984	0.652	0.035	8.043
<i>E. asburiae</i>	0.697	3.583	0.769	0.251	0.458	0.851	0.745	0.036	7.390
<i>C. koseri</i>	0.514	3.415	0.458	0.652	0.458	0.745	0.681	0.078	7.027
<i>S. epidermidis</i>	0.622	2.144	0.785	TE	0.886	1.254	0.854	0.025	6.570
<i>M. laevaniformans</i>	0.923	2.191	0.148	0.785	0.652	0.654	0.745	0.025	6.123
<i>P. anguilliseptica</i>	TE	3.784	0.369	0.345	0.782	0.987	0.257	0.047	6.571
<i>L. amnigena</i>	0.643	2.321	TE	0.458	0.651	0.358	0.652	0.045	5.128
<i>A. rhizosphaerae</i>	0.838	1.845	0.412	0.651	0.128	0.254	0.165	0.014	4.307
<i>A. cerinus</i>	0.658	1.998	0.457	0.365	0.356	0.587	0.198	0.014	4.633
<i>Arthrobacter tecti</i>	0.287	0.939	0.845	0.354	TE	0.542	0.754	0.098	3.819
<i>E. cloacae</i>	TE	2.114	0.357	0.415	0.198	0.364	0.368	0.035	3.881
<i>M. hominis</i>	TE	1.121	0.986	0.740	0.637	0.146	0.147	0.036	3.813
<i>E. cloacae</i>	0.817	1.697	0.364	0.154	0.214	0.168	0.197	0.035	3.646
<i>M. liquefaciens</i>	0.581	0.652	0.148	TE	0.457	0.642	0.485	TE	2.964

TA:Tartarik asit, LA:Laktik asit, GAA:Glasiyel asetik asit, SA:Sitrik asit, SUA:Suksinik asit, MA:Malik asit, FA:Fumarik asit, MLA:Maleik asit, TE:Tespit edilemedi.

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuç, bitkilerin rizosferik topraklarında farklı cinste fosfat çözen bakterilerin varlığını tespit edilmiştir.

Çalışmada fosfor çözen bakterileri hızlı bir şekilde belirlenmesinde doğrudan katı NBRIP besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri fosfor çözen bakterilerin

hızlı bir şekilde belirlemek için kullanılan besiyeri çeşididir(Marra ve ark., 2019). Küsek (2007), asma kök bölgesindeki fosfor çözen bakterilerin izolasyonu ve seçiminde katı NBRIP besi ortamı kullanmıştır. Mardad ve ark. (2013) inorganik fosfatın çözünürlüğü üzerine yaptıkları bir çalışmada topraktan izole ettikleri bakterilerin fosfor çözme indekslerini farklı miktarlarda olduğunu hesaplamışlardır. Literatür çalışmalarında bakteri izolatlarının fosfor çözme indeksi bölgeden bölgeye, izolattan izolata değişiklik göstermektedir ve çalışmamızı destekler yönde sonuçlara ulaşılmıştır.

Mikroorganizmaların P çözme miktarlarının nicel olarak belirlenmesinde sıvı NBRIP besi yeri kullanılmaktadır(Santana ve ark., 2019). Kapri ve Tewari (2010) farklı bitki köklerinden izole ettikleri *Trichoderma spp.*'nin *in vitro*'da ne kadar fosfor çözdüğünü sıvı NBRIP besi ortamı kullanarak nicel olarak araştırmışlardır. Yaptığımız çalışmada literatüre uygun olarak izolatların nicel olarak çözdüğü P'nin belirlenmesi için sıvı NBRIP besi ortamı kullanılmıştır. Sıvı NBRIP besi ortamına inoküle edilen 117 adet izolat arasından en fazla fosfor çözme özelliği olan 15 adet izolatın fosfor çözme özellikleri istatistik olarak kontrol uygulaması ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Sıvı NBRIP besi ortamına çözdüğü fosfor değerinin hesaplanmasında 15 adet izolatın çözdüğü fosfor miktarı kontrol uygulama olan *E. coli* uygulaması ile karşılaştırıldığında aradaki farkın tüm izolatlar için istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır($p < 0.05$). İzolatların fosfor çözme değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise izolatlar arasında farklılıklar olabileceği belirlenmiştir. Kumar ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada bezelye bitkisinin kök kısmından izole ettikleri 30 bakteri izolatının fosfor çözme özelliklerini belirlemek için sıvı NBRIP besi ortamı kullanmışlardır. Beş günün sonunda yapılan fosfor analizinde çözülen fosfor miktarının en fazla 562,34 ppm ile FBJ6 kodlu *Pseudomonas spp.* izolatı olduğunu tespit etmişlerdir.

Mikroorganizmaların P çözme özellikler salgıladıkları organik asit miktarları ile ilişkilendirilmektedir, organik asitlerin ortamın pH'sını düşürerek P'un çözünmesini sağlamaktadır (Kpombekou-a ve Tabatabai 1994). Benzer şekilde mikroorganizmalar tarafından yapılan fosfat çözülmesinin organik asitlerin üretimi ile ilişkili olduğu teyit edilmektedir(Halder ve ark., 1990; Goldstein ve ark., 1999; Kim ve ark., 1998). Çözünen P konsantrasyonu ve pH arasındaki

negatif korelasyon, izolatlar tarafından üretilen organik asit ile, P çözünmeyi kolaylaştıran ortamın aktivasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda pH ile çözülmüş P konsantrasyonu arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir(Illmer ve Schinner, 1995). Hwangbo ve ark. (2003) çalışmalarında çim kökünden izole ettikleri *Enterobacter intermedium* izolatının fosfor çözmede en önemli mekanizmasının glukonik asit ve 2-ketoglukonik asit olduğunu HPLC ile belirlemişlerdir. Ayrıca 10 gün inkübasyon sonunda pH'nın 8'den belirgin bir şekilde 2.8'e kadar düştüğü belirtilerek, P çözülmesinin pH ile ters orantılı olduğunu saptamışlardır. *Enterobacter asburiae* izolatının fosfor çözme özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise Gyaneshwar ve ark. (1999) izolatın glukonik, suksinik ve asetik asit organik asitlerini sırası ile 55, 12.7 ve 0.42 mM salgıladıklarını HPLC ile belirlemişlerdir. Çalışmamızda bu izolatın ayrıca; tartarik asit, laktik asit, glasiyel asetik asit, sitrik asit, suksinik asit, malik asit, fumarik asit ve maleik asit salgıladığı belirlenmiştir. Lee ve ark. (2019) *Enterobacter ludwigii* izolatı fosfor çözmede en önemli mekanizma olarak sitrik asit($113.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), laktik asit($20.3 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve asetik asit($109.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda Fosfor çözücü izolat olarak belirlenen *Acinetobacter rhizosphaerae BIHB723*'in; P çözümünde özellikle glukonik asit, formik asit, oksalik, laktik asit, formik asit, malik asit salgılamasından kaynaklandığını belirten çalışmada Gulati ve ark. (2010), P çözümünün artması ile pH'nın azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, mikroorganizmalar arasında besiyerine salgılanan toplam organik asit miktarı en fazla $10.758 \text{ mg mL}^{-1}$ ile fosfat çözme değeri en yüksek(387.9 mg L^{-1}) olan *Enterobacter cancerogenus* izolatı olmuştur. Bu izolatı 8.043 mg mL^{-1} ile *Enterobacter ludwigii* ve 7.390 mg mL^{-1} ile *Enterobacter asburiae* izolatları izlemiştir. İzolatlar arasında en düşük 2.964 mg mL^{-1} organik asit salgısı ise fosfor çözme değeri en düşük(304.7 mg L^{-1}) olan *Microbacterium liquefaciens* uygulaması olmuştur. *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter asburiae* izolatları tarafından Tartarik asit, Laktik asit, Glasiyel asetik asit, Sitrik asit, Suksinik asit, Malik asit, Fumarik asit ve Maleik asit organik asitlerinin farklı miktarda salgılandığı tespit edilmiştir. *Microbacterium liquefaciens* izolatında ise sitrik asit ve maleik asit tespit edilememiştir. Vyas ve Gulati (2009) yaptığı çalışmada topraktan izole

ettiği *Pseudomonas* spp. izolatlarının fosfor çözme mekanizmasında özellikle oksalik asit ve glukonik asit önemli rol oynadıklarını belirtip, diğer asitler olan; laktik asit, suksinik asit, formik asit, sitrik asit ve malik asite göre daha fazla üretildiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise izolatların genel olarak en fazla salgıladıkları organik asit çeşidi laktik asit olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, farklı izolatların farklı cinsten ve miktarda organik asit ürettiğini göstermektedir. HPLC analizinde izolatların salgıladıkları toplam organik asit miktarları ve çözünen P miktarı ve arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiş iken ortam pH ile negatif korelasyon gözlemlenmiştir. Çalışmada fosfat çözen mikroorganizma olarak belirlenen izolatlar tarafından HPLC ile belirlenen çeşitli organik asit salgılanması sonucu ortamın pH'sının düştüğü ve buna bağlı olarak fosfat çözünürlüğünün arttığı belirlenmiştir.

Fosforun toprakta çözünür konsantrasyonu oldukça düşük olup ve bitki büyümesini sınırlayan en önemli element olmasının yanında, bitki tarafından alınabilir formda olmadığından çözünürlüğü önem arz etmektedir (Vassilev ve Vassileva, 2003). Yaptığımız çalışmaya benzer yapılan bir çalışmada Chen ve ark. (2006) topraktan izole ettikleri 36 adet fosfat çözen mikroorganizmanın farklı oranlarda fosfor çözdüğünü ve izolat türüne göre fosfat çözmede farklı miktarlarda organik asit salgıladıklarını HPLC ile tespit etmişlerdir. Fosfor çözen *Aspergillus flavus*, *Penicillium canescens* ve *A.niger* ile besiyerinin pH'sını en fazla düşüren bakteri izolatlarının fosfat çözme mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada (Rashid ve ark.,2004) salgılanan organik asit miktarlarını ve çeşitlerini HPLC ile glukonik, fumarik, suksinik ve asetik asit olarak analiz etmişlerdir. İzolatlar arasında 10RB

izolatının 2.2747 mg ml⁻¹ ile en fazla organik asit ürettiğini saptamışlardır. Glukonik asit P çözücü mikroorganizmalar tarafından en fazla salgılanan organik asit olarak kabul edilmektedir (An ve Moe, 2016). *B. liqueniformis* ve *B. amyloliquefaciens* türleri laktik, izovalerik, izobütirik ve asetik asit karışımlarını üretebilmektedir (Joshi ve ark., 2014). P çözücü bakterilerin kültür ortamlarına; sitrik, suksinik, laktik, oksalik, maleik, fumarik, ve tartarik asit gibi organik asitleri salgıladığı ifade edilmiştir (Zaheer ve ark., 2019).

Sonuç ve Öneriler

Yapılan çalışmada toprakta çözünmez formda olan fosfatı toprakta çözen bakterilerin farklı türleri belirlenmiştir. Belirlenen türlerin MALDİTOF MS cihazıyla tanımlanması ile bu alanda çalışan araştırmacılar için önemli bir veri sağlamaktadır. Mevcut çalışmada kullanılan izolatların *in vitro* ortamda bir çok organik asiti farklı miktarlarda sentezlemekte, ortamın pH'sını düşürerek trikalsiyum fosfatın çözünmesini sağladığı sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma ile organik asit üretimlerini literatür çalışmalarında tespit edemediğimiz bazı izolatların (*Microbacterium liquefaciens*, *Microbacterium hominis*, *Arthrobacter tecti*, *Agromyces cerinus*) organik asit üretimleri belirlenmiştir. Yapılacak olan ileriki çalışmalar ile P çözücü mikroorganizmaların fosfat çözmede başka mekanizmalarının araştırılması gerekmekte ve izolatların tarla koşullarında çözdüğü fosfor belirlenerek bitkilerin P alımına etkisinin araştırılması gerekmektedir.

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

Kaynaklar

- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., ve Romero, H. M. 2014. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80: 26-33.
- Adesemoye, A. O. ve Kloepper, J. W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1): 1-12.
- Ahmad, F., Babalola, O. O. ve Tak, H. I. 2012. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection

technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4): 1247-1255.

- An, R. ve Moe, L. A. 2016. Regulation of Pyrroloquinoline Quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(16): 4955-4964.
- Banik, S. ve Ninawe, A. 1988. Phosphate solubilising microorganisms and sediments of a tropical estuary and the

- adjacent coastal Arabian Sea in relation to their physicochemical properties. *Journal of the Indian Society of Coastal Agricultural Research*, 6: 75-85.
- Barton, C. J. 1948. Photometric analysis of phosphate rock. *Analytical Chemistry*, 20(11): 1068-1073.
- Bar-Yosef, B., Rogers, R., Wolfram, J. ve Richman, E. 1999. Pseudomonas cepacia-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Science Society of America Journal*, 63(6): 1703-1708.
- Bektaş, İ. 2020. Toprakta Laktik Asit ve Fumarik Asit Salgılayan Önemli Bazı Fosfat Çözücü Fungusların Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 30(3): 585-592.
- Bevilacqua, A. ve Califano, A. 1989. Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 54(4): 1076-1076.
- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W.-A. ve Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1): 33-41.
- Gaffaroğlu, S., Horuz, S. ve Aysan, Y. 2019. Farklı Bitki Besleme Programlarının Domates Gövde Çürüklüğü (Pectobacterium carotovorum) Hastalığına Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(2): 263-270.
- Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 12(2): 185-193.
- Goldstein, A. H., Braverman, K. ve Osorio, N. 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(4): 295-300.
- Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V. ve Prasad, R. 2010. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by Acinetobacter rhizosphaerae strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology*, 192(11):975-983.
- Gyaneshwar, P., Parekh, L., Archana, G., Poole, P., Collins, M., Hutson, R. ve Kumar, G. N. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by Enterobacter asburiae. *FEMS Microbiology Letters*, 171(2): 223-229.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. ve Poole, P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245(1):83-93.
- Halder, A. ve Chakrabartty, P. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by Rhizobium. *Folia Microbiologica*, 38(4): 325-330.
- Halder, A., Mishra, A., Bhattacharyya, P. ve Chakrabartty, P. 1990. Solubilization of rock phosphate by Rhizobium and Bradyrhizobium. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36(2): 81-92.
- Hwangbo, H., Park, R. D., Kim, Y. W., Rim, Y. S., Park, K. H., Kim, T. H., Suh, J. S., ve Kim, K. Y. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by Enterobacter intermedium. *Current Microbiology*, 47(2):87-92.
- Illmer, P. ve Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3): 257-263.
- İdikut, L. ve Yıldız, Ş. 2018. Birinci Ürün Mısırdaki Farklı Dozlarda Fosfor Uygulamasının Tane Verimi ve Bazı Verim Unsurlarına Etkisinin Kahramanmaraş Koşullarında Araştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(2): 211-221.
- Johri, J.K., Surange, S. ve Narula, C. S. 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39(2): 89-93.
- Joshi, P., Joshi, G. K., Mishra, P. K., Bisht, J. K. ve Bhatt, J. C. 2014. Diversity of cold tolerant phosphate solubilizing microorganisms from North Western Himalayas. In "Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture", pp. 227-264. Springer.
- Kapri, A. ve Tewari, L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric Trichoderma spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3): 787-795.
- Kim, K. Y., Jordan, D. ve McDonald, G. 1998. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil*

- Biology and Biochemistry, 30(8-9): 995-1003.
- Kpombekou-a, K. ve Tabatabai, M. 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 158(6): 442-453.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. ve Negi, S. 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent research in science and technology*, 4(1): 1-5.
- Küsek, M. 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*' in tanılanması ve mücadele olanaklarının araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Lee, K.-E., Adhikari, A., Kang, S.-M., You, Y.-H., Joo, G.-J., Kim, J.-H., Kim, S.-J., ve Lee, I.-J. 2019. Isolation and characterization of the high silicate and phosphate solubilizing novel strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that promotes growth in rice plants. *Agronomy*, 9(3): 144.
- Liu, S.-t., Lee, L.-y., Tai, C.-y., Hung, C.-h., Chang, Y.-s., Wolfram, J. H., Rogers, R., ve Goldstein, A. H. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174(18): 5814-5819.
- Mardad, I., Serrano Delgado, A. ve Soukri, A. 2013. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8): 626-635.
- Marra, L. M., de Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., Olivares, F. L. ve 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(3): 232-242.
- Mirik, M. 2005. Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1): 265-270.
- Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. ve Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182(2): 291-296.
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A. N., Sing, A., Busch, U. ve Huber, I. 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiology Letters*, 328(1): 46-53.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. ve Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*, 7(2): 187-196.
- Rodríguez, H. ve Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5): 319-339.
- Santana, C., Piccirillo, C., Pereira, S., Pullar, R., Lima, S. ve Castro, P. 2019. Employment of phosphate solubilising bacteria on fish scales—Turning food waste into an available phosphorus source. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5): 103403.
- Sharpley, A. N. 1995. Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. *Ecological Engineering*, 5(2-3): 261-279.
- Spss, I. 2011. IBM SPSS statistics for Windows, version 20.0. New York: IBM Corp 440.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, E.M., Kara, M. ve Soylu, S. 2018. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of some plant fungal pathogenic species. *International Agricultural Science Congress*. 09-12 May Van/Turkey.
- Vassilev, N. ve Vassileva, M. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6): 435-440.
- Vassilev, N., Vassileva, M. ve Nikolaeva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2): 137-144.

- Vyas, P. ve Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9(1): 174.
- White, P. F., Nesbitt, H. J., Ros, C., Seng, V. ve 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(1): 51-63.
- Zaheer, A., Malik, A., Sher, A., Qaisrani, M. M., Mehmood, A., Khan, S. U., Ashraf, M., Mirza, Z., Karim, S. ve Rasool, M. 2019. Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5): 1061-1067.