

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem ÖZTÜRKMEN

**PESTİSİTLERİN *Alcaligenes denitrificans* ve *Alcaligenes xylosoxidans* İLE
MİKROBİYAL BOZUNMASININ SPEKTROFOTOMETRİK TESPİTİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PESTİSİTLERİN *Alcaligenes denitrificans* ve *Alcaligenes xylosoxidans* İLE
MİKROBİYAL BOZUNMASININ SPEKTROFOTOMETRİK TESPİTİ**

Özlem ÖZTÜRKMEN

YÜKSEK LİSANS

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 11/10/2005 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....

Doç. Dr. Sadık DİNÇER

Danışman

İmza.....

Doç. Dr. Hatice GÜVENMEZ

Üye

İmza.....

Doç. Dr. M. Macit İLKİT

Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2003YL39

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PESTİSİTLERİN *Alcaligenes denitrificans* ve *Alcaligenes xylosoxidans* İLE MİKROBİYAL BOZUNMASININ SPEKTROFOTOMETRİK TESPİTİ

Özlem ÖZTÜRKMEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Sadık DİNÇER

Yıl: 2005 Sayfa: 72

Jüri: Doç. Dr. Sadık DİNÇER

Jüri: Doç. Dr. Hatice GÜVENMEZ

Jüri: Doç. Dr. Mehmet Macit İLKİT

Bu çalışmada bölgemizde yaygın olarak kullanılan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) herbisitinin, Na-Montmorillonit (MM), Ca-MM ve MM üzerine adsorbsiyonu ve topraktan izole edilen iki *Alcaligenes* türü ile biyo parçalanması araştırılmıştır.

2,4-D'nin, Na-MM, Ca-MM ve MM üzerine adsorbsiyonu başarıyla yapılmıştır. 2,4-D'nin Na-MM'den ilk 72 saatte desorbe olduğu sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile belirlenmiştir. Ca-MM için 2,4-D, 72. saatten sonra desorbe olmuştur ve MM için ise 2,4-D başlangıçta Minimal tuz besiyerine desorbe olduğu miktarı korumuştur. Çalışmalar, zamana bağlı olarak 2,4-D abiyotik parçalanmaya uğramadığını göstermiştir.

Topraktan izole edilen *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans* bakterileri API 20NE test kiti ile tanımlanmış ve çalışmalarda kullanılmıştır. 2,4-D'nin *Alcaligenes xylosoxidans* bakterisi ile parçalanması çalışmalarında Na-MM'e adsorbe olmanın bakterinin herbisiti parçalamasını %70.8 oranında, Ca-MM'e adsorbe olması %76.4 oranında ve MM'e adsorbe olması %61.6 oranında azalttığı gözlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans* bakterisi için 2,4-D'nin Na-MM'e adsorbe olması bakterinin herbisiti parçalamasını %71.0 oranında, Ca-MM'e adsorbe olması %77.2 oranında ve MM'e adsorbe olması %86.1 oranında azalttığı gözlenmiştir.

2,4-D'nin Minimal tuz besiyerinden azalışını tayin etmek için örnekler etil asetat ile ekstrakte edilmiş ve UV spektrofotometrede 282 nm'de okunmuştur.

Minimal tuz besiyerinde 2,4-D *Alcaligenes xylosoxidans* tarafından %28.4 oranında biyo parçalanmaya uğrarken, *Alcaligenes denitrificans* bakterisi tarafından %25.9 oranında biyo parçalanmaya uğradığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: 2,4-D, *Alcaligenes* sp., Adsorpsiyon, Montmorillonit, Biyolojik Parçalanma

ABSTRACT

MSc THESIS

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION of PESTICIDE BIODEGRADATION by *Alcaligenes denitrificans* and *Alcaligenes xylosoxidans*

Özlem ÖZTÜRKMEN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof Dr. Sadık DİNÇER

Year: 2005 Page: 72

Jury : Assoc. Prof Dr. Sadık DİNÇER

Jury : Assoc. Prof Dr. Hatice GÜVENMEZ

Jury : Assoc. Prof Dr. Mehmet Macit İLKİT

In this study, adsorption of 2,4-D a common used herbicide in our region on Na-Montmorillonite (MM), Ca-MM and MM and biodegradation by two *Alcaligenes* species isolated from soil were studied.

2,4-D, was successfully absorbed on Na-MM, Ca-MM and MM. 2,4-D desorption from Na-MM in the first 72 hours was determined by liquid-liquid extraction. For Ca-MM 2,4-D desorbed after 72 hours and for MM 2,4-D protected its amount in the minimal medium which was desorbed in the beginning. Studies showed that, depending on time, 2,4-D didn't undergo abiotic degradation.

Alcaligenes xylosoxidans and *Alcaligenes denitrificans* bacteria which were isolated from soil identified by API 20NE and used for the studies. 2,4-D biodegradation studies with *Alcaligenes xylosoxidans* adsorption of 2,4-D on Na-MM reduced 70.8%, Ca-MM reduced 76.4% and MM reduced 61.6% of biodegradation was determined and for *Alcaligenes denitrificans* adsorption of 2,4-D on Na-MM reduced 71.0%, Ca-MM reduced 77.2% and MM reduced 86.1% of biodegradation was determined.

Samples were extracted with ethyl acetate and read on UV spectrophotometer 282 nm to determine the reduce of 2,4-D from minimal medium.

The rate of 2,4-D biodegradation in mineral medium by *Alcaligenes xylosoxidans* was 28.4% and the rate of 2,4-D biodegradation in mineral medium by *Alcaligenes denitrificans* was 25.9% observed.

Key Words: 2,4-D, *Alcaligenes* sp., Adsorption, Montmorillonite, Biodegradation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Sadık DİNÇER'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bana inanan, güvenen ve benim için her şeyin yeniden başlamasına vesile olan Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın hocam Doç. Dr. M. Macit İLKİT'e ve Parazitoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın hocam Doç. Dr. İ. Soner KOLTAŞ'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin deney ve yazım aşamalarında benden asla yardımlarını esirgemeyen, çalışkan, başarılı ve insancıl dostlarım Uzman Biyolog Ayşenur KAYA ve Uzman Biyolog Osman GÜLNAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana yardım eden bölümdeki tüm hocalarıma, araştırma görevlilerine ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini benden esirgemeyen, 4 yıl önce tanıştığım, dört yılın dördünde de birlikte harika hatıralar kazandığım, daha nice dört yılları birlikte el ele göğüslemek istediğim canım dostlarım Biyolog Yıldız ŞEKER ve Biyolog Ayşe YURTTAŞ'a yardımlarından ve harika dostluklarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan, beni destekleyen, fikirlerini benimle paylaşan nişanlım Biyolog Tamer YAĞCIOĞLU'na her şey için teşekkür ederim.

Son olarak, bugüne kadar beni destekleyen, çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, hep yanımda olacak olan anneme, babama, kardeşime ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pestisitlerin Tanımı, Tarihçesi ve Kullanım Öyküleri.....	2
1.2. Pestisitlerin Toksisitesi.....	4
1.3. Kirletici olarak Pestisitler.....	5
1.4. Pestisitlerin Çevredeki Davranışları ve Sonları.....	6
1.4.1. Akıbet Süreci.....	7
1.4.1.1. Pestisitlerin Adsorpsiyonu	7
1.4.1.2. Pestisitlerin Taşınması.....	8
1.4.1.3. Pestisitlerin Parçalanması.....	9
1.5. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	11
1.5.1. Klorofenoller.....	12
1.5.2. 2,4- Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4- D)	13
1.5.2.1. 2,4-D'nin Mikrobiyal Parçalanması.....	17
1.6. <i>Alcaligenes</i> Cinsi	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar.....	30
3.1.1.1. GSP Agar.....	30
3.1.1.2. N1 Agar	30
3.1.1.3. N1 Buyyon.....	31
3.1.1.4. Plate Count Agar (PCA)	31
3.1.1.5. Minimal Tuz Besiyeri.....	31
3.1.1.6. Clark-Lups Besiyeri.....	32

3.1.1.7. KIA Besiyeri (Kligler Iron Agar)	32
3.1.1.8. İndol Besiyeri.....	32
3.1.1.9. Kovacs İndol Ayırıcı	33
3.1.1.10. Metil Kırmızısı Ayırıcı	33
3.1.1.11. Kovacs Oksidaz Ayırıcı	33
3.1.1.12. NaCl ve CaCl Çözeltileri.....	33
3.2. Metod.....	34
3.2.1. Toprakta <i>Pseudomonas</i> Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	34
3.2.2. Biyokimyasal Testler.....	34
3.2.2.1. Metil Kırmızısı Testi.....	34
3.2.2.2. İndol Testi.....	34
3.2.2.3. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Oluşturma Testi	34
3.2.2.4. Sıcaklığa bağlı (+4 ve 41°C) Üreme Testi	35
3.2.2.5. Oksidaz Testi	35
3.2.3. Bakterilerin API 20NE ile İdentifikasyonu	35
3.2.4. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi	36
3.2.5. Montmorillonit'in NaCl ve CaCl ile Muamele Edilmesi	36
3.2.6. 2,4-D'nin Montmorillonit'e Yapışması.....	36
3.2.7. 2,4-D'nin Montmorillonit'de ve Minimal Medyumda Abiyotik Parçalanması.....	37
3.2.8. 2,4-D'li Ortamda ve 2,4-D'siz Ortamda Bakteri Gelişimi.....	37
3.2.9. 2,4-D'nin Montmorillonit ve Minimal Medyumda Bakteriyel Parçalanması.....	37
3.2.10. 2,4-D'nin Montmorillonit'den ve Sıvı Besiyerinden Ekstraksiyonu.....	38
3.2.11. 2,4-D'nin Spektrofotometrik Analizi ve Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması.....	38
3.2.12. Desorbsiyon ve Parçalanma Değerlerinin Hesaplanması.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Parçalanma için Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	40
4.2. MIC Sonuçları.....	41
4.3. API 20NE Sonuçları.....	41

4.4. 2,4-D'nin Abiyotik Parçalanması.....	42
4.5. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ile 2,4-D'nin Parçalanması.....	44
4.6. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> 'ın 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamlarda Gelişimi.....	46
4.7. <i>Alcaligenes denitrificans</i> ile 2,4-D'nin Parçalanması.....	48
4.8. <i>Alcaligenes denitrificans</i> 'ın 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamlarda Gelişimi.....	50
4.9. Sıvı Kültürde 2,4-D'nin <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ve <i>Alcaligenes denitrificans</i> Tarafından Parçalanması.....	52
4.10. Sıvı Kültürde 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamda Bakterilerin Gelişimi.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Pestisitlerin önemli sınıfları.....	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi.....	4
Çizelge 1.3. 2,4-D’nin Özellikleri.....	16
Çizelge 1.4. Bazı <i>Alcaligenes</i> Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri.....	22
Çizelge 4.1. Toprakтан İzole Edilen Suşların Biyokimyasal Özellikleri.....	40
Çizelge 4.2. MIC Belirleme Testlerinin Sonuçları.....	41
Çizelge 4.3. A4 ve tP3 Suşlarının API İdentifikasyon Testleri Sonuçları.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. 2,4-D'nin Parçalanma Yolları.....	20
Şekil 3.1. 2,4-D'nin Çalışmada Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi	39
Şekil 4.1. Adsorpsiyon ve Parçalanma Çalışmalarında Kullanılan Deney Düzenegi.....	42
Şekil 4.2. 2,4-D'nin Abiyotik Parçalanması.....	43
Şekil 4.3. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ile Parçalanma Çalışmaları.....	45
Şekil 4.4. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> 'ın 2,4-D'li Ortamda Bakteri Sayıları.....	47
Şekil 4.5. <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> 'ın 2,4-D'siz Ortamda Bakteri Sayıları.....	47
Şekil 4.6. <i>Alcaligenes denitrificans</i> ile Parçalanma Çalışmaları.....	49
Şekil 4.7. <i>Alcaligenes denitrificans</i> 'ın 2,4-D'li Ortamda Bakteri Sayıları.....	51
Şekil 4.8. <i>Alcaligenes denitrificans</i> 'ın 2,4-D'siz Ortamda Bakteri Sayıları.....	52
Şekil 4.9. 2,4-D'nin MSM'da Parçalanması.....	53
Şekil 4.10. 2,4-D'li MSM'da Bakterileri Sayıları.....	53
Şekil 4.11. 2,4-D'siz MSM'da Bakteri Sayıları.....	54

1.GİRİŞ

Günümüz dünyasının en önemli sorunlarından biri de hızla artan dünya nüfusedir. Çünkü, dünya nüfusu gittikçe artmasına karşın; dünyanın yüz ölçümü değişmemektedir. Hatta erozyon, yeni yerleşim yerlerinin açılması, yeni fabrikalar kurulması gibi nedenlerle tarıma elverişli alanlar giderek azalmaktadır. Dünyanın yüz ölçümü sınırlı olduğundan, beslenme ihtiyacını karşılayacak üretim için yeterli alanların tarıma açılması mümkün değildir. O zaman yapılacak iş, birim alandan elde edilecek ürün miktarını arttırmaktır (Dağ ve ark., 2000).

Birim alandan alınan ürün miktarını arttırmak için; verimi yüksek tohum kullanma, uygun toprak işlemesi, iyi sulama ve gübreleme yanında, kültür bitkilerini zararlı organizmalardan korumak için bilinçli bir tarımsal mücadeleye gerek vardır. Hastalık, zararlı ve yabancı otlar kültür bitkilerinde %25-30'a varan bir ürün kaybına neden olmaktadır. Bu kaybı önlemek veya en aza indirmek amacı ile; kültürel önlemler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik adı verilen değişik savaş teknikleri uygulanmaktadır. Ancak, bunlar içinde sonucunun hemen alınabilmesi ve uygulamasının kolay olması nedeni ile kimyasal mücadele diğerlerine göre daha yoğun olarak kullanılmaktadır (Dığrak ve Özçelik, 1998).

Kimyasal mücadele 1940'larda DDT'nin kullanımı ile birden önem kazanmıştır. 1945'lerden itibaren klorlandırılmış hidrokarbonların, organik fosforlu insektisitlerin, karbarillerin tarım alanlarında kullanılmaya başlanması ile pestisit sanayi hızla ilerlemiş ve yeni yeni preparatların piyasaya sürülmesi ile kimyasal mücadele giderek önem kazanmıştır (Zümeroğlu ve ark., 1979).

Bunun sonucu olarak, insan ve hayvanlarda zehirlenmeler, hedef alınmayan yaban hayatı ve yararlı canlı gruplarının öldürülmesiyle tabii dengenin bozulması, havada, suda, toprakta ve gıda maddelerinde ilaç kalıntıları, daha önce ekonomik zararı olmayan bazı canlıların zararlı hale gelmesi, zararlıların bağışıklık kazanması ve kısaca çevre kirlenmesi adı altında bir çok olumsuz etkiler ortaya çıkmıştır (Bora ve Delen, 1981).

1.1. Pestisitlerin Tanımı, Tarihçesi ve Kullanım Öyküleri

Doğada, zararlı canlı yoktur. İnsanoğlu kendi sağlığını, konforunu ya da gıda kaynağını tehlikeye sokan bitki ya da hayvanları zararlılar olarak sınıflandırır. Bu zararlıları kontrol altına almak için pestisitler vardır. Bunlar, “herhangi bir zararlıyı uzaklaştırmak, azaltmak, yok etmek veya engellemek için tasarlanmış” ürünlerdir. Pestisitlerin temel sınıfları kısaca Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Delaplane, 1996).

Daha ayrıntılı olarak pestisitler; besin maddelerinin üretimi ve depolanması sırasında, besin değerini bozan ve bitkilere zarar veren böcekleri, mikroorganizmaları, yabancı otları yok etmek, bununla beraber bitki büyümesini ayarlayıcı, yaprak dökülmesini sağlayıcı (defoliant) ve rutubet alıcı (desikan) olarak kullanılan kimyasal madde veya maddeler karışımına verilen genel isimdir (Dığrak ve Özçelik, 1998).

Çizelge 1.1. Pestisitlerin önemli sınıfları: (Delaplane, 1996).

Pestisit Tipleri	Hedef Zararlı Grubu
Akarisit	Kene, örümcek
Antimikrobiyal	Bakteriler, virüsle, diğer mikroplar
Avenisit	Kuşlar
Fungisit	Funguslar
Herbisit	Yabancı otlar
İnsektisit	Böcekler
Molluskisit	Salyangoz, sümüklü böcek
Nematisit	Nematodlar
Predasit	Omurgalı yırtıcı hayvanlar
Rodentisit	Kemiriciler

Pestisit kullanımı yeni değildir. Antik Romalılar, zararlı böcekleri sülfür yakarak öldürmüşler ve zararlı otları da tuzlarla kontrol etmişlerdir (Delaplane, 1996).

İlk pestisitler fungusit olarak kullanılan kükürt ve yine fungusit ve insektisit olarak kullanılan arsenik, bakır ve demirin basit tuzları gibi inorganik maddelerdir (Yıldız ve ark., 2005).

19. yy sonlarında çiftçiler bakır arsenat, nikotan sülfat ve sülfürü ekin tarlalarındaki zararlı böcekleri kontrol etmek için kullanmışlardır. Fakat sonuçlar çoğunlukla ilkel kimya ve uygulama metotları yüzünden tatmin edici olmamıştır (Delaplane, 1996).

Pestisit kullanımı II. Dünya savaşından sonra yaygınlaşmıştır. İnsektisit olan DDT ve HCH ile hormon karakterli olan herbisitlerden 2,4-D ve MCPA 1940'lı yılların sonunda kullanılmaya başlanmıştır. Bunları, 1950'li yıllarda dieldrin ve aldrin gibi insektisitler takip etmiştir (Yıldız ve ark., 2005).

Bugün dünyada tarım ilacı kullanımı pestisit gruplarına göre dağılımında; herbisitler tarım ilaçları içinde % 47'lik bir payla birinci sırayı almaktadır. Bunu %29 ile insektisitler ve %19'luk payla fungusitler takip etmekte olup, diğer pestisit grupları ise %5'lik bir payı bulunmaktadır (Dağ ve ark., 2000).

Kullanılan pestisitlerin %60'dan fazlası sebzeler ve hububat ekilmiş alanlarda uygulanmaktadır. Global kullanımın %55'i Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da kullanılmaktadır ancak, Doğu Avrupa'da da dikkate değer bir artış gözlenmektedir. Batı Avrupa'da 80 milyon hektarda tarımsal üretim yapılmakta olup bu alanın %50'den fazlasında hububat üretimi yapılmaktadır. Tüm alanlarda herbisit kullanılırken, %60-80'inde fungusit ve %15-98'inde ise insektisit kullanılmaktadır. Batı Avrupa'da hektara düşen pestisit miktarı en yüksek olan ülkeler Hollanda ve Yunanistan'dır. Yıllık pestisit kullanımı iklim koşullarına bağlı olarak sürekli değişmektedir (Yıldız ve ark., 2005).

Ülkemizde ise pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür fakat, entasif (yoğun) tarım yapan Akdeniz, Ege gibi bölgelerin tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Türkiye' de genel olarak az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (Delen ve ark., 2005).

Çizelge 1.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya L)* (Delen ve ark., 2005)

Pestisit Grupları	1979	1987	1994	1996	2002
İnsektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991	3.027.380	2.250.898
Akarsitler	203.107	240.360	192.279	223.857	296.809
Yağlar	1.594.526	2.147.106	2.147.106	2.871.160	2.428.238
Fumigant ve Nemasitler	315.665	322.227	530.738	1.076.661	1.559.489
Rodentisit ve Mollusisitler	5.600	2.124	2.509	3.268	1.794
Fungisitler	1.537.315	2.611.960	2.201.406	2.951.191	1.964.292
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588	3.643.971	3.697.397
TOPLAM	8.395.848	12.112.267	10.871.792	13.797.488	12.198.917

* Göz taşı ve toz kükürt dahil değildir.

Çizelge 1.2’de de görüldüğü gibi 1979’da 8.395.848 kg veya L olan tüketim, 2002’de 12.198.917 kg veya L’ye ulaşmıştır. 22 yıllık sürede ekonomik duruma, hastalık ve zararlıların epidemi yapmasına göre tüketim bazı inişler çıkışlar göstermekle birlikte, tüketimde % 45,29’luk bir artış olmuştur. Bu da ortalama %2,05’lik yıllık artışı göstermektedir. Durum parasal olarak düşünüldüğünde tüketimde değer olarak insektisitlerin %31, herbisitlerin %26 ve fungusitlerin %20’lik payı ortaya çıkmaktadır (Delen ve ark., 2005).

1.2. Pestisitlerin Toksisitesi

Pestisitler genellikle suya karıştırılarak, farklı özelliklere sahip aletlerle, direkt olarak ürünler üzerine uygulanmaktadır. Yer aletleriyle yapılan ilaçlamalar çok yaygın olarak tercih edilmekle birlikte, birçok ülkede havadan ilaçlamalar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı formülasyonlar genellikle üretimin başlangıcında tohum ilacı olarak ya da hasat sonrası depolanan ürünlerde kullanılmaktadır. Granül herbistiler, insektisitler ve fungusitler doğrudan doğruya toprağa uygulanmaktadır.

Pestisitler hedef organizmalarda farklı şekillerde etkili olmaktadır, bu mekanizma çok kompleks olmakla birlikte, hedef organizmadaki toksisite biyokimyasal bir süreç sonunda ortaya çıkmaktadır. Kimyasal maddeler iki tipte toksik etki oluşturlar:

- Akut toksisite; tek bir dozda alındığında kısa sürede ortaya çıkan ve belirtileriyle tanımlanan etki
- Kronik toksisite; uzun bir süreçte, öldürücü doz altındaki tekrarlı alımlarda ortaya çıkan toksisite.

Akut toksisitenin ölçüsü LD₅₀ değeridir. Bu değer popülasyonda %50 oranında ölüm oluşturan doz olarak tanımlanabilmektedir. Düşük LD₅₀ değeri, o bileşiğin toksisitenin yüksek olduğunu göstermektedir (Yıldız ve ark., 2005).

1.3. Kirletici olarak Pestisitler

Pestisitlerin çevresel etkileri onların uygulanma şekillerine, formülasyonlarına ve uygulanma zamanlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Pestisitlerin tarımsal üretimde kullanılmalarının nedenlerini özetleyecek olursak ;

- Düşük maliyet ve yüksek ekonomik getiri
- Tarımın entansifleşmesi ve yüksek verimli ürün varyetelerinin pestisit uygulamalarına fazlaca gereksinim duymaları
- Pestisit kullanımındaki yanlış anlaşılmalardan kaynaklanan hatalı uygulamalar
- Sebze ve meyve gibi yüksek değerdeki ürünlerde zararlılardan korunma çabalarının artışı

İdeal bir pestisit, yalnızca hedef organizmayı etkileyen, kalıcı olmayan ve çevresel etkileri zararlı olmayan kimyasal madde olarak tanımlanabilir. (Conway ve Pretty , 1991). Birçok pestisit hedef dışı organizmalarda doğrudan toksik etkilere sahip olmamakla birlikte, ekosistemde taşınmakta ve ekosistemde zararlı olabilmektedir. Pestisitlerin kirliliğe neden olma yolları :

- Yüzey ve yer altı sularına direkt bulaşma,
- Toprağa bulaşma,

- Hedef dışı organizmalara doğrudan bulaşma,
- Hedef dışı organizmaların kalıntıları ya da kalıcı bileşikler nedeniyle bulaşması

Dar alanlarda ortaya çıkan yoğun pestisit kirliliklerinin başlıca nedeni, yetersiz ve hatalı tarımsal uygulamalar, kazayla oluşan dökülmeler, uygulama araçlarının yıkanması ve temizliği ile ortaya çıkabilmektedir. Yaygın kirlilik çoğu kez yeterli tarımsal uygulamaların yapıldığı alanlarda ortaya çıkabilmektedir. Genellikle kullanılan pestisitlerin önemli bölümü hedef organizma dışına gitmektedir. Pestisit uygulamalarında kullanılan miktarın %0.1'den az bölümü hedef organizmaya ulaşırken, diğer bölümü ekosisteme karışmaktadır.

Belirli pestisitlerin çok tekrarlı olarak kullanılması, zararlı organizmalarda seleksiyon sonucunda dirençli populasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Genellikle kısa yaşam döngüsü ve yıllık döl sayıları fazla olan zararlı türlerde direnç probleminin ortaya çıkışı çok kısa sürede olmaktadır. Dirençli populasyonlar üreticilerin daha sık aralıklarla ve yüksek dozda ilaçlama yapmalarına neden olmaktadır. Bu davranış hem direnç probleminin artışına neden olurken hem de çevrede kirliliğe neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2005).

1.4. Pestisitlerin Çevredeki Davranışları ve Sonları

Pestisitler toprağa çeşitli yollarla girerler. Örneğin direkt olarak; birleşme, spreyleme, ya da tohumların yüzeyinde, dolaylı olarak da; bitki artıklarına yapışarak, ekinlerin yüzeyinden toprağa yıkanarak pestisitler çevreye bulaşır. Genellikle uygulanan hemen hemen tüm pestisitler toprak profilinin ilk 5 cm olan üst kısmında bulunurlar (Topp ve ark., 1997).

Pestisit bir kez çevreye girdiğinde; uygulama, kullanım ya da dökme ile pek çok işlemten etkilenebilmektedir. Bu işlemler pestisit kalıcılığını ve hareketini etkileyerek onun son durumunu belirlemektedir. Akıbet süreci (fate processes) pestisit etkinliğine ya da onun çevreye olan etkisi üzerine pozitif ve negatif etkilerin her ikisini birden içerebilir (Harrison, 1990).

1.4.1. Akıbet Süreci

Akıbet süreci üç önemli tipe ayrılabilir; yapışma (adsorpsiyon); pestisitlerin mineral veya organik maddelere bağlanması, taşınma; pestisitlerin çevredeki hareketleri ve parçalanma (degradasyon); pestisitlerin bozulması şeklindedir.

1.4.1.1. Pestisitlerin Adsorpsiyonu

Adsorbsiyon, demirin mıknatısa yapışmasına benzer, toprak partiküllerinin yüzeylerine pestisitlerin bağlanması şeklindedir ve geri dönüşümlü bir olaydır. Genel terimlerde adsorbsiyon, absorbsiyondan farklıdır. Absorbsiyon; bir maddenin, diğer maddenin fiziksel yapısı içine çekilmesi şeklindedir. Örneğin süngerin içine suyun çekilmesi. Buna zıt olarak adsorbsiyon; bir maddenin basitçe diğer bir maddenin dış yüzeyine yapışmasıdır. Yapışma önemlidir çünkü, çoğunun toprak suyunda, taşınma ve parçalanma süreçlerine girmekte serbest olan pestisit ne kadar olacağını belirler. Bazı yönlerden toprak partikülleri ve toprak suyu arasında pestisit moleküllerinin yapışması ve çözünmesi, taşınma ve parçalanma mekanizmalarının meydana geldiği oranları kontrol ederek pestisit kayıplarını düzenleyebilir. Güçlü bir şekilde yapışmış pestisit muhtemelen daha az suda dağılacak, ya da yine daha az bitki köklerine veya toprak organizmalarına yapışacak veya bazı değişikliklere uğramadan kök tabakasına sızacaktır. Bununla birlikte, toprak partiküllerine yapışmış pestisitler, eğer toprak rüzgar veya su ile aşınırsa, uygulama yerinden uzaklara taşınırlar (Harrison, 1990).

Yapışma, yüklü parçalar arasındaki elektriksel çekimin bir sonucudur, bu durumda pestisit molekülleri ve toprak partikülleri arasındadır. Sık sık pestisit molekülleri kil veya organik madde parçalarını çekerler ve bağlanırlar. Killer kaolen, illit ve montmorillonit gibi spesifik minerallerin küçük kristalli yapısına sahiptir. Kil türünün sorpsiyon özelliğini belirleyen en önemli faktör kilin kimyasal özelliği ve gözenek yapısıdır. Montmorillonit minerali katyon değiştirme işlemlerine en elverişli kil minerali olması nedeni ile bir çok endüstri dalında kullanılmaktadır (Aydın ve ark., 2004).

Değişik pestisitlerin toprağa yapışma eğilimleri, onların kimyasal ve fiziksel özellikleri ile değişiklik gösterir. Paraquat ve glifosfat gibi bazı pestisitler çok sıkı bağlanırlar. Diğerleri zayıf bağlanırlar ve güçlük çekmeden çözünürler. Pek çok toprak özelliği pestisit yapışmasını etkiler. Bunlar; toprağın yapısı, yumuşaklık sertlik derecesi, organik madde yoğunluğu, pH ve nem doygunluğudur. Organik madde veya kil parçalarının artışı toprağın yapışma kapasitesini de artırır. Toprağın pH'sı veya toprak suyunun asit/baz dengesi kimyasalların tepkilerini ve mikrobiyal metabolizma gibi kimi toprak fonksiyonlarını etkiler (Harrison, 1990).

1.4.1.2. Pestisitlerin Taşınması

Pestisit taşınması, pestisitlerin uygulanma alanlarından hareketleridir. Bazı durumlarda pestisit taşınması zararlı kontrolü için gereklidir. Örneğin, bazı toprak yüzeyine uygulanan herbisitlerin toprak içinde filizlenen zararlı ot tohumlarına ulaşabilmeleri için birkaç santim toprak içine hareket etmesi gereklidir. Çok fazla hareket diğer bir yandan da pestisit hedef zararlıdan çok uzağa gitmesine neden olur. Bu durum zararlı kontrolünü azaltır, hedef olmayan türlerin (insanlar da dahil) hasarına ve yüzey ve dip sularının kontaminasyonuna neden olur. Pestisitlerin hareketlerini sağlayan beş durum; buharlaşma, akma, sızma, emilme ve fiziksel taşınmadır (Harrison, 1990).

Buharlaşma; bir katının ya da sıvının gaza dönüşmesidir. Buharlaşmış pestisit, havada uygulanma yüzeyinden çok uzaklara taşınabilir ki, bu da buhar sürüklenmesi olarak bilinen bir olaydır. Buharlaşma, hedef zararlının kontrolünü azaltabilir çünkü, hedef alanda daha az pestisit kalmış olacaktır. Buhar sürüklenmesi aynı zamanda hedef olmayan türlere de hasar verir.

Akma; suyun toprak yüzeyi üzerinden hareketidir. Akma; su, toprak yüzeyinde, toprağa süzülme yerine yüzeyde daha hızlı toplandığı zaman meydana gelir. Pestisitler ya suda dağılarak ya da aşınan toprak parçalarına bağlanarak akma ile hareket ederler. İnsektisitler ve nematositler, yüzey sularına akma ile taşınırlar, çeşitli sucul organizmalara zarar verebilirler. Herbisitlerin akması, hedef olamayan bitkilerde doğrudan hasara neden olur. Yüzey sularındaki pestisit atıkları, bulaşmış (kontamine

olmuş) su kullanıldığında ekinlerde, çiftlik hayvanlarında ve insanlarda zarara neden olur ve ayrıca dip sularına bulaşırlar.

Sızma; suyun ve suda çözülmüş kimyasalların, toprak yüzeyine değil de toprağın içine doğru hareketidir. Bir miktar sızma pestisiti hedefine götürmek için gerekli olabilir. Diğer yandan çok fazla sızma; zararlıların kontrolünde azalma, hedef olmayan türlere zarar ve yüzey sularında kontaminasyona neden olur.

Emilme; pestisitlerin bitkiler ve hayvanların içine hareketidir. Hedef olan ve olmayan organizmalar ile pestisitlerin emilmesi oldukça değişkendir ve cinslerin özelliklerinden, çevresel koşullardan ve pestisit ve toprağın, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenir. Toprağa uygulanan pestisitler, bitki kökleri ve toprak mikro ve makro organizmaları tarafından emilebilirler.

Fiziksel Taşınma; eğer pestisitle muamele edilmiş bitkiler ya da hayvanlar bir bölgeden çıkarılırsa, içerdikleri pestisit atıkları da onlarla birlikte taşınır (Harrison, 1990).

1.4.1.3. Pestisitlerin Parçalanması

Pestisitler ve toprak ve sudaki diğer organik kimyasallar fotolitik, kimyasal ve biyolojik mekanizmalarla parçalanırlar (Topp ve ark., 1997).

Pestisit parçalanması, pestisit moleküllerinin daha basit ve genellikle daha az toksik bileşiklere bozulmasıdır. Parçalanma, hedef zararlı kontrol edilmeden önce meydana gelirse bir sorun teşkil eder (Harrison, 1990).

Fotodegradasyon; güneş ışığının faaliyeti ile pestisit parçalanmasıdır. Bu parçalanma yapraklar üzerinde, toprağın yüzeyinde ve hatta havada bile olabilir. Pestisit uygulandığında, doğal ışık altında, kararlılıklarında çok değişiklik olur. Fotodegradasyonu etkileyen faktörler; güneş ışığının yoğunluğu, toprak tipi ve bitki örtüsü gibi uygulama alanının özellikleri, uygulama metodu ve pestisit kimyasal ve fiziksel özellikleridir. Fotodegradasyondan oluşan pestisit kayıpları uygulama sırasında ya da uygulamadan hemen sonra pestisiti toprağa dahil ederek ve aktif karışımı oluşturan maddeyi fotodegradasyondan korumak için pestisit formülasyonunda katkı maddeleri kullanılarak azaltılabilir (Harrison, 1990).

Kimyasal Parçalanma; molekül, çevresinin kimyasal olarak kararsız olduğu zaman meydana gelir (Topp ve ark., 1997).

Organizma içermeyen yollarla pestisitlerin bozulmasıdır. Yapışma kapasitesi, pH, ısı, nem ve toprağın mineral yapısı meydana gelen kimyasal reaksiyonların tipini ve oranını etkiler. En önemli reaksiyon hidrolizdir. Bazı organofosfat ve karbamat insektisitler alkali durumlarda hızlı hidrolizden çabuk etkilenirler. Kimyasal tepkimeler genellikle sıcaklıkla artarlar. Aynı zamanda toprağın mineral bileşimi, pestisitlerin bulunduğu kimyasal çevreyi belirler (Harrison, 1990).

Mikrobiyal Parçalanma; pestisitlerin organizmalar tarafından parçalanmasıdır (Topp ve ark., 1997). Bakteri, alg ve mantar gibi organizmalar pestisiti bir besin kaynağı olarak kullandıkları zaman meydana gelir (Harrison, 1990). Steril ve steril olmayan topraklarda pestisitlerin kararlılığını karşılaştıran birçok veri, topraktaki pestisit yıkımının temel mekanizmasının mikrobiyal parçalanma olduğunu gösterir (Topp ve ark., 1997). Mikrobiyal parçalanma, mikrobiyal aktiviteyi destekleyen toprak koşullarında tam ve hızlıdır (Harrison, 1990).

Topraktaki pestisitlerin mikrobiyal parçalanmasını etkileyen faktörler;

Pestisitlerin; yapısı, konsantrasyonu, kimyasal işlemleri, toprağın; nemi, ıslığı, organik madde içeriği, pH'sı, yapısı, kil miktarı, oksidasyon redüksiyon potansiyeli, mikroorganizmaların; sayısı, özgül faaliyetleri, metabolizma-kometabolizması'dır (Topp ve ark., 1997).

Ayrıca yapışmanın derecesi de mikrobiyal parçalanmayı etkiler çünkü, pestisitler genellikle emilmek ve parçalanmak için eriyik içinde çözünmüş olmaları gerekir. Diğer bir faktör de pestisit uygulanmasının sıklığıdır. Hızlandırılmış mikrobiyal parçalanma, belli alanda aynı pestisitlerin sürekli kullanımı ile meydana gelir, böylece kimyasal parçalamada etkili organizmalar hızla gelişirler. Bu organizmaların populasyonları arttıkça parçalanma hızlanacak ve zararlıları kontrol edebilmek için pestisit yetersiz kalacaktır (Harrison, 1990).

Pestisit parçalanması kuru topraklarda yavaştır. Pestisit değişiminin oranı genel olarak su ile birlikte olursa artar. Pestisitlerin biyolojik parçalanması mezofilik ısılarda (25° ile 40°C civarında) optimumudur. Çok soğuk ve sıcakta parçalanma çok yavaş olur ya da hiç olmaz (Guenzi ve Beard, 1968).

Aerobik, anaerobik (fermantatif, metanogenik, sülfat indirgeyen), kemolitotrofik ve fotosentetik organizmalar pestisit parçalayan mikroflora içinde temsil edilir. Pestisit artıkları tek bir tür mikroorganizma ya da çeşitli mikroorganizmalar tarafından mineralize edilebilir. Dönüşüm reaksiyonlarının değişik ya da benzer tiplerini katalizleyen pek çok değişik toprak mikroorganizması, benzer olarak pestisite saldırabilir (Fogel ve ark., 1982).

Büyük kimyasal çeşitlilik gösteren pestisitler ve pestisit parçalayan mikroorganizmalar mevcuttur. Pestisitlerin parçalanmasına karışan mikroorganizmalar tarafından katalizlenen dönüşüm reaksiyonları çeşitlilik gösterir. Verilen pestisit genellikle toprakta sınırlı sayıda devamlı reaksiyonlarla biyolojik olarak parçalanır. Mikrobiyal pestisit dönüşüm reaksiyonları doğada; oksidatif, redüktif, hidrolitik ya da sentetik olarak gruplanırlar (Bollag ve Liu, 1990).

Organik atıkların parçalanmasına karışan enzimleri kodlayan genler sık sık plazmidler ve bazen de, kopya çıkarabilen ve genoma yeni kopyaları sokabilen DNA elementleri olan, transpozonlar üzerindedirler. Bu hareketli genetik elemanlar, suda ve topraktaki mikroorganizmalar arasında transfer edilebilir (Fulthorpe ve Wyndham, 1992).

2,4-D parçalanmasını kodlayan plazmid pJP4; *E. coli*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium sp.*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Acinetobacter calcoaceticus* bakterilerini de içeren geniş bir gruba transfer edilebilir (Don ve Pemberton, 1981).

1.5. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitlerin sınıflandırılması çok farklı şekillerde yapılmaktadır (Toros ve Maden, 1985). Bunlar:

I. Hedef alınan organizmaya göre gruplandırma

- a. Akarsitler
- b. Fungisitler
- c. Herbisitler
- d. İnsektisitler

- e. Nematositler
- f. Rodentisitler

II. Kullanma şekillerine göre gruplandırma

- a. Gaz
- b. Toz
- c. Püskürtme

III. Etkili maddelerine göre gruplandırma

- a. İnorganik
- b. Organik
 - Organo fosforlu maddeler
 - Organo klorlu maddeler
 - Bitkisel maddeler

1.5.1. Klorofenoller

Yaklaşık 60 yıldır klorofenoller, özellikle pentaklorofenol (PCP), bakterileri, algleri, mantarları, molluksları ve böcekleri kontrol etmek için kullanılan dünya çapında geniş spektrumlu biyositlerdir (Lu ve ark., 1978).

Buna ilaveten daha az klorlu fenoller, diğer pestisitlerin habercileri olarak kullanılmıştır. Örneğin, 2,4-diklorofenol ve 2,4,5-triklorofenol sırasıyla; 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T) sentezi için kullanılmıştır. 2,4-D ve 2,4,5-T dünyada en çok kullanılan iki herbisittir. 1970'lerde ve 1980'lerin başında PCP'lerin toplam üretimin yaklaşık %50'si olduğu zamanlarda, klorofenollerin dünya çapındaki üretimleri 200.000 ton/yıl olarak hesaplanmıştır (Haggbloom ve Valo, 1995)

Yapılan bir toprak çalışmasında, 2- klorofenol, 4- klorofenol, 2,4-diklorofenol ve 2,4,6-triklorofenol tam bir parçalanma için 5 ile 14 güne gerek duyarken, 3- klorofenol, 2,4,5-triklorofenol, 2,3,4,6-tetraklorofenol ve PCP gibi diğer klorofenoller toprakta 75 günden fazla kalırlar (Alexander ve Aleem, 1961).

Pek çok biyolojik sistemde poli klorlu fenoller, toksik olma eğilimindedirler. Çevresel örneklerden izole edilen bazı aerobik bakteri türleri mono- ve diklorofenollerini parçalayabilirler. Mono- ya da diklorofenoller öncelikle, klorokatekollerini oluşturmak için fenol hidroksilaz ile hidroksilenirler. Reaksiyonlar, indirgenmiş nikotinamit-adenin dinükleotite (NADH) ya da indirgenmiş nikotinamit-adenin dinükleotitfosfata bağlıdır. Buna ilaveten moleküler oksijen reaksiyonları için gereklidir (Leung ve ark., 1997).

1.5.2. 2,4- Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4- D)

2,4- D (2,4- Diklorofenoksi asetik asit), hem toprakta hem de sucul uygulama alanlarında kullanılan bir çeşit herbisit ürününün aktif bileşenidir. 2,4- D, bitki içerisinde aktif bölgelere taşınan seçici bitkisel hormon tipinde bir üründür. Bunun hareket biçimi, temelde oksin ya da bitki gövde uzamasını uyaran bir madde gibidir. 2,4- D, nükleik asit ve protein sentezini uyarıp enzim aktivitesini, solunumu ve hücre bölünmesini uyarır. Bitki yaprakları, gövdeleri ve kökleri tarafından emilip bitki içerisinde etmektedir. 2,4-D büyüme uçlarında birikir. Büyük ölçüde kullanımı herbisit şeklindedir (CSI, 2001).

Uygun konsantrasyonlarda kullanıldıklarında, seçicilik göstermeleri ve çimlerle bunların akrabaları olan diğer monokotilleri öldürmemeleri nedeniyle, çimenliklerde, otlaklarda, mısır, buğday, çavdar ve pirinç tarlalarında geniş yapraklı türlerle mücadelede çok büyük ticari öneme sahiptirler (Keeton ve Gould, 1986).

Çevrede, pek çok formülasyonlar, suda çözünebilen ve yüksek hareket potansiyeline sahip aniyonik formlara indirgenirler. Ester formülasyonları, sucul omurgasızlara ve balıklara toksiktir fakat, tuz formülasyonları sucul zararlı otlarına karşı kullanılır. 2,4-D, hayvanlarda oldukça düşük toksisiteye sahiptir fakat, bazı formülasyonları şiddetli göz hasarına sebep olabilir. Pek çok formülasyonu yüksek derece uçucudur ve yüksek sıcaklıkta ve rüzgarlı havalarda uygulanmamalıdır (Tu ve ark., 2001).

Dimetil amin tuzları suda çok çözünürken (%300), esterler suda çözünmezler, fakat organik çözücülerde çözünürler. 2,4-D, 25°C'de $1,05 \times 10^{-2}$ mmHg buhar basıncına sahiptir. Değişik esterlerin buhar basınçları daha düşüktür (WHO, 1989).

Kirlilik, üretim sürecinin bir sonucu olarak, teknik ürün içinde ortaya çıkabilir. Bunlar; 2,6- diklorofenoksi asetik asit, 2- ve 4- klorofenoksi asetik asitler, bis-(2,4-diklorofenoksi) asetik asit ve 2,4- diklorofenol'dür (WHO, 1984).

2,4-D'nin çevredeki yarı ömrü, ortalama 10 gün toprakta ve on günden daha az suda olmak üzere oldukça kısadır. Fakat, soğuk ve kuru topraklarda daha uzundur (Tu ve ark., 2001).

2,4-D'nin kalıntıları; doğrudan uygulamanın, akıntının ya da işlenmiş bölgelerde birikmenin bir sonucu olarak yüzey sularına karışabilir. Herbisit, suda hızla biyolojik ayrışmaya uğrar. Ayrıca yüzeye yakın bir kısmı da fotolitik olarak ayrışmaktadır. 2,4-D'nin esas parçalanma ürünü; 2,4-diklorofenol'dür (CCREM, 1987)

2,4-D'nin sucul sistemlerdeki varlığı; su tipine, yağmura, güneş ışığına, sıcaklığa, popülasyona ve mikroorganizmalarla oksijen yoğunluğuna önceden maruz kalmaya dayanır. 2,4-D, dip tortullarda ve çamurlarda, sucul ya da karasal organizmalarda (bazı algler hariç) hızlı parçalanması nedeni ile biyolojik olarak birikmez (Que ve Sutherland, 1981).

Yarı ömürler, aerobik koşullarda bir ile birkaç hafta arasında değişiklik gösterirken, anaerobik koşullarda 8 ile 120 günü geçebilir. 2,4-D ile atmosferik kontaminasyon, buharlaşmanın ve sprey ile uygulamadan dolayı birikmenin bir sonucu olarak meydana gelebilir. Atmosferdeki kalıntılar, baskın olarak izopropil ve bütül esterler formundadır (NRCC, 1978).

2,4-D, foto-oksidasyon ve yağmur ile yarı ömrü bir günden kısa olarak atmosferden uzaklaştırılır (Gray ve ark., 1983).

2,4-D, oksin taklitçisi ya da sentetik oksindir. Bu tipte herbisit, hedef zararlıyı bitki büyüme hormonu oksini (indol asetik asit) taklit ederek öldürür. Etkili dozlar verildiğinde, bitki ölümüne neden olan kontrolsüz ve alt üst edilmiş bitki büyümesine neden olur. 2,4-D'nin kesin faaliyet biçimi tamamiyle anlaşılamamıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlardaki 2,4-D, kontrolsüz hücre bölünmesi ve büyümesini yöneten

RNA, DNA ve protein sentezini uyarır. Diğer yandan yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-D, hücre bölünmesi ve büyümesini engeller. Bitki ölümü, uygulamayı takiben 3 ile 5 hafta içinde meydana gelir (Tu ve ark., 2001).

2,4-D'nin pek çok formülasyonu yüksek derece uçucudur ve uygulanmaları sırasında dikkat edilmelidir. Alkali ve amin tuz formülasyonları daha az uçucudur ve kullanılması uçucu olan ve hedef dışı bitkilere hasar veren esterlere göre daha uygundur (WHO, 1984). 2,4-D'nin uçuculuk potansiyeli ısıнын ve toprak neminin artmasıyla, toprakta kil ve organik madde içeriğinin azalmasıyla artar (Helling ve ark., 1971).

2,4-D, laboratuvar koşullarında güneş ışığında hızla parçalanır fakat, fotodegradasyon açık arazide kanıtlanmamıştır (Halter, 1980). Crosby ve Tutass (1966), laboratuvar koşullarında yarı ömürlerin 2,4-D tuzları için 50 dakika ve 2,4-D esterleri için 5 dakika olduğunu belirtmişlerdir.

2,4-D'nin tuz formülasyonları, suda çözünürler ve toprağa sıkıca bağlanmazlar. Ester formülasyonları toprağa kolayca bağlanırlar. Açık arazide, ester formülasyonları, özellikle alkali şartlarda asit formuna hidrolize olma eğilimindedirler. Ve sonuç olarak toprak partiküllerine önemli miktarlarda yapışmazlar (Aly ve Faust, 1964).

Johnson ve ark. (1995), toprak organik içeriğinin ve pH'nın topraktaki 2,4-D adsorpsiyonunun temel belirleyicileri olduğunu bulmuşlardır. Adsorpsiyon, toprak organik içeriğinin yükselmesi ve toprak pH'sının düşmesi ile yükselir. İnorganik killer de, 2,4-D partiküllerini bağlarlar. Buna ilaveten, herbisit konsantrasyonu arttıkça, yapışan herbisit yüzdesi düşecektir, çünkü muhtemelen, toprak partiküllerinin bağlayıcı yerlerinin sayısı sınırlıdır ve dolacaktır.

2,4-D, çevrede oldukça kalıcıdır ve diğer pestisitlere nazaran kolayca kimyasal parçalanmaya uğramaz (Que Hee ve Sutherland, 1981). Ester formülasyonlarının asit ve alkol bileşiklerine hidrolizi, alkali sularda kolayca meydana gelebilir (Que Hee ve Sutherland, 1981; Muir, 1991). Buna ilaveten, 2,4-D'nin tuz formülasyonları çevrede tuz ve aside ayrılırlar (Smith, 1988).

Serbest asit ya da sodyum veya amin tuzları olarak ağızdan verilen 2,4-D, fareler, buzağılar, domuzlar ve gönüllü insanlarda hızla ve hemen hemen tamamıyla

emilirler. İnsanlarda emilim için ortalama yarı-zaman 4 saattir (Sauerhoff ve ark., 1977).

Çizelge 1.3’de 2,4-D’nin bazı kimyasal özellikleri ve yapısal formülü verilmiştir.

Çizelge 1.3. 2,4-D’nin Özellikleri (Tu ve ark., 2001, Avrupa Komisyonu, 2001, CSI, 2001)

Kimyasal formülü	(2,4-diklorofenoksi) asetik asit
Herbisit ailesi	Fenoksi
Hedef zararlılar	Geniş yapraklılar
Formları	Tuz ve ester
Deneysel Formülü	$C_8H_6Cl_2O_3$
Moleküler ağırlığı	221.04
Faaliyet Biçimi	Oksin taklitcisi
Yapışma Potansiyeli	Düşük-Orta (Esterin tuza göre daha yüksek)
Öncelikli Parçalanma Mekanizması	Mikrobiyal metabolizma
Ortalama Topraktaki yarı-ömrü	10 gün
Hareket Potansiyeli	Orta
Ticari İsimleri	Aqua-Kleen, Barrage ve Weedone
CAS Numarası	94-75-7 (asit)
Erime Sıcaklığı	139.25°C
Organik çözücülerdeki Çözünürlüğü (20 C’de)	n-heksan 0.03 g/l at 25°C toluen 6.4 g/l dikloromethan 13 g/l metanol >810 g/l izopropanol 220 g/l n-oktanol 120 g/l aseton 390 g/l etilasetat 170 g/l
Yapısal Formülü	

Emilim, emilimden önce serbest aside hidrolize olan 2,4-D'nin esterleri için daha yavaş ve daha azdır (FAO/WHO, 1971). İnsanlardaki asidin deri yüzeyinden emilimi yavaştır (Frank ve ark., 1985). 2,4-D'nin deri yüzeyinden emilimi insan ön kolunda %6'dan, tavşan sırtında %36'ya kadar değişiklik gösterir (Moody ve ark., 1990). 2,4-D farelerde oral yolla emilimden 3 saat sonra kanda (FAO/WHO, 1976) ve 6 saat sonra böbrekler, karaciğer, dalak ve akciğerlerde en yüksek düzeye ulaşır. (FAO/WHO, 1971). 2,4-D'nin dokulardaki konsantrasyonu, böbreklerde, karaciğerde, kanda ve akciğerlerde en yüksek seviyededir. Beyindeki konsantrasyon, fareler (Khanna ve Fang, 1966), domuzlar (FAO/WHO, 1971) ve insandaki diğer dokuların konsantrasyonundan daha düşük olarak ortaya çıkmıştır (NRCC, 1978).

5 mg/ kg vücut ağırlığı oral doz verilen erkek gönüllülerde 2,4-D'nin çıkarılması az çok hızlıdır. Plazma temizlenmesinin yarı-zamanı 11.6 saat ve eliminasyon yarı-zamanı da 17.7 saattir. %82'si idrarda değişmemiş olarak vücuttan çıkarılırken, %13'ü konjugat olarak vücuttan çıkar (Sauerhoff ve ark., 1977).

İçme suyunda 2,4-diklorofenoksiasetik asit için maksimum kontaminant seviyesi 0.07 mg/L'dir (EPA, 2002).

1.5.2.1. 2,4-D'nin Mikrobiyal Parçalanması

WHO (1984), 2,4-D'nin çevrede birikmediği ve kalmadığı sonucuna varmıştır. Öncelikli parçalanma mekanizması, mikrobiyal metabolizmadır fakat, mineralizasyon ve muhtemelen fotolizis de küçük bir rol oynamaktadır. Ortalama yarı-ömrü (herbisit konsantrasyonunun %50 azalması için geçen zaman) 10 gündür fakat, parçalanmanın oranları birkaç saatten, birkaç aya kadar değişiklik gösterebilir. Parçalanma oranları; mikrobiyal popülasyon, çevresel pH, toprak nemi ve ısı ile belirlenir (Que Hee ve Sutherland, 1981; Sandman ve ark., 1988; Wilson ve ark., 1997).

Toprakta 2,4-D öncelikli olarak mikroplar tarafından parçalanır. Hemmett ve Faust (1969), mikrobiyal popülasyonun büyüklüğü, 2,4-D'nin konsantrasyonu ve bu iki faktörün oranının, 2,4-D parçalanma oranlarını belirlediği sonucuna varmışlardır.

Biyolojik parçalanmanın oranını etkileyen faktörler; uygulanan herbisit konsantrasyonu ve formülasyonu, toprak tipi, mikroorganizmaların konsantrasyonları

ve iyi koşullara alışması, nem sıcaklık, pH ve oksijen miktarıdır (WHO, 1989; Sandmann ve ark., 1988; Ou, 1984).

Buna ilaveten, 2,4-D ile daha önceden muamele olmuş topraklarda, 2,4-D çok daha hızlı yok olmaktadır. Çünkü muhtemelen, ilk uygulamadan sonra 2,4-D parçalayan bakterilerde bir artma söz konusudur (Oh ve Tuovinen, 1991; Smith ve Aubin, 1994; Shaw ve Burns, 1998).

Mikrobiyal parçalanma, eğer uygun mikrobiyal popülasyon varsa ve pH seviyesi yeterli derecede yüksekse, sucul sistemlerde dip tortullarda yer alabilir (Que Hee ve Sutherland, 1981). Asidik şartlar altında; mikrobiyal aktivite şiddetli şekilde engellenir (Sandmann ve ark., 1988).

Bazı mikroflora üyeleri, 2,4-D'yi tek karbon kaynağı olarak kullanırken; diğerleri 2,4-D'yi metabolize edebilir fakat, yine de diğer karbon kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. 2,4-D'yi kullanan türler; *Achoromobacter*, *Bordetella*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Achrobacter*, *Alcanigenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* ve *Pseudomonas*'dır. Son dört grubun üyeleri 2,4-D'yi tek karbon kaynağı olarak kullanırlar (Aislabie ve Lloyd-Jones, 1995).

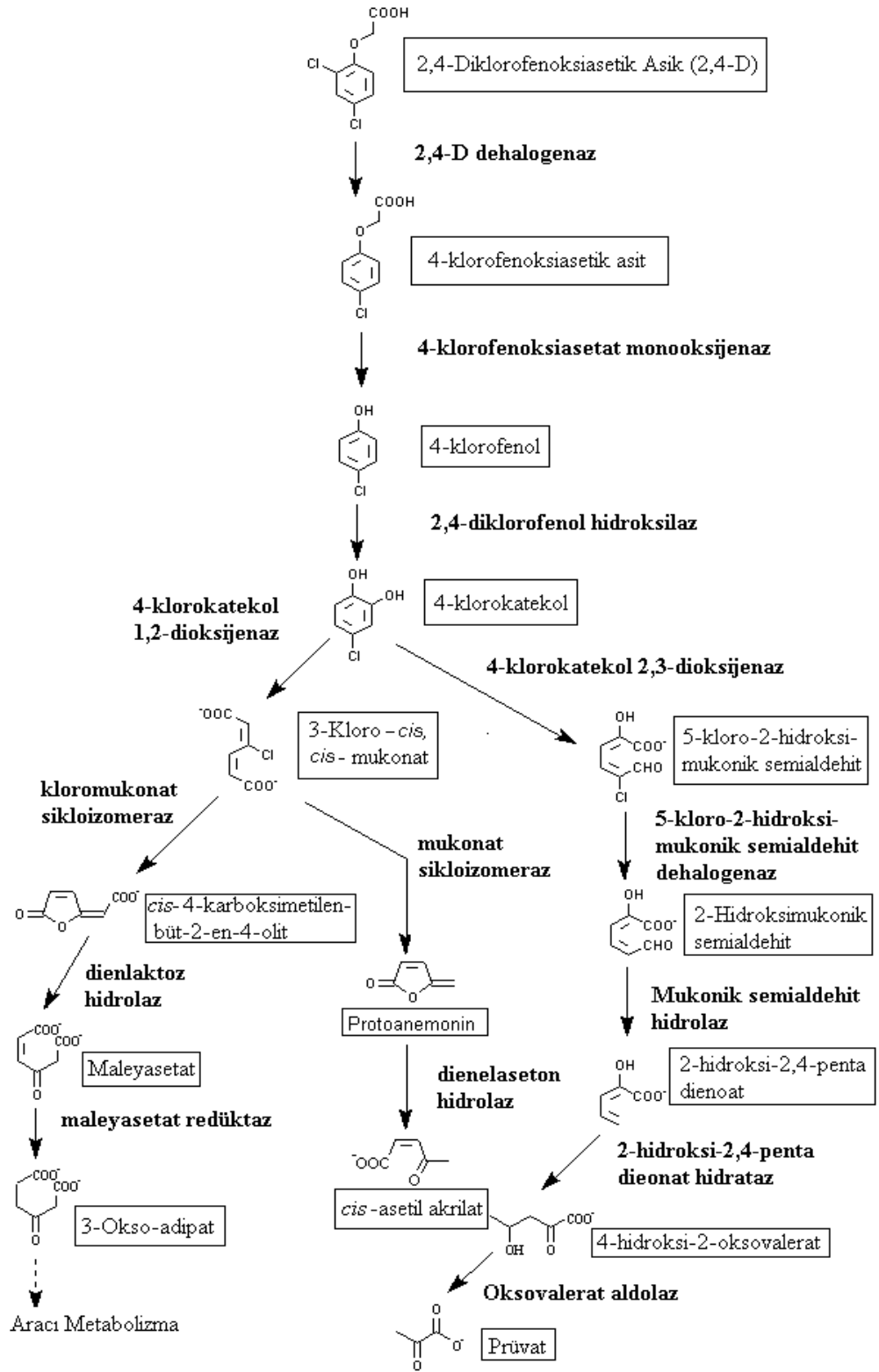
1980'lerin sonunda, Smith ve Mortensen (1991), 1947'den beri yıllık 2,4-D uygulamalarına tabi olmuş topraktan *Pseudomonas* türleri izole etmişlerdir. Organizma, yüksek konsantrasyonlarda 2,4-D'yi tamamen metabolize etmiştir fakat, 2,4-D gibi aynı bileşik sınıfından olan diğer fenoksi alkanoik asitleri metabolize edememişlerdir.

Pek çok 2,4-D parçalayan organizma aerobiktir. Oksijen isterler, bu yüzden anaerobik oksijensiz su ya da tortularda iş göremezler. Bununla birlikte, 2,4,5-T yolu ile 2,4-D'nin anaerobik bozulması, metan üreten sulu çamurlar içerisinde görülmüştür (Aislabie ve Lloyd-Jones, 1995).

Son zamanlarda 2,4-D kullanılmayan sistemlerde, 2,4-D uygulanmasını takiben, fark edilen bir parçalanmanın olmadığı, ilk lag periyodu vardır. Bu süre içinde mikrobiyal popülasyonlar, 2,4-D'yi metabolize ederler ve sayılarını 2,4-D konsantrasyonunu azaltacak kadar arttırırlar. 2,4-D'ye önceden maruz kalma lag fazını kısaltır (CSI, 2001).

2,4-D toprakta kolayca ve hızlıca parçalanır. Sıcak, nemli şartlar ve organik madde ilavesi parçalanmayı uyarır. Toprağı otoklavlamak ve bakteriyel metabolizmayı engellemek parçalanmayı azaltır. 2,4-D kayboluşunun kinetikleri, bundan mikroorganizmaların sorumlu olduklarını belirtir. Mikroorganizmaların çeşitli tiplerinin belirli türleri, izole edilmiştir ve saf kültür içinde fenoksi asetik asit herbisitleri parçaladıkları gösterilmiştir. Fenoksi asetik asitlerin parçalanmaları iki temel yol ile ilerler. Bunlar; arada bulunan hidroksifenoksi asetik asit yolu ile veya fenol yolu ileler. 2,4-D ile toprağa düzenli uygulama, bileşiği parçalamaya eğilimli organizmaların sayısını arttırır. Diğer fenoksi herbisitlerle de muamele, 2,4-D parçalamaya eğilimli organizmaların artışına neden olur (Audus, 1960; Audus 1964; Loos, 1969).

Şekil 1.1’de 2,4-D’nin fenol yolu ile parçalanması gösterilmiştir.



Şekil 1.1. 2,4-D'nin Parçalanma Yolları (Young, 2003)

1.6. *Alcaligenes* Cinsi

Alcaligenes cinsi, *Pseudomonaceae* ailesine mensup, Gram negatif, kapsülsüz, sporsuz kokobasil veya çomak şeklinde görülen 0.5-1 µm eninde, 0.5-2.6 µm uzunluğunda hareketli bakterilerdir. Besiyerlerinde kuvvetli alkali maddeler yaparlar. Hareketleri, peritriş kirpiklerine bağlıdır. Zorunlu aerob bakteriler olmalarına karşın bazı türleri nitrat veya nitritli ortamda, anaerob solunumu gerçekleştirebilirler. Optimal üreme ısıları 20°C-37°C arasındadır. Katı besiyerlerindeki kültürlerinde ufak, yuvarlak, bombeli ve düzgün koloniler yaparlar ve çilek kokusu yayarlar.

Oksidaz ve katalaz testleri pozitifdir, indol üretmezler. Selüloz, eskülin ve jelatini hidrolize etmezler. Nitrit, D- Glikoz ve D- Glikonat testleri negatiftirler. Sitratlı besiyerinde ürer ve üreyi parçalar. Aminoasitleri ve organik asitleri karbon kaynağı olarak kullanırlar. Alkali oluşumunu pek çok organik tuz ve amidlerden yaparlar.

Doğada, toprak ve suda bulunurlar. Bazı omurgalıların bağırsaklarında saprofit olarak yaşarlar. Fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara neden olurlar. Bu enfeksiyonlar; menenjit, sistit, sepsis, göz, orta kulak, lenf bezi ve safra kesesi iltihaplarıdır. Tedavi antibiyotiklerle yapılır.

A.faecalis, *A.piechaudii*, *A.xylosoxidans*, *A.denitrificans* türleri bilinmektedir. *Alcaligenes xylosoxidans*; nitrat ve nitritleri redükte etmesi, D-Glikoz ve D Glikonatu ayrıştırması ile *A. faecalis*' den ayrılır (Unz, 1984).

Çizelge 1.4'de bazı *Alcaligenes* türlerinin biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 1.4. Bazı *Alcaligenes* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri (Dees and Moss, 1978; Dees et al., 1980; Oyaizu-Masuchi and Komagata, 1988; Willems et al., 1989)

Özellikler	<i>A. faecalis</i>	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>A. piechaudii</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. paradoxus</i>	<i>A. latus</i>
Sarı Pigment Üretme	–	–	–	–	+	–
Nitrat redüktaz	–	d+	+	+	d	+
Nitrit redüsiyon	+	d+	–	+	–	–
Nitratin Fermentasyonu	–	d+	–	+	–	–
Nitritin Fermentasyonu	+	d+	–	–	–	–
Üreaz	–	–	–	–	+	–
Jelatin	–	–	–	–	d	+
Nişasta	–	–	–	–	–	+
Tween 80	–	–	–	+	+	+
L-Arabinoz	–	–	–	–	+	–
D-Glukoz	–	–+	–	M	+	+
D-Ksiloz	–	–+	–	–	+	–
D-Mannitol	–	–	–	–	+	–
D-Glukonat	–	d+	+	+	+	+
D-Galaktoz	–	–	–	–	+	–
Maltoz	–	–	–	–	–	+
Sukroz	–	–	–	–	–	+
Asetat	+	+	–	+	+	–
Adipat	–	+	+	+	d	–
Pimelat	–	+	+	+	d	–
Sebikat	–	+	–	+	+	d
Suberat	–	+	–	+	d	+
<i>meso</i> -Tartrat	–	+	–	+	d	–
Itakonat	–	+	+	+	d	+
Adonitol	–	–	–	–	d	–
Sorbitol	–	–	–	–	+	–
2-Ketoglukonat	–	–	–	+	d	+
Kaprat	+	d+	–	–(+)	–	–
Levulinat	–	–	–	+	d	–
α -Ketoglutarat	d	+	–	+	+	–
Azelat	–	+	–	+	d	–
D-Malat	–	+	–	d	d	–
<i>m</i> -Hidroksibenzoat	–	d–	–	+	+	+
<i>p</i> -Hidroksibenzoat	–	–	–	+	+	+
Butilamin	–	–	–	–	d	+

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Schwartz 1966'da sucul solüsyonlarda 2,4-D ve karbamat pestisitlerinin mikrobiyal parçalanmasını ve yapışmasını çalıştığı tezinde, 2,4-D'nin sıvı mineral tuz medyumda mikrobiyal parçalanmaya çok dirençli olduğunu belirtmiştir. Molekülün, asetik asit bölümünün %40'dan daha azı, organik karbon kaynaklarının ilavesinde bile 6 ayda solüsyondan kaybolmuştur. Seyreltilmiş pestisit solüsyonlarında süspanse edilen kil mineralleri; illit, kaolinit ve montmorillonit 2,4-D'ye ya da karbamata çok az yapışmışlardır.

Torstensson (1975), farklı pH'larda toprak mikroorganizmalarının kültürlerindeki 2,4-D parçalanmasının yarı ömürlerini ölçmüştür. 8.5'den 5.0'a kadar sıralanan pH değerlerinde yarı ömür, 5 ile 8 gün arası az değişmiştir. pH 4.5'de yarı ömür 21 güne çıkmış, pH 4.0'da 41 günden fazlaya yükselmiştir.

Butler ve ark., (1975) 0.01 mg/litre konsantrasyonda 2,4-D bütoksietanol ile muamele edilmiş doğal göl suyundan 21 tür tatlı su algisi izole etmişlerdir ve bunların parçalama yeteneklerine bakmışlardır. Kültürlerin çoğunluğu 2,4-D'yi iki hafta içinde tamamen parçalamışlardır. Tek bir kültür eklenen 2,4-D'nin %64'ünü tutarken, diğer yedi izolat eklenen miktarı %20'den daha aza düşürmüşlerdir. Kalan isolatlar, %22'den %53'e kadar geri alınımlar göstermişlerdir.

Rosenberg ve Alexander (1980), 2,4-D ile lağım çamuru bakterilerini inkübe etmişlerdir ve neredeyse herbisitinin tamamının 7 günden sonra kaybolduğunu bulmuşlardır. 2,4-D'nin sonraki eklemeleri, bileşiğin lag periyoduna girmeden yıkıldığını göstermiştir. Benzer sonuçlar topraktan bakteriler kullanıldığından da elde edilmiştir. Eklenen 2,4-D'nin %90'ının yok olması için ihtiyaç duyulan zaman 14 gündür. Sonradan ilave edilen 2,4-D, üç ile dört gün içinde %70'e düşürülmüştür. Deneyde çeşitli tropikal topraklar kullanılmış ve hepsi 2,4-D'yi parçalamada yüksek kapasitede olduklarını göstermişlerdir.

Sattar ve Paasivirta (1980), yaptıkları çalışmada asidik topraklarda 2,4-D'nin daha yavaş parçalandığını göstermişlerdir. 2,4-D'nin yarısının topraktan kaybolması 6 haftayı almıştır ve 24 hafta sonra hala %7'si kalmıştır.

Nesbitt ve Watson (1980), nehir suyundan 2,4-D'nin parçalanma oranını besin seviyeleri, dip tortusu ve suyun çözünmemiş organik karbon içeriği ile ilişkilendirmişlerdir. Tortu ya da inorganik besinlerin ilavesi, 2,4-D parçalanma oranını yükseltirken, 2,4-D parçalayabilen organizmaların ilavesi herbisitinin parçalanma oranını arttırmamıştır. Bu bulgu göstermiştir ki, nehir suyunda 2,4-D'nin parçalanmasını sınırlayan faktör organizmaların sayısı değil fakat, nehirin besinsel durumu olmuştur. Yazarlar kışın nehir en yüksek akışında ve suyun ısısı en iyi mikrobiyal aktivite için düşük iken, fark edilebilir miktarlardaki herbisitinin haliçe aktığını belirtmişlerdir.

Lewis ve ark. (1984), 2,4-D bütoksi etilesterin bakteriyel parçalanmasını ve medyuma fazladan çeşitli bileşenlerin ilavesinin etkisini çalışmışlardır. Filtre edilmemiş kullanılmış fungal medyumun ilavesi, herbisitinin parçalanma oranlarına uyarıcı ya da engelleyici etkisi olmuştur. Bu; medyumda kültüre edilen belirli mantar türlerine dayanmaktadır. Araştırma, etkilerin özellikle pH'daki farklılıklar yüzünden olduğunu göstermiştir. pH'nın 6'dan aşağı düşmesi, bileşiğin bakteriyel dönüşümünü engellemiştir. Mantarlar genellikle, büyük miktarlarda organik asidi serbest bırakırlar. Kullanılmış mantar medyumunun ilavesi, 2,4-D esterinin parçalanmasını engellemiştir. Eklenmiş mantar medyumunu tamponlama, onun engelleyici etkisini azaltmıştır. Tamponlanmış medyumun ilavesinden sonra, parçalanmanın biraz uyarılması meydana gelmiştir. Besinlerin ya da 2,4-D'yi dönüştüremeyen bakterilerin ilavesi, herbisitinin dönüştürümünü uyarmışlardır. Bu durum için yazarların açıklaması; diğer dönüştürülen enzimlerin göreve getirilmesidir. Artan substrat konsantrasyonu ile diğer enzim sistemleri bakteride indüklenmiştir.

Le Van To (1984), önceden herbisitle muamele edilmiş topraktan altı tür mikroorganizma izole etmiştir. Bunlar; *Flavobacterium peregrinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*, *Brevibacterium sp.*, *Streptomyces viridochromogenes* ve tanımlanamamış *Streptomyces* türüdür. *Flavobacterium*, 2,4-D'yi parçalayan en aktif organizma olmuştur. 20 ile 30 günden sonra 20 mg/kg 2,4-D'nin parçalanmasını tamamlamıştır. Sıvı kültürde *Flavobacterium* 80 saat içinde ilave edilen 2,4-D'nin %93.5'ini parçalamıştır. Besin ile beraber sterilize edilmiş

toprağa verilen 2,4-D'nin yarısının parçalanması için gerekli sürenin 3 gün olduğu hesaplanmıştır.

Dığrak ve ark. (1997), Elazığ yöresinde yaygın olarak kullanılan fungusitlerden Aliette, Derosal 50 WP, Previcur N, insektisitlerden Rothion EC ve Pirimicarb'ın toprak mikrobiotası (toplam mikroorganizma, aktinomiset, anaerob bakteriler, aerob endosporlar, proteolitik bakteriler, maya ve küf) üzerine etkisini araştırmışlardır. Aliette ile muamele edilen toprakta, toplam mikroorganizma sayısı inkübasyon süresince kontrolden az olduğu belirlenmiş ve bu muamelenin diğer mikroorganizma gruplarının gelişmesi üzerine olumsuz etkisinin olmadığı görülmüştür. Derosal 50 WP ve Previcur N uygulanan toprakta inkübasyon süresinin 10. gününe kadar toplam mikroorganizma sayısının kontrolden az olduğu, daha sonra fungusitli topraktaki toplam bakteri sayısının fazla olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen fungusitlerle muamele edilen topraktaki diğer mikroorganizma sayıları kontrolden fazla bulunmuş, ancak maya ve küf gelişmesi olumsuz etkilenmiştir. Rothion EC ile muamele edilen toprakta aktinomiset sayısının, Pirimicarb uygulanan toprakta ise maya ve küf sayısının kontrolden az olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar farklı pestisitlerin farklı etkilere neden olabildiğini göstermektedir.

Bir başka çalışmada Bekbölet ve ark. (1998), seçilmiş topraklardaki 2,4-D'nin yapışmasını ve emilimini araştırmışlardır. Bu çalışmada batch equilibrium etkiği kullanılmıştır. Veriler linear ve Freundlich sorbsiyon eşitliklerine uygunluk göstermiştir. K ve K_f değerleri sırasıyla $0.32-1.89 L^{-1}$ ve $2.6 \times 10^{-3} - 7.4 mg kg^{-1}$ arasında dizilmişlerdir. Sonuçlar göstermiştir ki; tüm topraklar için linear ve Freundlich adsorbsiyon eşitlikleri K ve K_f , organik madde içeriği ile karşılıklı olarak bağlantılıdır (sırasıyla $r = 0.87$ ve $r = 0.66$). Yapışma ayrıca, toprağın balçık ve kil içeriği ($r = 0.53$) ile pozitif ve kum içeriği ile negatif olarak bağlantılıdır.

Kaya ve Yanıkoğlu (1999), iki hormon tabiatlı herbisit çeşidi olan 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 4-klorofenoksi asetik asidin (4-CPA) *Drosophila melanogaster*'in F₁, F₂ ve F₃ kuşaklarında pup olma ve pup evresi süreleri ile ergin çıkış sayısına etkilerini araştırmışlardır. Ana kuşak ve F₁ kuşağına uygulanan 2,4-D'nin 300 ppm'lik derişimi *D. melanogaster*'in F₁ kuşağında pup olma süresini ve pup evresini geciktirip, çıakn egin birey çıkış sayısını azalttığı

saptanmıştır. Diğer etkili bir derişim olan 100 ppm ise F₃ kuşagında pup evresini kısalttığı gözlenmiştir. Ana kuşak ve F₁ kuşagina uygulanan 4-CPA'nın en yüksek derişimi olan 100 ppm, F₁ kuşagında pup olma süresini geciktirmiştir. Aynı derişim F₂ kuşagında çıkan ergin birey çıkış sayısını arttırmıştır. Buna karşın, 20 ve 100 ppm'lik derişimler F₂ kuşagında pup olma süresini kısaltmıştır. F₃ kuşagında ise 20 ppm'lik derişimin pup evresini kısalttığı belirlenmiştir.

Fahr ve ark.,(1999) iki kahverengi çürükçül mantar ile 2,4-diklorofenol ve pentaklorofenolün parçalanmasını araştırmışlardır. Kahverengi çürükçül mantarlar olan *Gloeophyllum striatum* ve *G. trabeum*'un buğday saman kültürleri 2,4-diklorofenol ve pentaklorofenolü parçalamışlardır. Sırasıyla %54 ve %27'ye kadar ¹⁴CO₂, altı hafta içinde sınıflandırılmış-¹⁴C substratlarından serbest kalmışlardır. Benzer koşullarda, *Trametes versicolor*, referans olarak kullanılan tipik bir beyaz çürükçül türü %42'ye kadar gelişmiş ve %43 ¹⁴CO₂ ve yüksek aktivitede lakkaz, manganaz peroksidaz ve manganaz-serbest peroksidaz göstermiştir. *Gloeophyllum*'un saman ve sıvı kültürlerinde böyle hiçbir aktivite belirlenmemiştir. Bundan başka, *G. striatum*, her iki klorofenolü de metabolik olmayan şartlar altında, örneğin karboni nitrojen ve fosfat kaynağı olmayan tanımlanmış bir mineral medyumda etkili bir biçimde parçalamıştır.

O'Loughlin ve ark., (2000), sucul solusyonlarda, kil mineralleri varlığında sorbsiyonun etkisinin 2-metilpridin'in (2-MP) *Arthrobacter* ile biyolojik parçalanmasına etkisini araştırmışlardır. 2-MP'nin kaolinit, illit, hektorit, montmorillonit, and Dowex® üzerine adsorbsiyonu batch equilibrium metodu ile belirlenmiştir. 2-MP'nin parçalanması en hızlı olarak kaolinit süspansiyonlarında gözlenmiştir. Bunu sırasıyla kilsiz ortam, illit, Dowex®, hektorit, montmorillonit izlemiştir. Kaolinit dışında, 2-MP'in kil minerallerine ve Dowex®'e adsorbsiyonu biyolojik parçalanma oranını düşürdüğü belirtilmiştir.

2,4-D ve ilişkili kimyasallar içeren bir herbisit, *Eupackardia calleta*'nın tırtıllarını beslemek için verilmiştir. Larvada ve daha ileriki gelişim süreçlerinde, maddelerin akıbeti gaz kromatografisi/kütle spektrometresi ile izlenmiştir. Bileşikler larval midgutda, dışkıda, yağ vücut/hemolimfte ve hatta integümental bezler tarafından salgılanan ekzokrin salgısında değişik miktarlarda bulunmuştur. Bundan

başka bileşikler gelişimini tamamlamış güve örneklerinde de belirlenmiştir (Deml ve Dettner, 2001)

Tunçeli ve ark., (2001) su örnekleri içindeki bazı pestisitlerin sepiolit üzerinde yapıştırılmış *Saccharomyces cerevisiae* ile önceden konsantre edildikten sonra spektrometrik saptanmasını araştırmışlardır. Karbaril, klorprifos, linuron ve thiram'ın önceden konsantrasyonu ve tespiti için hassas ve seçici bir metot geliştirilmiştir. Önceden konsantrasyon çalışmaları için, sütun sorbsiyon metodu kullanılmıştır. Sorbent miktarı, pH, akış oranı, ekstraksiyon solüsyonunun hacmi ve sepiolit üzerine yapıştırılmış *Saccharomyces cerevisiae* üzerindeki pestisitlerin tutulmasını etkileyecek engeller gibi birçok parametreler dikkatle incelenmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki; 5 mL ekstrakt ve 20 µg pestisit içeren 100 mL örnek solüsyonu kullanılarak, örneğin pH derecesi karbaril ve thiram için 4-6, linuron için 4-8 ve klorprifos için 6 olduğu zaman, nicel analiz yapmak mümkün olmuştur. Karbaril, klorprifos, linuron ve thiram için geri alınımlar, optimum koşullar altında %95 güven seviyesinde sırasıyla; 93.2 ± 0.4 , 97.1 ± 0.3 , 98.5 ± 0.4 ve 96.1 ± 0.2 'dir. Sorbentin kapasitesi; karbaril, klorprifos, linuron ve thiram için sırasıyla 41, 28, 35 ve 46 mg g⁻¹ olarak bulunmuştur. Sepiolit üzerine yapıştırılmış *Saccharomyces cerevisiae* yirmi beş döngüye kadar kapasite kaybı olmadan tekrarlanan kullanımlar için uygun olduğu belirlenmiştir. Çalışılan pestisitler nehir suyundan yüksek kesinlik ve doğrulukla belirlenmiştir.

Kopytko ve ark., (2002) *Pseudomonas putida* ile iki ticari herbisit (Gramoxone ve Matancha) biyolojik parçalanmasını incelemişlerdir. Biyolojik parçalanma deneyleri için 2³ faktöryel modeli uygulanmıştır. Serbest değişkenler; herbisit konsantrasyonu, besin konsantrasyonu ve aktif kömür kullanılıp kullanılmamasıdır. İkili deneyler, 500 mL biyoreaktör kullanılan üç günlük bir periyotta yapılmıştır. Hiç aktif kömür kullanılmadığı zaman elde edilen en iyi sonuçlar Gramoxone için bozulma %47.29 (UV/VIS ile) ve Matancha için %68.72 (HPLC ile)'dir. Her iki herbisit için aktif kömürün kullanımı 72 saatte %95'den fazla bozulma vermiştir. Deneylerin büyük bir çoğunluğu 24 saat içinde en az %90 ayrılma göstermiştir. Aktif kömür ile yapışmanın ikili kombinasyonu ve bakteri ile biyolojik aktivite, özellikle %10 besleyici eklendiğinde çok etkili olmuştur.

Sonuçların istatistiksel çalışmaları göstermiştir ki, aktif kömür yüksek anlamlı bir değişkendir ve deneysel model içinde kullanılan üç değişken arasında önemli etkileşimler vardır. Kirli sularda bu deneylerin uygulanması; 24 saatlik periyot içinde, bu herbisitlerin her ikisinin de %90'dan fazla ayrılmasının mümkün olduğunu doğrulamıştır.

De Amarante ve ark., (2003) yaptıkları bir çalışmada, HPLC ile toprak örneklerinden 2,4-D ve temel dönüşüm ürünü 2,4-diklorofenol'ü (2,4-DCP) belirlemişlerdir. Herbisit ve parçalanma ürünü, ultrasound sistemde 1 saat diklorometan ile asdifikasyondan sonra toprak örneklerinden iki defa ekstrakte edilmişlerdir. Her iki ekstrakt da birleştirilmiş ve nitel filtre kağıdı ve Celite®'den filtre edilmiştir. Toplam ekstrakt, rotary evaporatörde konsantre edilmiş, N₂ altında kurutulmuş ve son olarak 1 mL metanolde çözülmüştür. 230 nm HPLC analizi için kullanılmıştır. Toprak örneklerinden elde edilen geri kazanımlar 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg kg⁻¹ seviyelerine güçlendirilmiştir. Sonuçlar 2,4-D için %80 ile %111 arasında ve 2,4-DCP için %95 ile %98 arasında çeşitlilik göstermiştir. Her iki bileşik için de miktar ölçme sınırı kesinliği ve doğruluğu önceden çakışılmış 0.1 mg kg⁻¹'dir. Ortaya çıkarma limitleri 2,4-D için 0.003 mg kg⁻¹ ve 2,4-DCP için 0.002 mg kg⁻¹'dir. Bu önerilen metot, önceden herbisit ile muamele edilmiş okaliptüs tarlalarından alınan toprak örneklerine uygulanmıştır. Bunun yanında ne 2,4-D ne de parçalanma ürünü, herbisit uygulamasından 30 gün sonra bulunamamıştır.

Murialdo ve ark., (2003) karışık ve saf kültürlerde fenolün ve klorofenollerin parçalanmasını araştırmışlardır. Elde ettikleri kültürler, fenol ve klorofenolleri (Pentaklorofenol, 2,3,5,6- tetraklorofenol ve 2,4,6-triklorofenol) parçalanma yeteneği göstermişlerken, 2,4,5-triklorofenolü parçalayamamışlardır. Pentaklorofenolün yıkıcı etkisi gösterilmiştir.

Boivin ve ark. (2005), 2,4-D'nin üç zirai toprakta sorbsiyonunu ve parçalanmasını çalışmışlardır. Sorbsiyon ve mineralizasyon arasındaki dinamik etkileşimleri değerlendirmek için, 2,4-D mineralizasyon deneyleri, farklı zamanlarda, üç farklı toprak (kil, verimli toprak ve kum) kullanılarak çalışılmıştır. Killi ve verimli topraklar için, uygulanan dozun %45 ve %48'i 10 günden sonra mineralize olmuştur. Kumlu toprakta, daha uzun lag zamanları yüzünden ilerleme çok daha yavaş

olmuştur. 2,4-D kalıntıları uygulamadan hemen sonra kolayca elde edilebilirken (%93'den fazlası geri alınabilirken), herbisit 60 gün inkübasyondan sonra her üç toprakta da çoğunlukla elde edilemez durumda (%2'den azı geri alınabilmiştir) bulunmuştur. Bağlı kalıntının toplam miktarı 30 ile 60 inkübasyon günü arasında azalmış olduğu bulunmuştur.

Withuhn ve ark. (2005), yaptıkları çalışmalarında, organik killer kullanarak *Ralstonia eutropha* ile 2,4-Diklorofenol'ün (2,4-DCP) parçalanmasına sorbsiyonun etkisini araştırmışlardır. 2,4-DCP organik killer üzerine sıkı şekilde yapıştırılmıştır. Bu durum sıvıdaki 2,4-DCP'ün konsantrasyonunu azaltmış ve azalan 2,4-DCP konsantrasyonu bakteriler için toksik etki göstermemiştir. Tam parçalanma olduğu için, desorbsiyon sürekli olarak, bakteri sıvıda çözünmüş haldeki 2,4-DCP'ü parçaladıkça, sıvıya geçişi olduğunu göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

3.1.1.1. GSP Agar: Toprakta bakteriyel izolasyonunda kullanılmıştır (Merck, 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Na-glutamat	10
Çözünabilir Nişasta	10
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄	0.5
Fenol kırmızısı	0.36
Agar	12

3.1.1.2. N1 Agar: Bakterilerin saf kültürlerinin saklanması için kullanılmıştır (Anonymus, 1978).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	10
Maya	5
Et özütü	10
D(+)-Glukoz	1
Agar	15

3.1.1.3. N1 Buyyon: 2,4-D'nin biyolojik parçalanması çalışmalarında bakterileri çoğaltmak için kullanılmıştır. Ayrıca bakterilerin sıcaklığa bağlı (+4 ve 41°C) üreme davranışlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Anonymus, 1978).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	10
Maya	5
Et özütü	10
D(+)-Glukoz	1

3.1.1.4. Plate Count Agar (PCA): 2,4-D'nin biyolojik parçalanması sırasında bakteri sayımı yapılmasında kullanılmıştır (Çetin, 1968).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	3
Agar	15

3.1.1.5. Minimal Tuz Besiyeri: 2,4-D'nin biyolojik parçalanmasında sıvı ortam olarak kullanılmıştır (Amarendra ve ark., 1998).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001
K ₂ HPO ₄	0.075
Ca(NO ₃) ₂	0.01

3.1.1.6. Clark-Lups Besiyeri: Bakterilerin identifikasyonunda metil kırmızısı testi için kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	7
D(+)-Glukoz	5
K ₂ HPO ₄	5

Besiyerinin pH'sı 6.9±0.1 ayarlanmalıdır.

3.1.1.7. KIA Besiyeri (Kligler Iron Agar): Bakterilerin hidrojen sülfür oluşturma yeteneklerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	10
Kazein peptonu	10
NaCl	5
D(+)-Glukoz	1
Laktoz	10
Amonyum demir III sitrat	0.5
Sodyum tiyosülfat	0.5
Fenol kırmızısı	0.025
Agar	15

Besiyerini pH'sı 7.4 olarak ayarlanır ve eğik katı şeklinde uygulanır.

3.1.1.8. İndol Besiyeri: Bakterilerin identifikasyonunda indol testlerinin yapılmasında kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	20
NaCl	5

Besiyerinin pH'sı 7.2'ye ayarlanır.

3.1.1.9. Kovacs İndol Ayıracı: Besiyerinde oluşan indolün araştırılmasında kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
p-dimetilamin benzaldehit	50
HCl	250 mL
İzoamil alkol	750 mL

3.1.1.10. Metil Kırmızısı Ayıracı: Metil kırmızısı testinde kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Metil kırmızısı	0.2
Etil alkol (%95'lik)	600 mL
Metil kırmızısı alkolde eritilir. Üzerine distile su eklenip litreye tamamlanır.	

3.1.1.11. Kovacs Oksidaz Ayıracı: Oksidaz testinde kullanılmıştır (Bilgehan, 2002).

<u>Bileşimi</u>
Tetrametil-p-fenilen diamin hidroklorid
Saf suda %0.5-1'lik eriyiği hazırlanır. +4-+10°C'de bir hafta saklanabilir.

3.1.1.12. NaCl ve CaCl Çözeltileri: 2,4-D'nin montmorillonite adsorpsiyonu ve parçalanması çalışmalarında kullanılmak üzere Ca-MM ve Na-MM hazırlama aşamalarında 1M NaCl ve 1M CaCl çözeltileri kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Topraktan Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Bakteri izolasyonu için toprak numuneleri önceden 2,4-D ile muamele edilmiş bir turunçgil bahçesinden alınmıştır. Laboratuvara getirilen toprak numuneleri 5 mL steril serum fizyolojik içerisinde homojen hale getirilmiş ve yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekten 10^{-4} - 10^{-5} sulandırma yapılarak GSP agara yayma tekniği ile ekilmiştir. Besiyerleri 25°C’de karanlıkta 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 2-3mm çaplı, mor renkli, çevresi kırmızı mor koloniler seçilerek stok kültür şeklinde saklanmıştır (Palleroni, 1984; Unz, 1984).

İdentifikasyon için metil kırmızısı testi, indol testi, hidrojen sülfür oluşturma testi, sıcaklığa bağlı üreme testi ve oksidaz testi yapılmıştır (Holt ve ark., 1994).

3.2.2. Biyokimyasal Testler

3.2.2.1. Metil Kırmızısı Testi: Stok kültürlerden Clark-Lups besiyerine birer öze ekim yapılmıştır. 37°C’ de 48 saat inkübe edilen örneklerin üzerine 3-4 damla metil kırmızısı ayıracından damlatılmış ve besiyerinin kırmızı renge dönüşmesine göre değerlendirme yapılmıştır (Bilgehan, 2002).

3.2.2.2. İndol Testi: Bakteri örneklerinin indol oluşturup oluşturmamalarının araştırılması amacıyla indol besiyerine öze ile ekim yapıldıktan sonra 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örneklerin üzerine 2 damla Kovacs ayırıcı damlatılmış ve besiyerinin yüzeyinde kırmızı halka oluşumuna bakılmıştır (Bilgehan, 2002).

3.2.2.3. Hidrojen Sülfür (H₂S) Oluşturma Testi: Örnekler KIA besiyerine iğne öze yardımıyla batırma kültür şeklinde ekildikten sonra 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerinde ekim çizgisi boyunca meydana gelen siyahlaşma H₂S pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

3.2.2.4. Sıcaklığa bağlı (+4 ve 41°C) Üreme Testi: Bakteriler iki ayrı N1 buyyona ekilmiştir. Tüplerden biri +4°C’de diğeri 41°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve üreme olup olmadığına bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

3.2.2.5. Oksidaz Testi: Bakterilerin oksidaz etkinliğini belirlemek için steril kürdanla alınan örnekler Kovacks ayırıcına batırılmış şerit halindeki süzgeç kağıdın yüzeyine sürülmüştür. 5-30 saniyelik süre içerisinde mor renk oluşturan bakteriler oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

3.2.3. Bakterilerin API 20 NE ile İdentifikasyonu

API 20 NE non-enterik, Gram negatif çubukların (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* gibi) identifikasyonu için 8 geleneksel ve 12 özümleme testlerinin kombinasyonundan oluşmuş standart bir identifikasyon sistemidir. 8 geleneksel test tuzlu sudaki süspanse haldeki bakterilerin metabolizma ürünlerinin inkübasyon sonunda renk değişiminin doğal veya ayraçlarla muamele sonucunda izlendiği testlerdir. 12 özümleme testlerinde bakteri API AUX Medium ile inoküle edilir ve eğer bu substratları kullanabilirse gelişir. Bu 8 geleneksel test ve 12 özümleme testi sırasıyla şunlardır: Potasyum nitrat (NO₃), L-Tryptofan (TRP), D-Glikoz (GLU), L-Arginin (ADH), Üre (URE), Esculin demir sitrat (ESC), Jelatin (GEL), 4-nitrophenyl β-D-galaktopyranozid (PNPG); D-Glikoz (GLU), L- Arabinoz (ARA), D- Mannoza (MNE), D- Mannitol (MAN), N-asetil glikozamin (NAG), D-Maltoz (MAL), Potasyum glikonat (GNT), Kaprik asit (CAP), Adipik asit (ADI), Malik asit (MLT), Trisodyum sitrat (CIT), Fenil asetik asit (PAC); Oksidaz (OX). Tüm testlerin sonuçları API LAB PLUS Programında değerlendirilir.

3.2.4. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi

Topraktan izole edilen ve biyokimyasal testleri yapılmış olan 24 bakteri suşundan 2,4-D'li besiyerinde iyi üreyen 6 tanesi seçilmiş ve MIC miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Karbon kaynağı ilave edilmemiş sıvı ve katı N1 besiyerine sterilizasyondan sonra 25, 50, 100, 200, 400 ve 600 mg/L konsantrasyonlarında 2,4-D ilave edilmiş ve bakterilerin üreme durumları değerlendirilip en yüksek konsantrasyonda da üreyebilen iki suş seçilmiştir. Çalışmada ortalama bir konsantrasyon olan 300 mg/L 2,4-D kullanılmıştır.

3.2.5. Montmorillonit'in NaCl ve CaCl ile Muamele Edilmesi

Çalışmada kullanılmak üzere montmorillonit'den (MM) 11 g Ca-MM ve 11 g Na-MM kompleksleri hazırlamak için, ayrı ayrı 275 mL saf suda 1M NaCl ve 1M CaCl çözeltileri hazırlanmış ve üzerlerine 11'er g montmorillonit (Aldich K10 kil, yüzey alanı 220-270 m²/g, [CAS, 70131-50-9]) eklenmiştir. Örnekler bir hafta 180 rpm'de 25°C'de orbital olarak çalkalanmışlardır. Bir gün bekletildikten sonra üst sıvı alınıp, bir gece kurumaları için vakum uygulanmıştır. Komplekslerden fazla klorun uzaklaştırılması için diyaliz torbası (Sigma, 21µm por çaplı, 30 cm uzunluğunda) ile saf suda üç kez yıkanmışlardır. Hazırlanan Na-MM ve Ca-MM kompleksleri bir gece daha vakumda kurutulmuş ve çalışmalar için kullanılmıştır.

3.2.6. 2,4-D'nin Montmorillonit'e Adsorbsiyonu

Na-MM, Ca-MM kompleksleri ve montmorillonit 2 gr/L olacak şekilde önceden steril edilmiş 250 mL'lik şişelere konulmuş, sterilizasyon için ağzıları yarı açık vaziyette bir gece 105°C'de pastör fırınında bekletilmiştir. 0.3 g/L (300 mg/L) 2,4-D olacak şekilde, pH'sı 4'e ayarlanmış saf suda 2,4-D çözülmüştür. 2,4-D çözeltisi filtreden (0.2µm por çaplı, selüloz asetat S&S filtre) geçirilerek, Na-MM, Ca-MM ve montmorillonit üzerine ilave edilmiştir. Örnekler 1 hafta boyunca 25°C'de 180 rpm'de orbital olarak çalkalanmışlardır. Bir hafta sonunda, 2,4-D

yapışmış Na-MM, Ca-MM kompleksleri ve montmorillonit, steril şartlarda 8000 rpm 25°C’de 10 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı kısım alınmış dipte kalan kompleks çalışmalarda kullanılmıştır (Aksu ve Kabasakal, 2004).

3.2.7. 2,4-D’nin Montmorillonit’de Abiyotik Parçalanması

2,4-D’nin kilde abiyotik parçalanmasını incelemek için, steril şartlarda 2,4-D yapışmış Na-MM, Ca-MM kompleksleri ve montmorillonit üzerine minimal tuz besiyeri ilave edilmiş, örnekler 0, 24, 48, 72, 120 ve 168. saatlerde 20’şer mL alınarak katı ve sıvı olarak ekstraksiyonları ayrı ayrı yapılmıştır daha sonra spektrofotometrede analizi yapılmak üzere tüplere alınmıştır.

3.2.8. 2,4-D’li ve 2,4-D’siz Ortamda Bakteri Gelişimi

2,4-D, Na-MM, Ca-MM kompleksleri ve kile yapıştıktan sonra üzerine filtreden geçirilerek steril edilmiş minimal tuz besiyeri ilave edilmiştir. Steril olarak N1 bunyonda çoğaltılan bakteri kültürleri ortama ilave edilmiştir. Gelişmeleri 0, 6, 24, 48, 72, 120 ve 168. saatlerde alınan 20 mL örneklerden 0.5mL’lik örneklerin 10^8 - 10^9 seri sulandırılmalarıyla PCA besiyerine yayma ekimleri yapılarak toplam bakteri sayısı izlenmiştir. 2,4-D olamayan ortamda Na-MM, Ca-MM komplekslerine ve montmorillonit’e steril besiyeri ve bakteriler eklenmiş, aynı işlemler uygulanmış ve bakteri gelişimi izlenmiştir.

3.2.9. 2,4-D’nin Montmorillonit ve Minimal Mediyumda Bakteriyel Parçalanması

Çalışmada kullanılan 300 mg/L 2,4-D steril koşullarda Na-MM, Ca-MM ve montmorillonit komplekslerine yapıştırılmış ve üzerlerine 0.2µm por çaplı fitreden geçirilerek steril edilmiş minimal tuz besiyerleri ilave edilmiştir. N1 sıvı kültürde zenginleştirilmiş bakteri örnekleri steril olarak parçalanmanın gerçekleştirileceği 2,4-D’li Na-MM, Ca-MM, montmorillonit ve minimal tuz besiyerlerine ilave edilmiştir.

Biyolojik parçalanma çalışmaları oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 160 rpm'de çalkalama kültür şeklinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca 0, 6, 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik periyotlarda steril şartlarda 20mL örnekler alınmıştır. Örneklerdeki 2,4-D etil asetat ile ekstraksiyonu yapılarak ayrılmıştır.

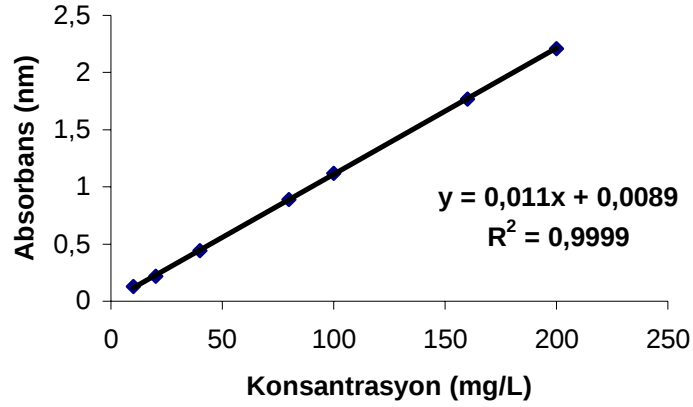
3.2.10. 2,4-D'nin Montmorillonit'den ve Sıvı Besiyerinden Ekstraksiyonu

0, 6, 24, 48, 72, 120 ve 168. saatlerde alınan 20 mL örnekler önce 5 dakika 3200 rpm'de santrifüj edilmiş sıvı ve katı kısımlar ayrı ayrı ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak etil asetat kullanılmıştır (Aksu ve Kabasakal, 2004). Sıvı kısımlar ayrılma hunilerine aktarılmış 1mL %15 HCL ile asitlenmeden sonra üzerlerine 10 mL etil asetat ilave edilmiş ve 3 dakika çalkalandıktan sonra iki faz oluşana kadar beklenmiş, üst kısımlar Rotary Evaporatörde (Heidoph) yoğunlaştırılmak üzere temiz tüplere aktarılmıştır. Katı kısımlar bir gece vakumda kurutulduktan sonra üzerlerine 1 mL aseton ve 10 mL etil asetat ilave edilmiş, 3 dakika çalkalandıktan sonra 5 dakika 3200 rpm'de santrifüj edilmiş, üst kısımlar Rotary Evaporatörde (Heidoph) yoğunlaştırılmak üzere temiz tüplere aktarılmıştır. Çözeltideki 2,4-D Rotary Evaporatörde (Heidoph) 70°C sıcaklıkta etil asetatı ayrılmıştır. Balonda kuruluğa kadar işlem devam ettirilmiştir. Balonun cidarlarına yapışmış halde bulunan 2,4-D'nin 3mL etil asetat ilave edilerek geri alınımı sağlanmış ve daha sonra örnekler spektrofotometrede analizi yapılmak üzere tüplere aktarılmıştır.

3.2.11. 2,4-D'nin UV visible Spektrofotometre Analizi ve Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması

0, 6, 24, 48, 72, 120 ve 168. saatlerde alınan 20 mL örnekler katı ve sıvı olarak ayrı ayrı ekstarkte edilmiş Cecil 5000 Series UV spektrofotometrede 282 nm'de, etil asetata karşı okunması yapılmıştır (Bekbölet ve ark., 1999). Kalibrasyon eğrisi için 5'er mL etil asetat içinde 10, 20, 40, 80, 100, 160 ve 200 mg/L konsantrasyonlarda 2,4-D'nin ölçümü yapılmıştır. Ölçümler etil asetata karşı 282

nm’de yapılmıştır. 282 nm’deki değerlerin konsantrasyonlara karşı grafiğindeki eğim ile elde edilen denklem hesaplamalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.1. 2,4-D'nin Çalışmada Kullanılan Kalibrasyon Eğrisi

Buna göre konsantrasyonların belirlendiği denklem aşağıda verilmiştir:

$$C \text{ (mg/L)} = (282 \text{ nm Değeri} \times 0.011 \times 100 / \text{Konsantre Edilen Hacim}) \times 1000$$

3.2.12. Desorpsiyon ve Parçalanma Değerlerinin Hesaplanması

Na-MM, Ca-MM ve montmorillonit'ten 2,4-D'nin teorik desorpsiyon ve parçalanma miktarı hesaplanırken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{Teorik Desorpsiyon} = C_{Kt1} - C_{Kt2}$$

$$\text{Parçalanma Miktarı} = \text{Teorik desorpsiyon } t_1 - C_{St1}$$

4. BULGULAR

4.1. Parçalanma İçin Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Çalışmalarda kullanılan bakteri suşları 2,4-D kullanılmış turuncgil bahçesi toprağından metod kısmında belirtildiğı şekilde izole edilmiştir. İzole edilen bakterilere gram boyama yapılarak gram negatif olanlara biyokimyasal testler uygulanmış ve tanımlamaları yapılmıştır. Çizelge 4.1’de izolatların biyokimyasal test sonuçları verilmiştir. Bu suşlardan 2,4-D’li ortamda en iyi üreyen 6 tanesi MIC belirlemek için seçilmiştir.

Çizelge 4.1. Topraktan İzole Edilen Suşların Biyokimyasal Özellikleri

	ÖZELLİKLER					
	+4°C’de üreme	41°C’de üreme	Oksidaz	İndol	H ₂ S	Metil Kırmızısı
A1	+	-	+	-	-	-
A2	-	+	+	-	-	-
A3	-	-	+	-	+	-
A4	-	-	+	-	-	-
A5	+	-	+	-	-	-
A6	+	-	+	-	-	-
P1	+	+	+	-	-	-
P2	+	+	+	-	-	-
P3	+	+	+	-	-	-
P4	-	-	+	-	-	-
P5	+	-	+	-	-	-
P6	+	-	+	-	-	-
P7	+	-	+	-	-	+
P8	-	+	+	-	-	-
P9	+	+	+	-	-	-
tP1	+	-	+	-	-	-
tP2	+	-	+	-	-	-
tP3	+	-	-	-	-	-
tP4	+	+	+	-	-	-
tP5	+	+	+	-	-	-
tP6	+	-	+	-	-	-
tP7	+	-	-	-	-	-

4.2. MIC Sonuçları

Seçilen 6 suş değişik konsantrasyonlarda 2,4-D içeren ve karbon kaynağı olmayan besiyerlerinde üretilmiş ve en iyi üreme gösteren iki suş parçalama çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenmiştir. Denenen konsantrasyonlar ve suşların üreme davranışları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. MIC Belirleme Testlerinin Sonuçları

Konsantrasyon (mg/L)	A4	P4	P7	tP3	tP5
0	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
100	+	-	+	+	+
200	+	-	+	+	-
400	+	-	-	+	-
600	-	-	-	+	-

4.3. API 20NE Sonuçları

MIC testlerinden sonra en yüksek konsantrasyonlarda üreyen A4 ve tP3 suşları 2,4-D’nin bakteriyel parçalanması çalışmalarında kullanılmıştır. Bu iki suşun API 20 NE identifikasyon test kitiyle de tanımlaması yapılmış ve buna göre sonuçlar Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. A4 ve tP3 Suşlarının API İdentifikasyon Testleri Sonuçları

	Anlamlı Taksa	% ID
A4	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	89.4
tP3	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	82.0

Na ve Ca ile muamele edilmiş ve Na ve Ca'nın fazlasının uzaklaştırıldığı parçalanma çalışmalarında kullanılacak montmorillonit üzerine 300 mg/L 2,4-D metod kısmında belirtilen şekilde yapıştırılmıştır. Hem abiyotik hem de bakteriyel çalışmalar 2,4-D'nin montmorillonit'e yapıştırılmasından sonra gerçekleştirilmiştir.

Tüm çalışmalar vidalı kapaklı cam şişelerde batch sistem olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de çalışma sistemi gösterilmiştir.

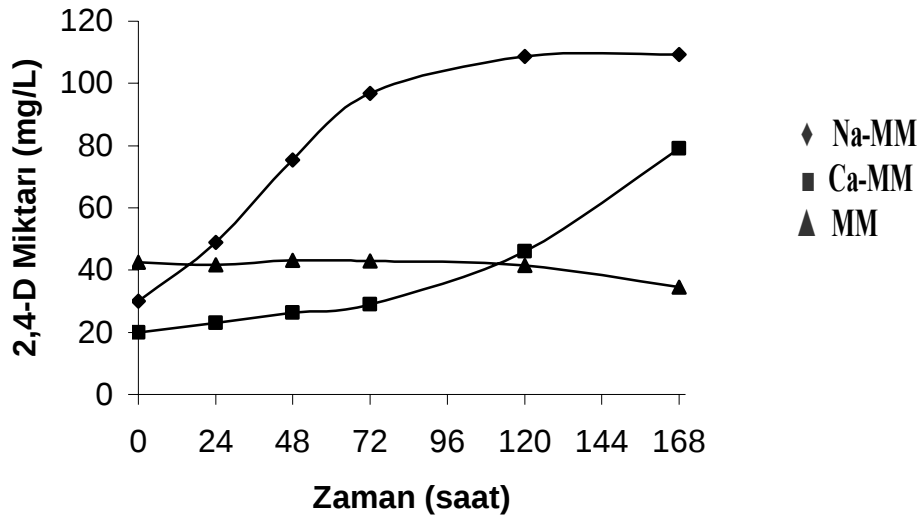


Şekil 4.1. Adsorpsiyon ve Parçalanma Çalışmalarında Kullanılan Deney Düzenegi

4.4. 2,4-D'nin Abiyotik Parçalanması

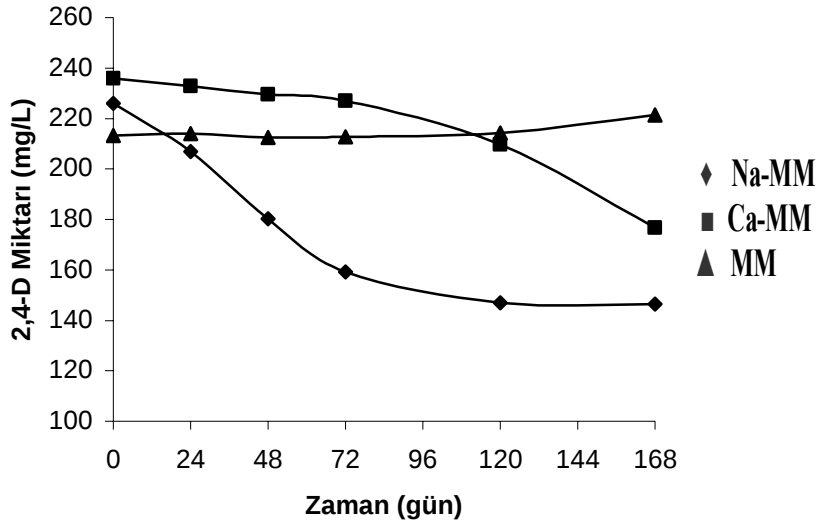
2,4-D'nin Na-MM, Ca-MM ve montmorillonit (MM) üzerinden abiyotik olarak parçalanması, zamana bağlı desorpsiyonuyla izlenmiştir. Abiyotik parçalanma çalışmalarında belirlenen periyotlarda sıvı-sıvı ekstraksiyon sonuçları Şekil 4.2 (A)'da verilmiştir. 2,4-D'nin bakterisiz ortamda desorpsiyonun dengeye ulaşma zamanları üç montmorillonit'te de farklılık göstermiştir. 2,4-D'nin başlangıçta Na-MM'den desorbe olan miktarı 29.93mg/L iken, Ca-MM'den desorbe olan miktarı 19.95mg/L ve montmorillonit'ten desorbe olan miktarı ise 42.54mg/L'dir. Montmorillonit'ten 2,4-D'nin desorpsiyonu başlangıçta desorbe olduğu miktar olan 42.54 mg/L seviyelerinde kalmış zamanla bir değişiklik gözlenmemiştir. Na-MM'e

adsorbe olan 2,4-D'nin 120. saatte sıvıya desorbe olan miktarı 108.72mg/L'ye yükselirken, Ca-MM'e adsorbe olan 2,4-D'nin 120.saatte sıvıya desorbe olan miktarı 46.04mg/L'ye yükselmiştir. MM'e adsorbe olan 2,4-D'nin 120.saatte sıvıya desorbe olan miktarı 41.44mg/L olarak belirlenmiştir. 2,4-D'yi sırasıyla en sıkı adsorbe eden Na-MM>Ca-MM>MM olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.2.(A) 2,4-D'nin Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonları

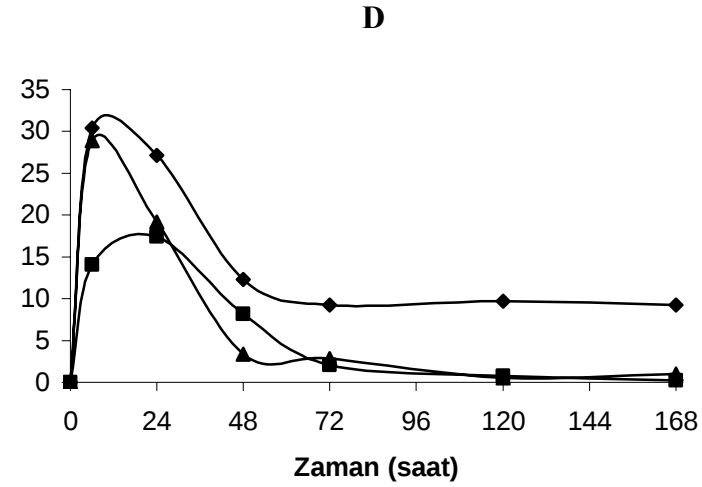
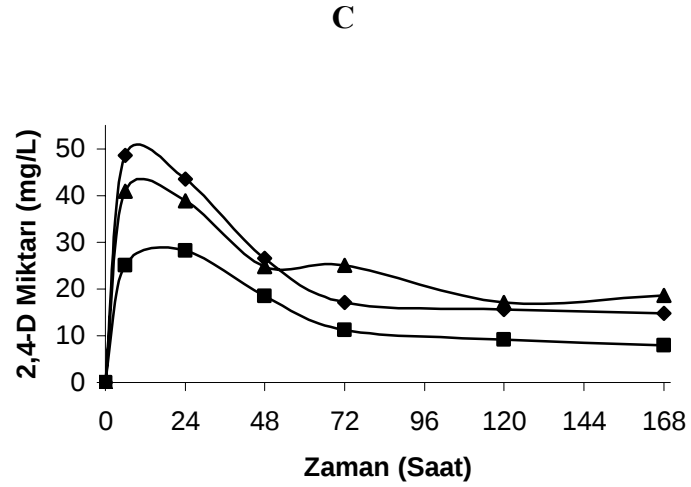
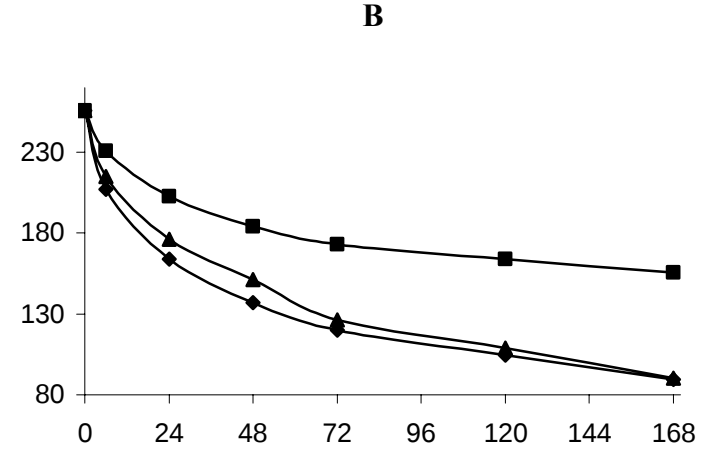
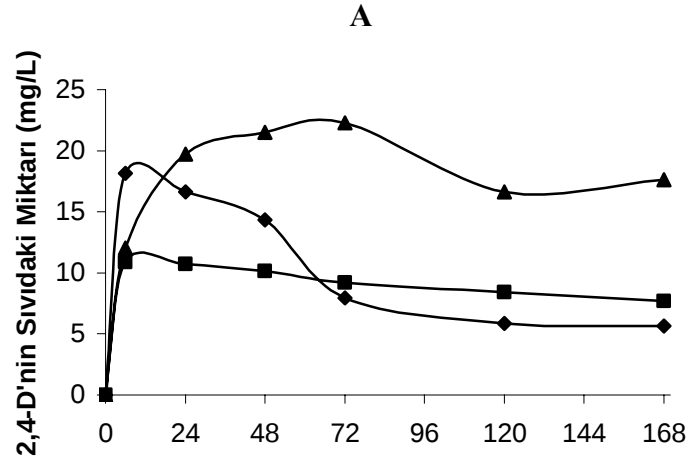
Şekil 4.2. (B)'de 2,4-D'nin katı-sıvı ekstraksiyon sonuçları verilmiştir. 2,4-D'nin başlangıçta Na-MM'de kalan miktarı 225.88mg/L iken, Ca-MM'de kalan miktarı 235.86mg/L ve montmorillonit'te kalan miktarı ise 213.34mg/L'dir. 168. saatte Na-MM'de kalan 2,4-D miktarı 146.58mg/L iken, Ca-MM'de kalan miktar 176.76mg/L ve MM'de kalan miktar ise 221.27mg/L olarak belirlenmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonların ve katı-sıvı ekstraksiyonların sonuçlarının toplamında 2,4-D miktarında zamanla bir değişiklik gözlenmemiştir. İlk ve son örneklerin sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyon sonuçları toplamı Na-MM, Ca-MM ve MM için 255.89 mg/L olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar 2,4-D'nin abiyotik olarak parçalanmadığını göstermektedir.



Şekil 4.2.(B) 2,4-D'nin Katı-Sıvı Ekstraksiyonları

4.5. *Alcaligenes xylosoxidans* ile 2,4-D'nin Parçalanması

2,4-D'nin *Alcaligenes xylosoxidans* ile muamelesinde, zamana bağlı sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu, sıvıdaki konsantrasyon miktarları Şekil 4.3. (A)'da, zamana bağlı katı-sıvı ekstraksiyon sonucu, katıdaki konsantrasyon miktarları Şekil 4.3. (B)'de verilmiştir. Sıvıdaki 2,4-D miktarları 6. saatte Na-MM için en yüksek değer olan 18.16mg/L, Ca-MM için en yüksek değer olan 10.9mg/L olarak bulunmuştur. MM için ise sıvıdaki 2,4-D miktarı en yüksek değer olan 22.26mg/L'ye 72. saatte ulaşmıştır. Sıvıdaki 2,4-D miktarları parçalanmaya bağlı olarak bir azalış göstermiştir. 168. saatte sıvıdaki 2,4-D miktarı Na-MM için 5.63mg/L iken, Ca-MM için 7.67mg/L ve MM için ise 17.65mg/L olarak bulunmuştur. Katı-sıvı ekstraksiyon sonucu katıdaki 2,4-D miktarları zamana bağlı olarak bir azalış göstermişlerdir. Başlangıçta her kompleks içinde 255.81mg/L 2,4-D bulunurken, 168. saatte Na-MM'deki 2,4-D miktarının 89.53mg/L'ye, Ca-MM'deki 2,4-D miktarının 155.79mg/L'ye ve MM'deki 2,4-D miktarının ise 90.30mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* ile muamele sonunda katıda kalan 2,4-D miktarlarında en fazla azalma Na-MM'de olmuştur. Katı-sıvı ekstraksiyon sonucu katıdaki 2,4-D miktarı olurken en az azalma Ca-MM'de meydana gelmiştir.



Şekil 4.3. *Alcaligenes xylosoxidans* ile Parçalanma Çalışmaları (A) 2,4-D'nin sıvı-sıvı ekstraksiyonu (B) 2,4-D'nin katı-sıvı ekstraksiyonu (C) 2,4-D'nin desorpsiyon miktarları (D) 2,4-D'nin parçalanma miktarları (♦ Na-MM, ■ Ca-MM, ▲ MM)

Şekil 4.3. (C)'de 2,4-D'nin zamana bağlı olarak katıdan desorpsiyonu verilmiştir. Bu grafik, katı-sıvı ekstraksiyonundan t_1 zamanında elde edilen konsantrasyon miktarlarının t_2 zamanında elde edilen konsantrasyon miktarlarından çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Na-MM'deki 2,4-D miktarı 6. saatte 48.6mg/L iken Ca-MM'de 25.07mg/L ve MM için ise 40.93mg/L olarak bulunmuştur. 168. saatte ise, Na-MM'deki 2,4-D miktarının 14.84mg/L'ye, Ca-MM'deki 2,4-D miktarının 7.93mg/L'ye ve MM'deki 2,4-D miktarının ise 18.67mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir.

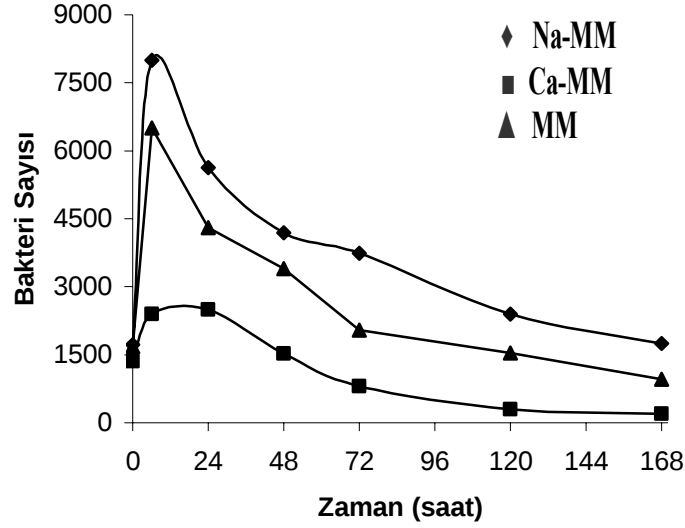
Şekil 4.3. (D)'de ise 2,4-D'nin zamana bağlı olarak *Alcaligenes xylosoxidans* ile parçalanması verilmiştir. Bu grafik, 2,4-D'nin t_1 zamanındaki desorpsiyon miktarlarından sıvı-sıvı ekstraksiyonundan t_1 zamanında elde edilen miktarların çıkarılması ile elde edilmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 6. saatte Na-MM'de bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı 30.44mg/L olarak belirlenmişken, Ca-MM'e bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı 14.07mg/L ve MM'e bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı ise 28.91mg/L olarak belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak 2,4-D'nin parçalanması sonucu miktarlarında azalma gözlenmiştir. 168. saatte Na-MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı 9.21mg/L'ye düşerken, Ca-MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı 0.26mg/L'ye ve MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı ise 1.02mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir.

Abiyotik parçalanmada desorpsiyon ve buna bağlı olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon değerleri zamanla artmaktayken bakteriyel parçalanma deneylerinde 2,4-D'nin sıvı-sıvı ekstraksiyon değerleri zamanla azalmıştır.

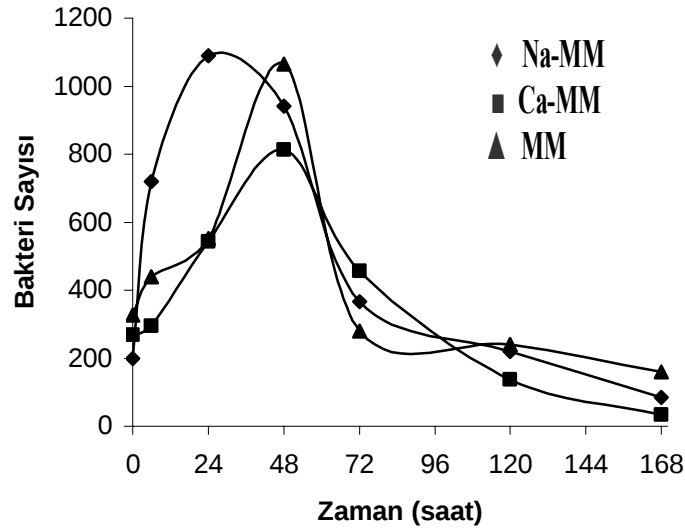
4.6. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamlarda Gelişimi

2,4-D'yi parçalayan *Alcaligenes xylosoxidans*'ın zamana bağlı sayısındaki değişim Şekil 4.4'te verilmiştir. Grafığe göre 6. saatte, bakteri sayıları parçalanma ile orantılı olarak en yüksek değere ulaşmışlardır. Na-MM kompleksinde bakteri sayısı 6.saatte 8×10^8 kob/mL iken, Ca-MM'de 2×10^8 kob/mL ve MM'de ise 7×10^8 kob/mL olarak bulunmuştur. Zamana bağlı olarak bakteri sayılarında bir azalma gözlenmiştir. 168. saatte Na-MM'deki bakteri sayısı 2×10^8 kob/mL'e düşerken, Ca-MM'deki

bakteri sayısı 2×10^7 kob/mL'e ve MM'deki bakteri sayısı ise 1×10^8 kob/mL'e düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.4. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 2,4-D'li Ortamda Bakteri Sayıları



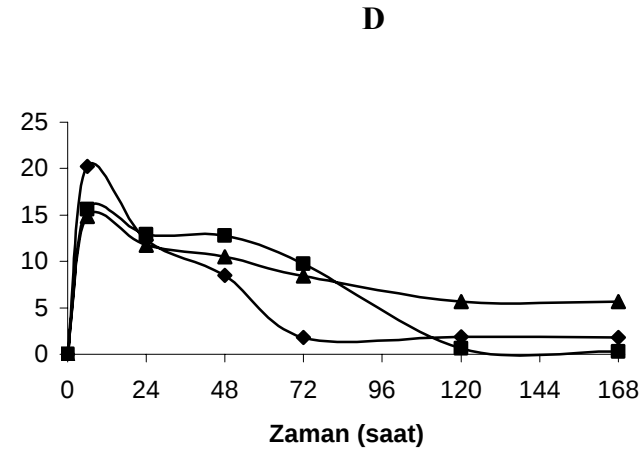
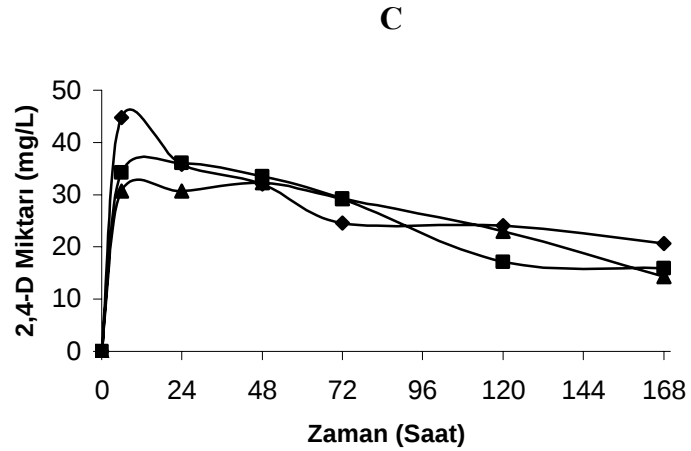
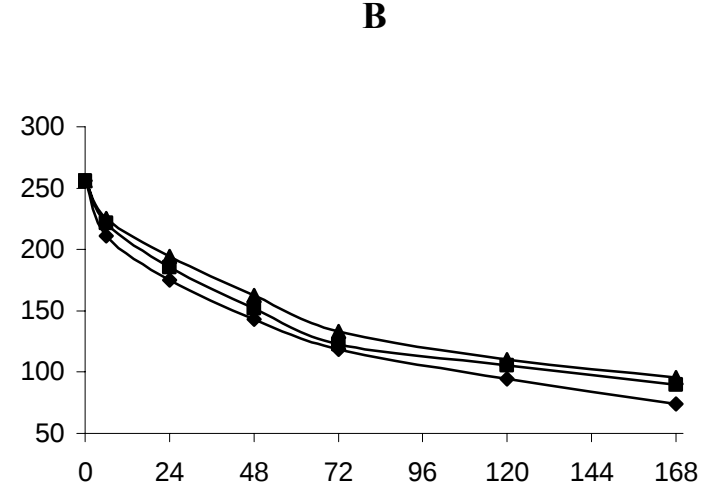
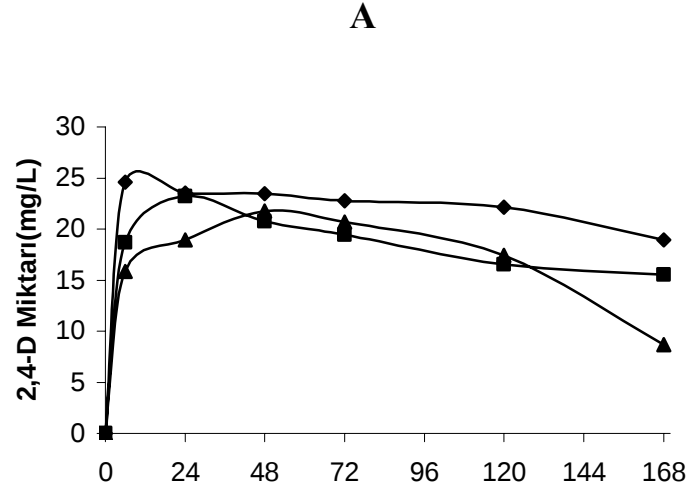
Şekil 4.5. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 2,4-D'siz Ortamda Bakteri Sayıları

2,4-D'siz ortamda *Alcaligenes xylosoxidans*'ın bakteri gelişimi Şekil 4.5'te verilmiştir. Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı belirlenen zaman aralığında 24. saatte maksimum değeri olan 1×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenirken, Ca-MM'li

örneklerdeki bakteri sayısı 48. saatte maksimum değeri olan 8×10^7 kob/mL'e ve MM'li örneklerde ise 48. saatte maksimum değeri olan 1×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak bakteri sayılarında bir azalma gözlenmiştir. 168. saate Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 8×10^6 kob/mL'e düşerken, Ca-MM'li örneklerdeki bakteri sayısının 3×10^6 kob/mL'e ve MM'li örneklerdeki bakteri sayısının ise 2×10^7 kob/mL'e düştüğü belirlenmiştir.

4.7. *Alcaligenes denitrificans* ile 2,4-D'nin Parçalanması

2,4-D'nin *Alcaligenes denitrificans* ile muamelesinde, zamana bağlı sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucu, sıvıdaki konsantrasyon miktarları Şekil 4.6. (A)'da, zamana bağlı katı-sıvı ekstraksiyon sonucu, katıdaki konsantrasyon miktarları Şekil 4.6. (B)'de verilmiştir. Sıvıdaki 2,4-D miktarları Na-MM için en yüksek değer olan 24.56mg/L'ye 6. saatte, Ca-MM için en yüksek değer olan 23.18mg/L'ye 24. saatte ulaştığı bulunmuştur. MM için ise sıvıdaki 2,4-D miktarı en yüksek değer olan 21.74mg/L'ye 48. saatte ulaşmıştır. Sıvıdaki 2,4-D miktarları parçalanmaya bağlı olarak bir azalış göstermiştir. 168. saatte sıvıdaki 2,4-D miktarı Na-MM için 18.93mg/L iken, Ca-MM için 15.55mg/L ve MM için ise 8.7mg/L olarak bulunmuştur. Katı-sıvı ekstraksiyon sonucu katıdaki 2,4-D miktarları zamana bağlı olarak bir azalış göstermişlerdir. Başlangıçta her kompleks içinde 255.81mg/L 2,4-D bulunurken, 168. saatte Na-MM'deki 2,4-D miktarının 73.93mg/L'ye, Ca-MM'deki 2,4-D miktarının 89.79mg/L'ye ve MM'deki 2,4-D miktarının ise 95.67mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans* ile muamele sonunda katıda kalan 2,4-D miktarlarında en fazla azalma Na-MM'de olmuştur.



Şekil 4.6. *Alcaligenes denitrificans* ile Parçalanma Çalışmaları (A) 2,4-D'nin sıvı-sıvı ekstraksiyonu (B) 2,4-D'nin katı-sıvı ekstraksiyonu (C) 2,4-D'nin desorpsiyon miktarları (D) 2,4-D'nin parçalanma miktarları (♦ Na-MM, ■ Ca-MM, ▲ MM)

Şekil 4.6. (C)'de 2,4-D'nin zamana bağlı olarak katıdan desorpsiyonu verilmiştir. Bu grafik, katı-sıvı ekstraksiyonundan t_1 zamanında elde edilen konsantrasyon miktarlarının t_2 zamanında elde edilen konsantrasyon miktarlarından çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Na-MM'deki 2,4-D miktarı 6. saatte 44.77mg/L iken Ca-MM'de 34.28mg/L ve MM için ise 30.7mg/L olarak bulunmuştur. 168. saatte ise, Na-MM'deki 2,4-D miktarının 20.72mg/L'ye, Ca-MM'deki 2,4-D miktarının 15.86mg/L'ye ve MM'deki 2,4-D miktarının ise 14.33mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir.

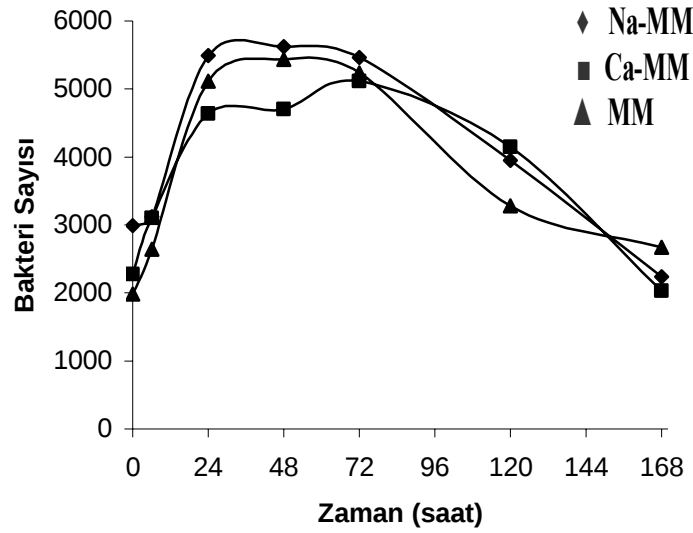
Şekil 4.6. (D)'de ise 2,4-D'nin zamana bağlı olarak *Alcaligenes denitrificans* ile parçalanması verilmiştir. Bu grafik, 2,4-D'nin t_1 zamanındaki desorpsiyon miktarlarından sıvı-sıvı ekstraksiyonundan t_1 zamanında elde edilen miktarların çıkarılması ile elde edilmiştir. *Alcaligenes denitrificans*'ın 6. saatte Na-MM'de bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı 20.21mg/L olarak belirlenmişken, Ca-MM'e bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı 15.58mg/L ve MM'e bağlı 2,4-D'yi parçalama miktarı ise 14.84mg/L olarak belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak 2,4-D'nin parçalanması sonucu parçalanma miktarlarında azalma gözlenmiştir. 168. saatte Na-MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı 1.79mg/L'ye düşerken, Ca-MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı 0.31mg/L'ye ve MM'e bağlı 2,4-D'nin parçalanma miktarı ise 5.63mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir.

Abiyotik parçalanmada desorpsiyon ve buna bağlı olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon değerleri zamanla artmaktayken bakteriyel parçalanma deneylerinde 2,4-D'nin sıvı-sıvı ekstraksiyon değerleri zamanla azalmıştır.

4.8. *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamlarda Gelişimi

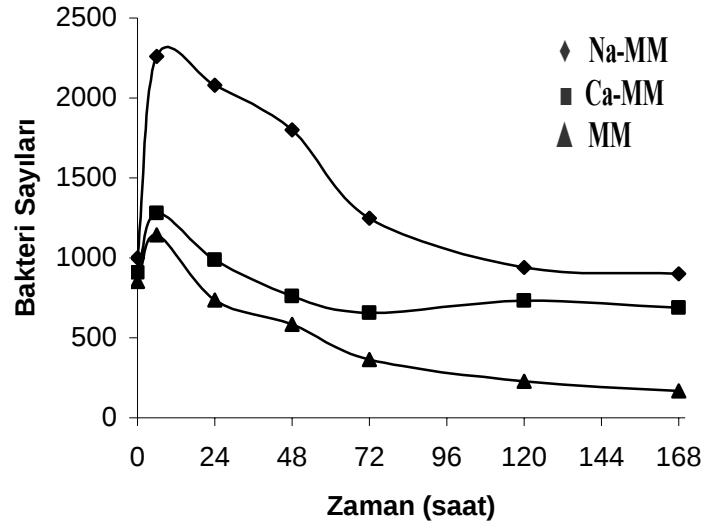
2,4-D'nin *Alcaligenes denitrificans* ile parçalanmasındaki zamana bağlı olarak bakteri sayısındaki değişim Şekil 4.7'de verilmiştir. Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 48. saatte 6×10^8 kob/mL'e ulaşırlarken Ca-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 72. saatte 5×10^8 kob/mL'e ulaştığı gözlenmiştir. MM'li örneklerdeki bakteri sayısı ise 48. saatte 5×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak bakteri sayılarında bir azalma gözlenmiştir. Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 168. saatte 2×10^8 kob/mL'e düşerken, Ca-MM'li örneklerdeki bakteri sayısının 2×10^8

kob/mL'e ve MM'li örneklerdeki bakteri sayısının ise 3×10^8 kob/mL'e düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.7. *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'li Ortamda Bakteri Sayıları

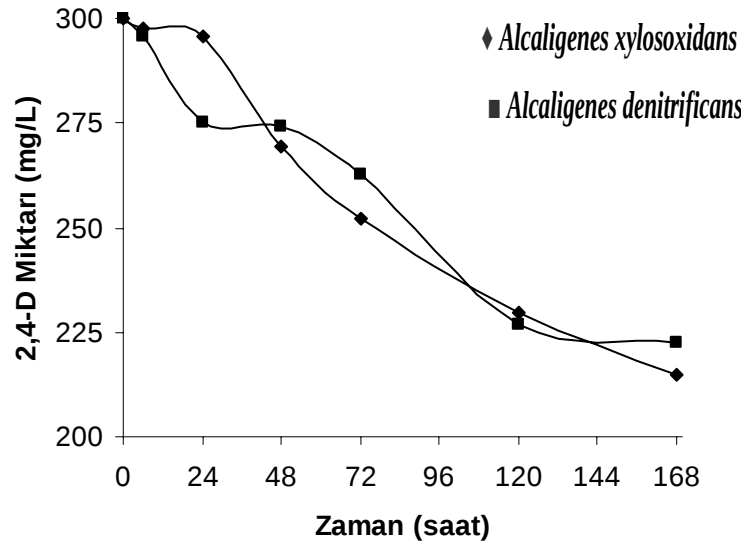
Alcaligenes denitrificans için 2,4-D'siz ortamdaki bakteri sayısındaki en yüksek değer 6. saatte Na-MM'li örnekler için 2×10^8 kob/mL olarak belirlenirken, Ca-MM'li örnekler için 1×10^8 kob/mL ve MM'li örnekler için ise 1×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir. Na-MM kompleksinde üreme en fazla olmuştur. Bakteri sayılarının her üç kompleks içinde zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. 168. saatte bakteri sayılarının Na-MM'li örneklerde 9×10^7 kob/mL'e, Ca-MM'li örneklerde 7×10^7 kob/mL'e ve MM'li örneklerde ise 2×10^7 kob/mL'e düştüğü belirlenmiştir. Şekil 4.8'de *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'siz ortamdaki bakteri sayılarının zamana bağlı olarak değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'siz Ortamda Bakteri Sayıları

4.9. Sıvı Kültürde 2,4-D'nin *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans* Tarafından Parçalanması

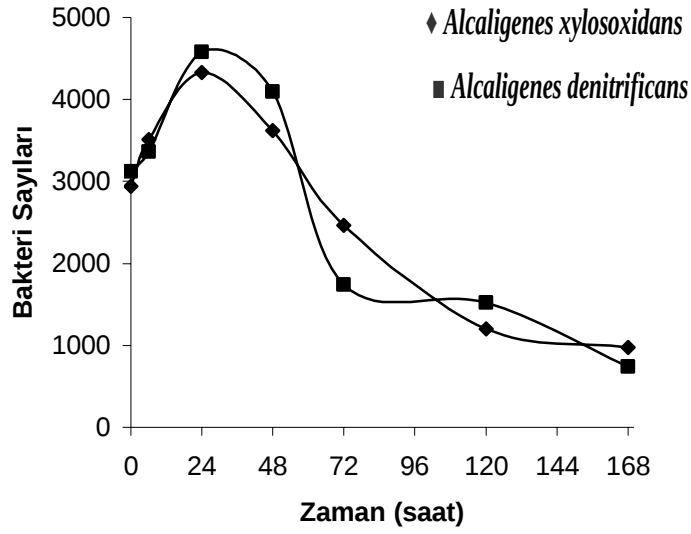
2,4-D'nin sadece minimal tuz besiyerinde iki bakteri tarafından parçalanması Şekil 4.9'da verilmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* bakterisinin belirlenen zaman aralığında başlangıçta koyulan 300mg/L 2,4-D'yi 168 saatte 214.8mg/L'ye düşürdüğü belirlenmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 168 saatte 2,4-D'nin %28.4'ünü parçaladığı gözlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans* bakterisinin ise, belirlenen zaman aralığında başlangıçta koyulan 300mg/L 2,4-D'yi 168 saatte 222.3mg/L'ye düşürdüğü belirlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans*'ın 168 saatte 2,4-D'nin %25.9'unu parçaladığı gözlenmiştir.



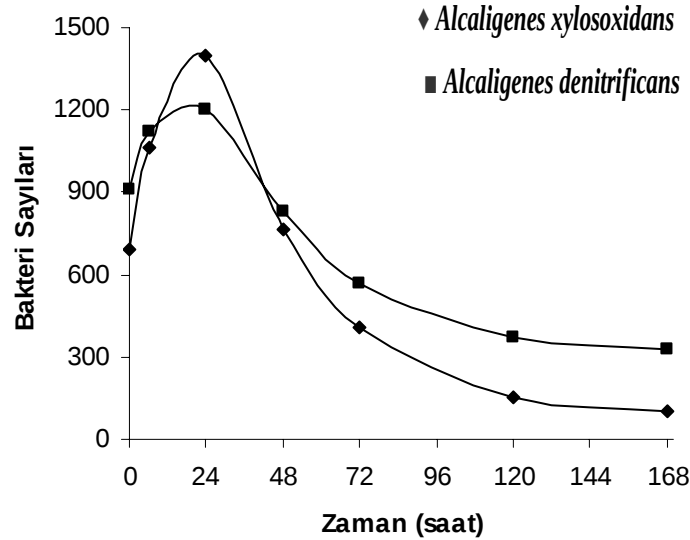
Şekil 4.9. 2,4-D'nin MSM'da Parçalanması

4.10. Sıvı Kültürde 2,4-D'li ve 2,4-D'siz Ortamlarda Bakterilerin Gelişimi

Karbon kaynağı olarak 2,4-D ilave edilmiş minimal tuz besiyerinde *Alcaligenes xylosoxidans*'ın ve *Alcaligenes denitrificans*'ın zamana bağlı olarak gelişimleri Şekil 4.10'da verilmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* bakterisi belirlediğimiz zaman aralığında maksimum değer olan 4×10^8 kob/mL'e 24. saatte ulaştığı gözlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans* bakterisi de belirlediğimiz zaman aralığında maksimum değer olan 4×10^8 kob/mL'e 24. saatte ulaştığı belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak bakteri sayılarında bir azalma gözlenmiştir. 168. saatte *Alcaligenes xylosoxidans*'ın bakteri sayısı 1×10^8 kob/mL'e düşerken, *Alcaligenes denitrificans*'ın bakteri sayısının 7×10^7 kob/mL'e düştüğü belirlenmiştir. Bu düşme kültür ortamındaki enerji kaynağının (2,4-D) azalmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.10. 2,4-D'li MSM'da Bakteri Sayıları



Şekil 4.11. 2,4-D'siz MSM'da Bakteri Sayıları

2,4-D'siz minimal tuz besiyerindeki bakterilerin gelişimi Şekil 4.11'de verilmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans* bakterileri belirlenen zaman aralığında maksimum değere 24. saatte ulaştıkları gözlenmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın bakteri sayısı 24. saatte 1×10^8 kob/mL'e ulaşırken, *Alcaligenes denitrificans*'ın bakteri sayısının 24. saatte 1×10^8 kob/mL'e ulaştığı

belirlenmiştir. Her iki tür için de bakteri sayıları zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın bakteri sayısı 168. saatte 1×10^7 kob/mL'e düşerken, *Alcaligenes denitrificans*'ın bakteri sayısının 3×10^7 kob/mL'e düştüğü gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Giderek artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayabilmek ve tarımsal ürün artışını güvenceye alabilmek amacıyla ürünlerin; hastalık, zararlı ve yabancı otlardan korunmasında çeşitli metotlar uygulanmaktadır. Bunlar, dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi, transgenik ürünler, gübreleme, sulama, fiziksel savaş, karantina önlemleri, biyolojik ve kimyasal mücadeledir. Kimyasal mücadele, pestisitlerin kullanılması ile büyük önem kazanmıştır (Dığrak ve Özçelik, 1995).

Doğaya yabancı karakterdeki bu kimyasal bileşikler, gerek üretimleri gerekse uygulamaları aşamalarında toprak ve suyu kirletmektedirler (Özgörücü ve ark., 1992).

Pestisitlerin çevrede kirletici olarak davranmalarına katkıda bulunan birçok özelliği vardır. Toksisite, stabilite, çözünürlük ve adsorbe edilebilirlik bunlardan birkaçıdır (Guthrie ve Perry, 1980).

Pestisitlerin bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvanlar tarafından alınması (absorpsiyon ya da biyoabsorbsiyon), bu kimyasalları topraktan uzaklaştırır. Absorbe edilen pestisitler ya organizmaların dokularında depolanır ya da organizmaların enzimleri ile dönüştürülürler. Pestisitler toprakta belli bir süre kalırlar. Kalış zamanı pestisit tipine, toprak nemine, organik madde, ısı ve pH'ya dayanarak günlerden yıllara değişiklik gösterir (Doxtader ve Croissant, 1992). Pestisitlerin bir kısmı buharlaşma yolu ile atmosfere karışarak, kalıcı zehirli maddelerin birikimine sebep olmaktadır. Bir kısmı ise fotokimyasal yol ile parçalanmakta ya da zehirli olmayan maddelere dönüşmektedir (Sayın, 1988). Pek çok pestisit topraktan kaybolmasının temel nedeni, mikrobiyal parçalanmadır. Genel toprak bakterileri ve mantarları, bu bileşiklerin çoğunluğunu parçalayabilirler. Pestisitlerin çoğunluğu, karbondioksit ve su gibi basit, toksik olmayan ürünlere dönüşürlerken, bazı pestisitler, mikrobiyal parçalanmaya dirençlidirler, çünkü ya toksiktirler ya da onların büyümelerini desteklemezler. Belirli pestisitler de organik parçaların yüzeylerine ve kil minerallerine yapışırlar. Adsorbsiyon denen bu süreç, mikroorganizmaların pestisitleri kullanmalarını sınırlar ve parçalanmanın oranını yavaşlatır (Doxtader ve Croissant, 1992).

Pestisitlerin toprak mineralleri tarafından tutulmaması bu pestisitlerin tutulmayacağı anlamına gelmez. Kil mineralleri tarafından pestisit fazla miktarda tutulmasa bile, killi topraklardaki gözeneklerin küçük ve birbirinden bağımsız olması bu tür topraklarda pestisitlerin su ile hareketini kısıtlamamakta ve mikrobiyal ve kimyasal parçalanmaya imkan tanımaktadır (Zaki ve ark., 1982).

Sannino ve ark., (1997) yaptıkları çalışmada 2,4-D'yi Alüminyum montmorillonit üzerine yapıştırmışlardır. Aynı şekilde McGhee ve ark., (1999), çalışmalarında 2,4-D'yi doygun çözeltiden Alüminyum-montmorillonit (AM) üzerine yapıştırmışlar ve *Pseudomonas sp.* ile bakteriyel parçalanmayı gerçekleştirmişlerdir. Clausen ve ark. (2001), ise yaptıkları çalışmada kullandıkları atrazin, izoproturon, mecoprop, 2,4-D ve bentazon pestisitlerinin sucul solusyonlarda kalsit, kuartz, kaolinit ve α -alüminanın saf mineral yüzeylerine zayıf adsorbe olduğunu ve adsorbsiyonun öneminin pestisitlerin tipine, mineralin tipine ve mineralin özgül yüzeyine dayandığını belirtmişlerdir.

2,4-D, toprağa uygulandığında bitkiler tarafından alınan miktarlarının fazlası doğada kalmakta ve çeşitli şekillerde kontaminasyona neden olmaktadır. Doğadaki fazla 2,4-D, toprağın içeriğine göre, toprak minerallerine ve organik maddelere yapışmaktadır. Yapışmayan kısımlarda yüzey suları ve dip suları ile farklı bölgelere taşınmaktadır. Toprak minerallerine yapışan 2,4-D, kolay kolay desorbe olamamakta ve doğada uzun süre kalmaktadır. 2,4-D'nin doğadan yok olmasında en önemli rolü oynayan mikroorganizmalar ise toprak minerallerine sıkı sıkı yapışmış olan 2,4-D'yi parçalamakta zorlanmaktadırlar.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda da 2,4-D Na-MM, Ca-MM ve MM üzerine %85.27 oranında adsorbe olmuştur. Adsorbsiyonun sonucu olarak da 2,4-D'nin parçalanma miktarı azalmıştır. *Alcaligenes xylosoxidans* bakterisi 2,4-D'yi minimal tuz besiyerinde %28.4 oranında parçalamışken, Na-MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi %8.3, Ca-MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi %6.7 ve MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi ise %10.9 oranında parçaladığı belirlenmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans* bakterisi adsorbe olmuş 2,4-D'yi sırasıyla MM>Na-MM>Ca-MM'de parçaladığı belirlenmiştir.

Alcaligenes denitrificans bakterisi ise 2,4-D'yi minimal tuz besiyerine %25.9 oranında parçalamışken, Na-MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi %7.2, Ca-MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi %5.9 ve MM üzerine adsorbe olmuş 2,4-D'yi ise %3.6 oranında parçaladığı belirlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans* bakterisi adsorbe olmuş 2,4-D'yi sırasıyla Na-MM>Ca-MM>MM'de parçaladığı belirlenmiştir. Adsorbsiyon parçalanmayı azaltmıştır. Guo ve ark., (2000) 2,4-D'nin parçalanma çalışmalarında adsorbent olarak aktif karbonu kullanmışlardır ve 2,4-D'nin adsorbsiyonunun, parçalanmasını azalttığını belirtmişlerdir.

Witthuhn ve ark., (2005), toksik bir madde olan 2,4-Diklorofenol (DCP)'ü organik kil üzerine adsorbe ettirmiş ve *Ralstonia eutropha* bakterisi ile parçalanmasını çalışmışlardır. Adsorbe olmuş olan DCP bakteriler için direkt kullanılmış olsaydı, hücreler için negatif bir etkisi olmuş olacakken böyle bir etki gözlenmemiştir. Adsorbsiyon, DCP'ün sıvıdaki konsantrasyonunu düşürmüş, böylece DCP toksik olmayan bir seviyede bulunduğu için bakteriler tarafından mikrobiyal parçalanmaya uğramıştır. Benzer sonuçlar, fenantren'nin organik killere yapıştığı zaman parçalanabilir olmadığını bulan Theng ve ark. (2001), tarafından da gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, 2,4-D belirlediğimiz zaman aralığında abiyotik parçalanmaya uğramamıştır. 2,4-D miktarlarında sıvı-sıvı ekstraksiyonlar sonucu zamanla bir azalma gözlenmemiştir. 2001 yılında Avrupa Komisyonu, Sağlık ve Tüketici Koruma Direktörlüğünün aktif madde 2,4-D için hazırladığı bir raporda, 2,4-D'nin abiyotik olarak parçalanmadığı belirtilmiştir. Abiyotik olarak parçalanmayan 2,4-D çok değişik ve çeşitli koşullarda, çeşitli bakteriler tarafından parçalanmaktadır. Bunlar *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acenitobacter*, *Arthrobacter* and *Corynebacterium* olarak pek çok 2,4-D parçalama çalışmalarında kullanılmışlardır (Don ve Pemberton, 1981; Don ve Pemberton, 1985; Streber ve ark., 1987; Suwa ve ark., 1996).

Çalışmamızda topraktan izole edilen *Alcaligenes* türlerinin 2,4-D'yi parçalama durumları araştırılmıştır. *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 türü, genetik olarak en iyi şekilde karakterize edilmiş bakteri türleri içinde, geniş kullanım alanlı herbisit 2,4-D'yi parçalayabildiği bilinmektedir. 2,4-D'nin parçalanmasını sağlayan enzimleri

kodlayan genler, plazmid pJP4 üzerine lokalize olmuşlardır (Don ve Pemberton, 1985; Streber ve ark., 1987).

Topraktan izole ettiğimiz *Alcaligenes* türleri; *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans*'dır. 2,4-D'nin parçalanması çalışmalarında *Alcaligenes xylosoxidans* Na-MM, Ca-MM ve MM'den desorbe olan 2,4-D'yi sıvıdaki 2,4-D miktarları göz önüne alınarak *Alcaligenes denitrificans*'dan daha iyi parçalamıştır.

Alcaligenes xylosoxidans'ın Na-MM, Ca-MM ve MM'den desorbe olan 2,4-D'li ortamdaki bakteri sayısı ilk 6 saatte maksimuma ulaşmıştır. Na-MM kompleksinde bakteri sayısı 6. saatte 8×10^8 kob/mL iken, Ca-MM'de 2×10^8 kob/mL ve MM'de ise 6×10^8 kob/mL olarak bulunmuştur. 2,4-D'siz ortamda ise *Alcaligenes xylosoxidans*'ın Na-MM, Ca-MM ve MM'li örneklerdeki bakteri sayısının 2,4-D'li ortama kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 24. saatte maksimum değeri olan 1×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenirken, Ca-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 48. saatte maksimum değeri olan 8×10^7 kob/mL'e ve MM'li örneklerde ise 48. saatte maksimum değeri olan 1×10^8 kob/mL e ulaştığı belirlenmiştir.

Alcaligenes denitrificans'ın Na-MM, Ca-MM ve MM'den desorbe olan 2,4-D'li ortamdaki bakteri sayıları 48 ile 72. saatler arasında maksimuma ulaşmıştır. Na-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 48. saatte 6×10^8 kob/mL'e ulaşırlarken Ca-MM'li örneklerdeki bakteri sayısı 72. saatte 5×10^8 kob/mL'e ulaştığı gözlenmiştir. MM'li örneklerdeki bakteri sayısı ise 48. saatte 5×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenmiştir. *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'siz ortamdaki bakteri sayıları 6. saatte maksimuma ulaştığı gözlenmiştir. Bakteri sayıları Na-MM'li örnekler için 2×10^8 kob/mL olarak belirlenirken, Ca-MM'li örnekler için 1×10^8 kob/mL ve MM'li örnekler için ise 1×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir. 2,4-D'li ortamdaki bakteri sayılarının 2,4-D'siz ortama kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum bakterilerin 2,4-D'yi enerji kaynağı olarak kullandığını göstermektedir.

Minimal Tuz Besiyerindeki 300 mg/L 2,4-D'yi *Alcaligenes xylosoxidans* belirlediğimiz 168 saatlik zaman diliminde %28.4 oranında parçalarken, *Alcaligenes denitrificans* %25.9 oranında parçalamıştır. Khalil (2003), yaptığı çalışmasında 2,4-D parçalayıcısı olan *Pseudomonas putida*'nın, 500 mg/L 2,4-D'yi 45 saat içinde

metabolize ve mineralize ettiğini göstermiştir. Zenginleştirilmiş kültürlerde düşük seviyelerde (200 mg/L) 2,4-D kullandığında, 2,4-D'nin tamamen 24 saat içinde kaybolduğunu belirtmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (1000 mg/L) 2,4-D'nin toksik olduğu da gözlenmiştir. 2,4-D'nin konsantrasyonu değişmemiş (1000 mg/L) ve 2,4-D parçalayan koloniler bulunamamıştır. Kopytko ve ark., (2002) ise yaptıkları çalışmalarda *Pseudomonas putida*'nın 109 mg/L 2,4-D'yi biyolojik olarak parçalamasının ilk günden üçüncü güne kademeli bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca ilave besin kullanılmadığı zaman bakterinin kimyasal parçalaması, ilave besinler kullanıldığı zaman parçalamasıyla benzer sonuçlar vermiştir. Herbisitin miktarı 54.5 mg/L'e düşürüldüğü zaman parçalanma, özellikle %25 ilave besinlerde bir miktar yükselmiştir. Kontrol deneylerinde ise, ilk 24 saat boyunca parçalanma %2.74 olarak bulunmuştur ki, bu da bakterinin bu duruma çok yavaş adapte olduğunu göstermektedir. Herbisit seviyesi düştükçe, bakteri gelişimi için bazı ek besinlere ihtiyaç duymaktadır, aksi takdirde gelişim çok yavaş olmaktadır.

Schwartz 1966'da yaptığı çalışmasında 2,4-D'nin mineral tuz besiyerinde mikrobiyal parçalanmaya karşı oldukça dirençli olduğunu belirtmiştir. Molekülün %40'dan daha azının, organik karbon kaynaklarının ilavesinde bile, solusyondan kaybolması için geçen zamanı altı ay olarak bildirmiştir.

Minimal tuz besiyerinde 2,4-D'nin . *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans* tarafından parçalanmasında bakteri sayıları her iki bakteri için de 24. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın bakteri sayısı 24. saatte 4×10^8 kob/mL'e ulaşırken, *Alcaligenes denitrificans*'ın bakteri sayısı 24. saatte 4×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenmiştir. Ortamdaki pestisit karbon kaynağı olarak kullanılması ve miktarının azalmasıyla zamana bağlı olarak bakteri sayıları da bir azalış göstermişlerdir. 2,4-D'siz minimal tuz besiyerinde ise *Alcaligenes xylosoxidans* ve *Alcaligenes denitrificans* 24. saatte maksimum bakteri sayısına ulaştığı gözlenmiştir. *Alcaligenes xylosoxidans*'ın 24. saatteki bakteri sayısı 1×10^8 kob/mL'e ulaşırken, *Alcaligenes denitrificans*'ın 24. saatteki bakteri sayısının 1×10^8 kob/mL'e ulaştığı belirlenmiştir. 2,4-D'li minimal tuz besiyerindeki bakteri sayıları her iki bakteri için de, 2,4-D'siz MSM'a oranla çok daha fazla olmuştur.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, toprak izolatları *Alcaligenes xylosoxidans*'ın ve *Alcaligenes denitrificans*'ın 2,4-D'yi minimal tuz besiyerinde %30'dan daha azını parçaladığı, 2,4-D'nin adsorbsiyonunun da parçalanmayı azalttığı ve bakteri gelişiminin 2,4-D'li ortamda 2,4-D'siz ortama kıyasla daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Pestisitler, uygulanmasının kolay olması ve sonucun çabuk alınabilmesi nedeniyle zararlılarla mücadelede sıkça kullanılmaktadır. Uygulama sonrasında fazlası topraktaki kile ve organik maddelere adsorbe olmaktadır. Bu durum kesinlikle pestisit toprak mikroorganizmaları tarafından parçalanmasını zorlaştırmaktadır. Bunun sonucunda toprakta bulunan çeşitli adsorbentlere yapışan pestisitler ortamda uzun süre kalmakta, birikmekte ve bu çevrelerde yaşayan başka canlıları olumsuz etkilemektedir. Bunun için kimyasal mücadelede pestisitlerin çevresel etkilerini azaltmak amacıyla dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. Pestisit kullanıcılarının eğitimi, planlama ve hazırlık olarak kullanılacak pestisitlerin kullanımından önce o yöntemin ve yöntemle ilişkili uyarıların gözden geçirilmesi, ilaçlamalar sonrasında ortaya çıkan atıkların, ilaçlama tanklarının yıkanması, boş kutuların yok edilmesi konularında mutlaka özel dikkat gerekmektedir, ayrıca pestisitlerin depolanması, uygulanması ve atıklar konusunda düzgün kayıt tutulmasında yarar vardır. Yine pestisit kullanımı için alternatif metotların geliştirilmesinde yarar vardır. Ancak çabuk cevap alınması ve diğer alternatif metotların uygun olmaması gibi nedenlerden dolayı pestisit kullanımı günümüzde de hızla devam etmektedir. Biyolojik olarak pestisiti parçalayabilen mikroorganizmaların geliştirilmesi, özellikle pestisit kullanımına bağlı tarımın yapıldığı bölgelerde kullanılmasıyla doğada kalıcılığı olan bu toksik bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasında kullanılabilecek bir yöntem olabilir.

KAYNAKLAR

- AISLABIE, J., and LLOYD-JONES, G., 1995. A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research*, 33(6): 925-942.
- AKSU, Z., and KABASAKAL, E., 2004. Batch adsorption of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) from aqueous solution by granular activated carbon. *Separation and Purification Technology* (35): 223–240
- ALEXANDER, M. and ALEEM, M.I.H., 1961. Effect of chemical structure on microbial degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 9 (1): 44-47.
- ALY, O.M., and FAUST, S.D., 1964. Studies on the fate of 2,4-D and ester derivatives in natural surface waters. *Agric. Food Chem.* 12(6): 541-546.
- AMARENDRA, K.R., RAMAKRISHNAN, B., RATH, A.K., KUMARASWAMY, S., BHARATI, K., SINGLA, P., SETHUNATHAN, N., 1998. Effect Of Pesticides On Microbial Biomass of Flooded Soil. *Chemosphere*, Vol. 37(4): 661-671.
- ANONYMOUS, 1978. *Micro biyologichen Handbuch*, E.Merk, Darmstadt.
- AUDUS, L.J., 1960. Microbiological breakdown of herbicides in soils. In: Woodford, E.K. & Sagar, G.R., ed. *Herbicides and soil*, Oxford Blackwell Scientific Publications, sf. 1-19.
- AUDUS, L.J., 1964. Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J., ed. *The physiology and biochemistry of herbicides*, London, New York, Academic Press, sf. 163-206.
- AVRUPA KOMİSYONU-SAĞLIK VE TÜKETİCİ KORUMA DİREKTÖRLÜĞÜ, 2001. Aktif Madde 2,4-D için Yeniden İnceleme Raporu. 63sf.
- AYDIN, M. E., ÖZCAN, S., SARI, S., 2004. Ağır Metallerin Doğal Killerle Uzaklaştırılması. I. Ulusal Çevre Kongresi Sivas, 443-449.
- BEKBÖLET, M., YENİGÜN, O. and YÜCEL, İ., 1999. Sorption Studies of 2,4-D on Selected Soils. *Water, Air and Soil Pollution*, 111: 75-88.
- BİLGEHAN, H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitapevi, 777sf.

- BOIVIN, A., AMELLAL, S., SCHIAVON, M., GENUCHTEN, M., 2005. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) Sorption and Degradation Dynamics in three Agriculturel Soils. *Environmental Pollution*, 138(1): 92-99.
- BOLLAG, J.M., LIU, S.-Y., 1990. Pesticides in the Soil Environment Processes, Impacts and Modelling (Cheng, H.H., ed.), Soil Science Society America, Madison, Wisconsin, 169sf.
- BORA, T., DELEN, N., 1981. Türkiye'de Bitkisel Üretimde Tarımsal İlaç Sorunu ve Öneriler. II. Türkiye İktisat Kongresi Tarım Komisyonu Tebliğleri, İzmir.
- BUTLER, G.L., DEASON, T.R., ve O'KELLEY, J.C., 1975. Loss of five pesticides from cultures of twenty-one planktonic algae. *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, 13: 149-152.
- CCREM, Canadian Council of Resource and Environment Minister, 1987. Canadian Water Quality Guidelines. Inland Waters Directorate, Environment Canada.
- CLAUSEN, L., FABRICIUS, I., MADSEN, L., 2001. Adsorption of Pesticides onto Quartz, Calcite, Kaolinite, and α -Alumina. *J. Environ. Qual.* 30: 846-857
- CONWAY, G.R. and PRETTY, J.N., 1991. Unwelcome Harvest: Agriculture and Pollution. Earthscan, London.
- CROSBY, D. G. and TUTASS, H.O., 1966. Photodecomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Agr. Food Chem.* 14(6): 596-599.
- CSI, 2001. Compliance Services International. Herbicide Risk Assessment for the Aquatic Plant Management Final Supplemental Environmental Impact Statement, Appendix C, Volume 3: 2,4-D, Sect.435sf.
- ÇETİN, E.T., 1968. Pratik Mikrobiyoloji. İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Menteş Matbaa, İstanbul.
- DAĞ, S.S., AYKAÇ, V.T., GÜNDÜZ, A., KANTARCI, M., ŞİŞMAN, N., 2000. Türkiye'de Tarım İlaçları Endüstrisi ve Geleceği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Cilt 2, sf 933.
- DE AMARANTE, O.P., BRITO, N.M., DAS SANTOS, T.C.R., NUNES, G.S., RIBEIRO, M.L., 2003. Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and its Major Transformation Product in Soil Samples by Liquid Chromatographic Analysis. *Talanta*, 60: 115-121.

- DEES, S.B., MOSS, C.W. 1978. Identification of *Achromobacter* species by cellular fatty acids and by production of keto acids. J. Clin. Microbiol., 8: 61-66.
- DEES, S., THANABALASUNDRUM, S. MOSS, C.W., HOLLIS, D.G., WEAVER, R.E. 1980. Cellular fatty acid composition of group IVE, a nonsaccharolytic organism from clinical sources. J. Clin. Microbiol., 11: 664-668.
- DELAPLANE, K.S., 1996. Pesticide Usage in The United States: Benefits, Risks and Trends. Cooperative Extension Service, The University of Georgia, Athens, Georgia.
- DELEN, N., DURMUŞOĞLU, E., GÜNCAN, A., GÜNGÖR, N., TURGUT, C., BURÇAK, A., 2005. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre, Ankara.
- DEML, R., DETTNER, K., 2001. Biodegradation and Transfer of Ingested 2,4-D Herbicide by a Polyphagous saturniid caterpillar. Chemosphere, 45: 783-789.
- DIĞRAK, M., ÖZÇELİK, S., 1995. Cholorpyrifos-methyl’in bakteriler ve zenginleştirilmiş toprak tarafından parçalanması. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 7(1): 57-72.
- DIĞRAK, M., KIRBAĞ, S., ÖZÇELİK, S., 1997. Bazı Pestisitlerin Toprak Mikrobiotası Üzerine Etkisi. Journal of Qafqaz University, 1(1): 10-25.
- DIĞRAK, M., ÖZÇELİK, S., 1998. Trifluralin’nin Mikrobiyal Parçalanması. Celal Bayar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Dergisi, 1: 136-141.
- DON, R.H. and PEMBERTON, J.M., 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 145(2): 681-686.
- DON, R.H. and PEMBERTON, J.M., 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid Pjp4. J. Bacteriol., 161: 466-468.
- DOXTADER, K.G., ve CROISSANT, R.L., 1992. Soil; Fate of Pesticides in Soil. Crop Series, Colorado State University Cooperative Extension, no. 0.515.
- EPA, 2002. Environmental Protection Agency, List of Drinking Water Contaminants and MCLs.

- FAHR, K., WETZSTEIN, H., GREY, R., SCHLOSSER, D., 1999. Degradation of 2,4-Dichlorophenol and Pentachlorophenol by Two Brown Rot Fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 127-132.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 1971. Pesticide residues in food; report of the 1970 Joint Meeting of the FAO Working Party of Experts on Pesticide Residues and the WHO Expert Group on Pesticide Residues. FAO Agricultural Studies No. 87; World Health Organization Technical Report Series No. 474.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 1976. Evaluations of some pesticide residues in food. WHO Pesticide Residues Series No. 5, World Health Organization, Geneva.
- FOGEL, S., LANCIONE, R.L., SEWAL, A.E., 1982. Enhanced biodegradation of methoxychlor in soil under sequential environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1): 113-120.
- FRANK, R., CAMPBELL, R.A. and SIRON, G.J., 1985. Forestry workers involved in aerial application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): exposure and urinary excretion. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14: 427 (1985).
- FULTHORPE, R.R. and WYNDHAM, R.C., 1992. Involvement of a chlorobenzoate-catabolic transposon, Tn5271, in community adaptation to chlorobiphenyl, chloroaniline, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1): 314-325.
- GRAY, D.A., SUGATT, R.H., FOOTE, K., WILBUR, S.B., REMINGTON, M.B., ROSENBERG, A. and ORZEL, D., 1983. Update and revision of multimedia criteria document for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. SRC-Tr83-721, Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY.
- GUENZI, W.D., BEARD, W.E., 1968. Anaerobic conversion of DDT to DDD and aerobic stability of DDT in soil. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 32: 522.
- GUTHIRE, F.E., PERRY, J.J., 1980. Introduction to Environmental Toxicology, Interdepartmental Program in Toxicology, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

- HAGGBLOM, M.M. and VALO, R.J., 1995. Microbial Transformation and Degradation of Toxic Chemicals (YOUNG, L.Y. and CERNIGLIA, C.E., eds.), Wiley & Sons, New York, p.389.
- HALTER, M., 1980. 2,4-D in the aquatic environment. Section II in Literature Reviews of Four Selected Herbicides: 2,4-D, dichlobenil, diquat & endothall. Shearer R., and M. Halter, eds.
- HARRISON, S.A., 1990. The Fate of Pesticides in the Enviroment. Agrichemical Fact Sheet # 8, Penn State Cooperative Extentions, 1-4.
- HELLING, C. S., KEARNEY, P.C. and ALEXANDER, M., 1971. Behavior of pesticides in soil. Adv. Agron. 23: 147-240.
- HEMMETT, R.B. and FAUST, S. D., 1969. Biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by aquatic microoganisms. Residue Rev. 29: 191-207.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. Williams & Wilkins, 428 East Preston Street Baltimore, Maryland 21202, USA.
- JOHNSON, W. G., LAVY, T.L. and GBUR, E.E., 1995. Sorption, mobility, and degradation of triclopyr and 2,4-D and four soils. Weed Sci. 43: 678-684.
- KAYA, B., YANIKOĞLU, A., 1999. 2,4-D ve 4-CPA'nın *Drosophila melanogaster*'in F₁, F₂ ve F₃ Kuşaklarında Gelişim Süresi ve Ergin Birey Sayısına Etkileri. Tr. J. of Zoology, 23: 297-301.
- KEETON, W. T., ve GOULD, J. L., 1986. Biological science. Fourth edition. W. W. Norton & Company, Inc., New York, USA.
- KHALIL, A.B., 2003. Isolation and Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degrading Organisms from Soil in Jordan Valley. Biotechnology, 2 (2): 73-85.
- KHANNA, S. and FANG, S.C., 1966. Metabolism of C-14 labeled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats. J. Agric. Food Chem., 14: 500.
- KOPYTKO, M., CHALELA, G. and ZAUSCHER, F., 2002. Biodegradation of two commercial herbicides (Gramoxone and Matancha) by the bacteria *Pseudomonas putida*. Elektronik Journal of Biotechnology, 5(2): 182-195.

- LE VAN TO, 1984. Degradation of defoliants 2,4-D and 2,4,5-T by selected soil microorganisms. *Acta agrar. Silvestria, Ser. agrar.*, 23: 225-234.
- LEUNG, K.T., ERRAMPALLI, D., CASSIDY, M., LEE, H., TREVORS, J.T., OKAMURA, H., BACH, H., HALL, B., 1997. A Case Study of Bioremediation and Toxicity of Chlorophenols in Soil. Elsas, J.D., Trevos, J.T., Wellington, E.M.H. eds. *Modern Soil Microbiology*, Marker Dekker, Inc. New York, 577-606.
- LEWIS, D.L., HODSON, R.E., and FREEMAN, L.F., 1984. Effects of microbial community interactions on transformation rates of xenobiotic chemicals. *Appl. environ. Microbiol.*, 48: 561-565.
- LOOS, M.A., 1969. Phenoxyalkanoic acids. In: Kearney, P.C. & Kaufman, D.D., ed. *Degradation of herbicides*, New York, Marcel Dekker, Inc., pp. 1-49.
- LU, P.-Y., METCALF, R.L. and COLE, L.K., 1978. Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology (RAO, K.R., ed.), Plenum Pres, New York, 53sf.
- MCGHEE, I., SANNINO, F., GIANFREDA, L., BURNS, R.G., 1999. Bioavailability Of 2,4-D Sorbed To A Chlorite-Like Complex. *Chemosphere*, 39(2): 285-291.
- MERCK, 1996. *Microbiology of Manual Merck*. sf. 405
- MOODY, R.P., FRANKLIN, C.A., RITTER, L. and MAIBACH, H.I., 1990. Dermal absorption of the phenoxy herbicides 2,4-D, 2,4-D amine, 2,4-D isooctyl, and 2,4,5-T in rabbits, rats, rhesus monkeys, and humans: a cross-species comparision. *J. Toxicol. Environ. Health*, 29: 237.
- MUIR, D.C.G., 1991. Dissipation and transformations in water and sediment. Chapter 1 in *Environmental Chemistry of Herbicides, Volume II*. R. Grover and A. J. Cessna eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. 302 sf.
- MURIALDO, S.E., FENOGLIO, R., HAURE, P.M., and GONZÁLEZ, J.F., 2003. Degradation of phenol and chlorophenols by mixed and pure cultures. *Water SA* 29 (4): 457-464.

- NESBITT, H.J. and WATSON, J.R., 1980. Degradation of the herbicide 2,4-D in river water. II. The role of suspended sediment, nutrients and water temperature. *Water Res.*, 14: 1689-1694.
- NRCC, National Research Council of Canada, 1978. Phenoxy herbicides - their effects on environmental quality, with accompanying scientific criteria for 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Ottawa.
- OH, K-H, and TUOVINEN, O.H., 1991. Bacterial degradation of phenoxy herbicide mixtures 2,4-D and MCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 222-229.
- OU, L.-T., 1984. 2,4-D degradation and 2,4-D degrading microorganisms in soils. *Soil Sci.*, 137: 100.
- OYAIZU-MASUCHI Y., KOMAGATA, K. 1988. Isolation of free-living nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *J. Gen. App. Microbiol.*, 34: 127-164.
- O'LOUGHLIN, E.J., TRAINA, S.J., SIMS, G.K., 2000. Effects Of Sorption On The Biodegradation Of 2-Methylpyridine In Aqueous Suspensions Of Reference Clay Minerals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (9): 2168–2174
- ÖZGÖRÜCÜ, B., EKMEKÇİ, S., GÖNÜZ, A., ve TORT, A., 1992. Tütünde Antakol uygulamasının toprak mikrofungusları üzerine etkileri. 11. Ulusal Biyoloji Kongresi, Elazığ, 235-346.
- PALLERONI, M., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (N.R. Krieg and J.G. Holt, eds) 964 Williams and Wilkins. Baltimore.
- QUE HEE, S. S., and SUTHERLAND, R.G., 1981. *The Phenoxyalkanoic Herbicides, Volume I: Chemistry, Analysis, and Environmental Pollution*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, sf 319.
- ROSENBERG, A. and ALEXANDER, M., 1980. 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid (2,4,5-T) decomposition in tropical soil and its co-metabolism by bacteria *in vitro*. *J. agric. food Chem.*, 28: 705-709.
- SANDMANN, E.R.I.C., LOOS, M.A. and VAN DYK., L.P., 1988. The microbial degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Reviews Environ. Contam. Toxicol.* 101: 1-53.

- SANNINO, F., VIOLANTE, A., ve GIANFREDA, L., 1997. Adsorption-Desorption of 2,4-D by Hydroxy Aluminium Montmorillonite Complexes. *Pestic. Sci.*, 51: 429-435.
- SATTAR, M.A. and PAASIVIRTA, J., 1980. Fate of chlorophenoxyacetic acids in acid soil. *Chemosphere*, 9: 745-752.
- SAUERHOFF, M.W., BRAUN, W.H., BLAU, G.E. and GEHRING, P.J., 1977. The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology*, 8: 3.
- SAYIN, M., 1988. Pestisitler ve Toprak. *Çevre ve İnsan*, 3(3): 17-24.
- SCHWARTZ, H.G., 1966. Studies on Adsorption and Microbial Degradation of The Pesticides Isopropyl N-(3-chlorophenyl) Carbamate and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Aqueous Solutions. California Institute of Technology Pasadena, California. 1-248.
- SHAW, L.J., and BURNS, R.G., 1998. Biodegradation of 2,4-D in a noncontaminated grassland soil profile. *J. Environ. Qual.* 27: 1464-1471.
- SMITH, A.E., 1988. Transformations in soil. Chapter 6 in *Environmental Chemistry of Herbicides*, Volume I. R. Groves ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. 207 sayfa.
- SMITH, A.E., and MORTENSEN, K., 1991. Degradation of Waste 2,4-D Residues Using a Soil Bacterium in a Sprayer Tank System. *Canadian Journal of Soil Science*, 71: 243-246.
- SMITH, A.E., AUBIN, A.J., 1994. Loss of enhanced biodegradation of 2,4-D and MCPA in a field soil following cessation of repeated herbicide applications. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 7-11.
- STREBER, W.R., TIMIS, K.N. and ZENK, M.H., 1987. Analysis, cloning and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J.Bacteriol.*, 169: 2950-2955.
- SUWA, Y., WRIGHT, A.D., FUKUMORI, F., NUMMY, K.A., HAUSINGER, R.P., HOLIBEN, W.E. ve FORNEY, L.J., 1996. Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/"-ketoglutarate

- dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2464-2469.
- THENG, B.K.G., AISLABIE, J., FRASER, R., 2001. Bioavailability of phenanthrene intercalated into an alkylammonium-montmorillonite clay. Soil Biol. Biochem. 33: 845-848.
- TOPP, E., VALLEYS, T., SOULAS, G., 1997. Pesticides: Microbial Degradation and Effects on Microorganisms. Elsas, J.D., Trevos, J.T., Wellington, E.M.H. eds. Modern Soil Microbiology, Marker Dekker, Inc. New York, s,547-576.
- TOROS, S., MADEN, S., 1985. Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, s, 54-55.
- TORSTENSSON, N.T.L., 1975. Degradation of 2,4-D and MCPA in soils of low pH. Environ. Qual. Saf. (Suppl.), 3: 262-265.
- TU, M., HURD, C., RANDOLL, J.M., 2001. Weed Control Methods: Tools and Techniques for Use in Natural Areas, Chapter 7(A): 1-10.
- TUNÇELİ, A., BAĞ, H., TÜRKER, A.R., 2001. Spectrophotometric Determination of Some Pesticides in Water Samples after Preconcentration with *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Sepiolite. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 371(8): 1134–1138.
- UNZ, R.F., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (N.R. Krieg and J.G. Holt, eds) 964 Williams and Wilkins. Baltimore.
- WHO, World Health Organization, 1984. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Environmental Health Criteria 29. International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- WHO, World Health Organization, 1989. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-Environmental Aspects. Environmental Health Criteria 84. International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- WILLEMS, A., BUSSE, J., GOOR, M., POT, B., FALSÉN, E., JANZTEN, E., HOSTE, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., AULING, G., DE LEY, J., 1989. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*),

- Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 39, pp. 319-333
- WILSON, R.D., GERONIMO, J. and ARMBRUSTER, J.A., 1997. 2,4-D dissipation in field soils after applications of 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D 2-ethylhexyl ester. Environ. Toxicol. Chem. 16: 1239-1246.
- WITTHUHN, B., KLAUTH, P., KLUMPP, E., NARRES, H., MARTINIUS, H., 2005. Applied Clay Science, 28 (1-4): 55-66.
- YILDIZ, M., GÜRKAN, O., TURGUT, C., KAYA, Ü., ÜNAL, G., 2005. Tarımsal Savaşımında Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları. VI. Teknik Tarım Kongresi, Ankara.
- YOUNG, E., 2003. 2,4-D Graphical Pathway Map. http://umbbd.ahc.umn.edu/2,4-d/2,4-d_image_map2.html
- ZAKI, M.H., MORAN, D., ve HARRIS, D., 1982. Pesticides in Ground Water The Aldicarb Story in Suufolk Country. J. Public Health, (72): 1391-1395.
- ZÜMEROĞLU, S., SEZGİN, E., ESENTEPE, M., 1979. Ülkemizde Tarımsal İlaç Kullanımı ve Bundan Doğan Sorunlar. 1. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, Adana.

ÖZGEÇMİŞ

Adana’da 1979 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana’da tamamladıktan sonra 1997 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne kaydoldum. 2001 yılında aynı bölümden mezun oldum. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım.