

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



TOPRAK ORTAMINDA HERBİSİT BİYOREMEDİASYON VERİMİNİN
***Gammarus pulex*'in BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ**
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Yusuf SÖYLEMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan Önder ERGÜVEN

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TOPRAK ORTAMINDA HERBİSİT BİYOREMEDİASYON VERİMİNİN
Gammarus pulex'in BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Yusuf SÖYLEMEZ
(190020019)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. Nuran ÇIKCIKOĞLU YILDIRIM
II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan Önder ERGÜVEN

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK ORTAMINDA HERBİSİT BİYOREMEDİASYON VERİMİNİN
Gammarus pulex'in BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ
KULLANILARAK AŞTIRILMASI**

**Yusuf SÖYLEMEZ
YÜKSEK LİSAN TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 17/03/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Nuran
CIKCIKOĞLU YILDIRIM
(Munzur Üniversitesi)

İmza

Doç. Dr. Mehtap TANYOL
(Munzur Üniversitesi)

İmza

Doç. Dr. Gürdal KANAT
(Yıldız Teknik Üniversitesi)

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB021-13

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

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Yusuf SÖYLEMEZ

Danışman
Prof. Dr. Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM
II. Danışman
Doç. Dr. Gökhan Önder ERGÜVEN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince, tezimin her aşamasında bilgi, birikim, yardım ve yönlendirmelerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nuran CİKCIKOĞLU YILDIRIM'a, deney ve tez yazım aşaması süresince sabır gösteren, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli II. danışman hocam Doç. Dr. Gökhan Önder ERGÜVEN'e, gerek lisans gerek ise yüksek lisans tez yazım ve kontrolü süresince yardımlarını benden esirgemeyen enstitü personeli değerli büyüğüm Necmi ARITÜRK'e katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen, yüksek lisansa adım atmama vesile olan değerli hocam Prof. Dr. Numan YILDIRIM'a teşekkürü borç bilirim. Canlı model uygulamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Osman SERDAR hocama teşekkür ederim.

Son olarak, atacağım yeni adımlarda bana destek olacak eşime ve sevgili aileme TEŞEKKÜR ederim.

Yusuf SÖYLEMEZ
TUNCELİ-2023

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
RESİMLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ	2
1.1. Pestisitler	2
1.2. Pestisitlerin Bozulmasına Yönelik Mikrobiyal Potansiyel.....	6
1.3. Biyoremediasyon: Çevre Temizliği İçin Gelişmekte Olan Bir Teknoloji.....	9
1.4. Biyoremediasyon Teknolojileri Türleri	10
1.4.1. Yerinde biyoremediasyon teknikleri	11
1.4.2. Ex situ biyoremediasyon teknikleri	12
1.5. Aerobik Koşullarda Pestisit Biyoremediasyon	14
1.6. Pestisitlerin Mikrobiyal Bozunmasına İlişkin Biyokimyasal Mekanizmalar ...	16
1.7. Oksidatif Dönüşümler.....	18
1.7.1. Sitokrom P450 ile reaksiyonlar	18
1.7.2. Peroksidazlar, fenoloksidazlar ve ilgili oksidoredüktazlar ile transformasyon	18
1.8. Hidrolitik Transformasyon	20
1.9. Karbon-Fosfor Bağ Parçalanma Reaksiyonları	21
1.10. Pestisit Konjugasyon Reaksiyonları	22
1.11. Bağlı Pestisit Kalıntılarının Oluşumu.....	23
1.12. Rizosferdeki Pestisitlerin Bioremediasyonu.....	23
1.13. Biyoindikatörler.....	24
1.14. Model Canlı Olarak <i>Gammarus pulex</i>	28
1.15. Oksidatif Stres	28
1.16. Antioksidanlar	28
1.17. Süperoksit Dismutaz (SOD)	29
1.18. Katalaz (CAT)	30
1.19. Tiyo Barbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS).....	29
1.20. Glutasyon (GSH).....	29
1.21. Nörotoksisite.....	31
1.22. Asetilkolinesteraz (AChE).....	31
2. MATERYAL VE METOD	33
2.1. Pestisit Ve Mımyasalların Tmini.....	33
2.2. Yapay Tarla Düzenğinde Kullanılan Toprakların Kalite Ölçümleri	33
2.3. Bakteri Türünün Tanımlanması.....	33
2.4. Glifosat Herbisit Çözeltilerinin Hazırlanması	34
2.5. Glifosatın Biyoyıslah İşlemiyle Giderimi	35
2.5.1. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) tayini	36
2.5.2. Toplam organik karbon (TOK) tayini	36
2.6. Model Organizma <i>G. pulex</i>	35
2.7. <i>G. pulex</i> 'in Arıtılmış Ve Arıtılmamış Glifosat Çözeltilisine Maruziyeti	38
2.8. Diseksiyon İşlemleri Ve Dokuların Hazırlanması.....	38

2.9. Biyokimyasal Yanıtın Belirlenmesi	39
2.9.1. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	39
2.9.2. Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	39
2.9.3. Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	39
2.9.4. Glutasyon seviyelerinin belirlenmesi.....	38
2.9.5. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddesi) düzeylerinin belirlenmesi ..	39
2.9.6. İstatistiksel analizler	39
3. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
3.1. Mikrobiyal Tür Teşhis Sonuçları.....	41
3.2. Toprak Tahlili Sonuçları.....	41
3.3. Biyolojik Çalışmaları Sonuçları	42
3.3.1. Sistem verimleri	43
3.3.2. Gerçek giderim verimleri	47
3.4.Biyokimyasal Parametreler	56
3.4.1. AChE sonuçları	58
3.4.2. MDA sonuçları	59
3.4.3. GSH sonuçları	59
3.4.4. SOD sonuçları	60
3.4.5. CAT sonuçları	61
4.ÖNERİLER.....	69
5. KAYNAKÇA.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Glifosatın' in hazırlanışı.....	6
Şekil 1.2. (A) in situ ve (B) ex situ bioremediasyon ile yeraltı kirlenmiş toprak ve yeraltı suyunun biyolojik ıslahı teknoloji.	10
Şekil 1.4 Comamonas sp. tarafından nitrobenzen biyolojik parçalanmasının oksidatif ve indirgeyici yollarına ait şema.	19
Şekil 1.5 Degradasyon için metabolik yol Atrazin, Pseudomonas sp. ADP suşu.....	21
Şekil 3.1. Toprak + Glifosat + 10 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait KOİ – TOK grafiği.....	44
Şekil 3.2. Toprak + Glifosat + 20 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait KOİ – TOK grafiği.....	44
Şekil 3.3. Toprak + Glifosat + 40 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait KOİ – TOK grafiği.....	45
Şekil 3.4. Toprak + Glifosat + 10 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği	45
Şekil 3.5. Toprak + Glifosat + 20 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği	46
Şekil 3.6. Toprak + Glifosat + 40 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği	46
Şekil 3.7. Toprak + Glifosat + 10 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği	47
Şekil 3.8. Toprak + Glifosat + 20 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği	48
Şekil 3.9. Toprak + Glifosat + 40 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği	48
Şekil 3.10. Toprak + Glifosat + 10 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği.....	49
Şekil 3.11. Toprak + Glifosat + 20 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği.....	49
Şekil 3.12. Toprak + Glifosat + 40 ml <i>B. aryabhatai</i> ' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği.....	49
Şekil 3.13. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te AcHE(ng/L) enzim düzeyleri.....	58
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te MDA (nmol/mg) düzeyleri	59
Şekil 3.15. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te GSH (mM) düzeyleri	60
Şekil 3.16. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te SOD (U/mL) enzim aktiviteleri	61
Şekil 3.17. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te CAT (nmol/min/mL) enzim aktiviteleri.....	62

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Başlıca pestisit grupları, hedef organizmaları ve yaygın örnekleri	4
Tablo 1.2. Organik bileşikleri, böcek ilaçlarını veya bunların metabolitlerini parçalayabilen bakteriler	7
Tablo 1.3. Biyoindikatörlerin ekosistemdeki davranışı	26
Tablo 3.1. Çalışmada biyoremediasyon faaliyetinde ve bakteri izolasyonunda kullanılan tarım toprağının analiz sonuçları	41
Tablo 3.2. Farklı konsantrasyonlarda glifosat insektisit çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan <i>G. pulex</i> 'te AChE, SOD, CAT enzim düzeyleri ile MDA ve GSH seviyelerindeki değişiklikler	56



RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. Yapay tarla düzeneği.....	35
Resim 2.2. <i>G. pulex</i> lerin toplandığı Munzur Nehri.....	37
Resim 2.3. Akvaryumda bulunan stok <i>G. pulex</i>	37
Resim 2.4. Deney düzeneği.....	38



KISALTMALAR LİSTESİ

ACHe	: Asetilkolinesteraz
CAT	: Katalaz
CB	: Karbamat
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroetan
DDE4	: Diquot Dipremide (etilen-d4)
DGGE	: Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi
GEM	: Genetiği Değiştirilmiş Mikroorganizmalar
GPX	: Glutasyon Peroksitaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MDA	: Melandialdehit
MCA	: Monokloro Asetat
MCPA	: Monokloropropiyonat
PCB	: Poliklorlu Bifeniller
PCP	: Pentaklorofenol
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RDE	: İndirgeyici Halojen Giderme
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDB	: Sabuuraud Dextrose Broth
SM	: Standart Metod
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBARS	: Tiyo Barbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCE	: Trikloretilen
TOK	: Toplam Organik Karbon
OP	: Organofosfat
UDPG	: Üridan Difosfat Glikozil
USEPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Bu çalışmada glifosat herbisitinin tarım alanlarında kullanılan konsantrasyonu baz alınarak hazırlanan sulu çözeltileri, laboratuvarında oluşturulmuş beş adet yapay tarla düzeneklerine ilave edilmiş ve bu düzeneklerin her birine çeşitli konsantrasyonlarda *B. aryabhatai* bakterisi ilave edilmiştir. Oluşturulan bu düzeneklerden günden güne süzüntü alınarak kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve toplam organik karbon (TOK) parametrelerine bakılıp *B. aryabhatai* bakterisinin gösterdiği giderim verimleri takip edilmiştir. Arıtım öncesi ve en yüksek giderim veriminin olduğu arıtım sonrası alınan süzüntü suyunun *G. pulex* üzerinde gösterdiği toksik etkiler de süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), asetilkolinesteraz (AChE), glutatyon (GSH) gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan parametrelerle, lipid peroksidasyonun göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaktif maddesi (TBARS) seviyelerindeki değişimlerle takip edilmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre *B. aryabhatai* bakterisi en yüksek giderim verimini 10 ml' lik *B. aryabhatai* ortamında KOİ bazında % 71.1; TOK bazında ise % 85.6 seviyesinde tespit edilmiştir. Enzim aktivite sonuçlarına bakıldığında ise MDA düzeyleri ile AChE kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda glifosat uygulanan gruplarda hem 24. hem de 96. saatin sonunda arttığı, GSH düzeyleri ile SOD, CAT enzim aktivitesi azaldığı tespit edilmiş ve dolayısıyla *B. aryabhatai*' nin biyoremediasyon faaliyetlerinde etkin bir bakteri türü olduğunun yanı sıra *G. pulex*'in de alıcı ortamlarda toksik yanıt araştırmalarında uygun bir model canlı olduğu görüşüne varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Glifosat herbisit, *Bacillus aryabhatai*, *Gammarus pulex*, Biyoremediasyon, Tiyobarbitürik asit.

ABSTRACT

Investigation of herbicide bioremediation efficiency in soil environment by using some biochemical parameters of *Gammarus pulex*

In this study, aqueous solutions of glyphosate herbicide prepared based on the concentration used in agricultural fields were added to five artificial field setups created in the laboratory, and *B. aryabhatai* bacteria were added at various concentrations to each of these setups. By taking the filtrate from these setups day by day, chemical oxygen demand (COD) and total organic carbon (TOC) parameters were checked and the removal efficiency of *B. aryabhatai* bacteria was followed. The toxic effects of the filtrate taken before and after the treatment, which has the highest removal efficiency, on *G. pulex* are also determined by enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), acetylcholinesterase (AChE), glutathione (GSH), The changes in thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels, which are indicators of lipid peroxidation, were followed. According to the data obtained from the study, *B. aryabhatai* bacteria had the highest removal efficiency of 71.1% on COD basis in 10 ml *B. aryabhatai* medium; On the basis of TOC, it was determined as 85.6%. When the enzyme activity results were examined, it was determined that MDA levels increased at the end of both the 24th and 96th hours in the groups treated with three different sublethal doses of glyphosate when compared with the AChE control, and the GSH levels and SOD, CAT enzyme activity decreased, thus *B. aryabhatai*'s bioremediation activities. In addition to being an active bacterial species, it was concluded that *G. pulex* is also a suitable model for toxic response studies in receptive environments.

Key words: Glyphosate herbicide, *Bacillus aryabhatai*, *Gammarus pulex*, Bioremediation Thiobarbituric acid.

1. GİRİŞ

1.1. Pestisitler

Bugüne kadar, pestisit kalıntıları su, hava, toprak ve tarım ürünlerinin yaygın şekilde kirlenmesine neden olmuştur (Lang ve ark., 2016) ve bunlar daha sonra insanlar tarafından yutulularak birtakım sorunlara sebebiyet verir (Chen ve ark., 2021). Bu sorunlar neticesinde pestisitler vücutta toksik düzeylerde biriktiğinde insan sağlığına önemli zararlar verir (Wang ve ark., 2020).

Mahsul verimindeki olağanüstü artışa katkıda bulunan çeşitli sentetik pestisitlerin kullanımında son yıllarda muazzam bir artış olmuştur. Toprak, yeraltı suyu ve çökeltiler, bu kirleticiler için ya daha basit biçimlere ayrıldıkları ya da kalıcı kaldıkları nihai ortamlardır. Pestisitlerin bazıları biyobirikime duyarlıdır ve çevre için daha fazla tehlikeye neden olur. Fazla pestisit atığının güvenli ve ekonomik bir şekilde bertaraf edilmesi, oldukça büyük bir sorundur. Pestisitler, Ksenobiyotik (xenos, Yunanca "yabancı" anlamına gelir) bileşikler olarak kabul edilir. Bunlar kimyasal olarak üretilen ve doğal dünyada bariz bir karşılığı olmayan sentetik yabancı (insan yapımı) organik bileşiklerdir. Çoğu inatçıdır ve biyolojik bozulmalara karşı da dirençlidirler.

Haşere kontrolü amacıyla 1000'den fazla pestisit pazarlanmıştır. Başlıca pestisit türleri herbisitler, insektisitler, bakteriositler ve fungusitler vb. çeşitleri olan kimyasallardır (Shah ve Dhaliwal, 2006).

Günümüzde pestisitlerin artması çevre sorunlarına neden olmaktadır (Anwar 1997). Pestisitlerin kullanımı üretimi iyileştirmesine, depolanan bitkileri korumasına ve hastalık vektörlerini kontrol etmesine rağmen, bu kimyasalların mesleki ve/veya çevresel olarak insan ve hayvanlara maruz kalması halinde olumsuz sağlık etkileri vardır (Agrawa ve Sharma 2010). Araştırmalar, insektisitlerin antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilişkili enzim aktivitelerini yenilediğini kanıtlamıştır (Öncü ve ark., 2002).

Kimyasal olarak pestisitler, klorlu bileşikler, aromatik halkalar, nitrojen ve fosfor içeren bileşikler ve diğerleri dahil olmak üzere çok çeşitlidir. Klorofenolün toksisitesi ve biyobirikim potansiyeli, klorlama ve lipofiliklik derecesi ile artar. Birçok pestisit bileşenleri genellikle benzen türevleridir. Başlıca pestisit grupları, hedef organizmaları ve yaygın örnekleri aşağıda verilmiştir (Tablo 1.1). Aromatik halka büyük negatif rezonans enerjisine sahiptir, bu nedenle benzen ve türevleri kararlı bileşikler grubudur.

Glifosat ((HO)₂P(O)CH₂NHCH₂CO₂H), tüm dünyada genel olarak kullanılan bir fosfonat grubu herbisittir (Myers ve ark., 2016). Bu herbisit, sulama sistemleri gibi tarım dışı alanlarda yabancı otları temizlemek için tarım ve ormancılıkta yaygın olarak kullanılır (Martínez ve ark., 2018). Glifosatın aktif maddesi ve tarım alanlarında hızlı bozunması nedeniyle hedef olmayan organizmalar için etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu pestisit, kuru ve nemli havalarda, püskürtme şeklinde aşırı kullanımında ve tarım alanlarından deşarj yoluyla alıcı sucul ekosistemlere ulaşabilir (Montiel-León ve ark., 2019). Pek çok deneysel çalışma, glifosatın hedef dışı çeşitli canlı organizmalar üzerinde olumsuz etkiler gösterdiğini ispatlamıştır (Ruuskanen ve ark., 2019). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar, glifosatın habitat ortamında stabil olabileceğini ve yayılabileceğini ve bu kalıcı organik kirletici kalıntıların, hedef olmayan organizmalar ve ayrıca bitkiler üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Muola ve ark., 2021). Glifosatın hazırlanış aşamaları Şekil 1.1' de verilmiştir.

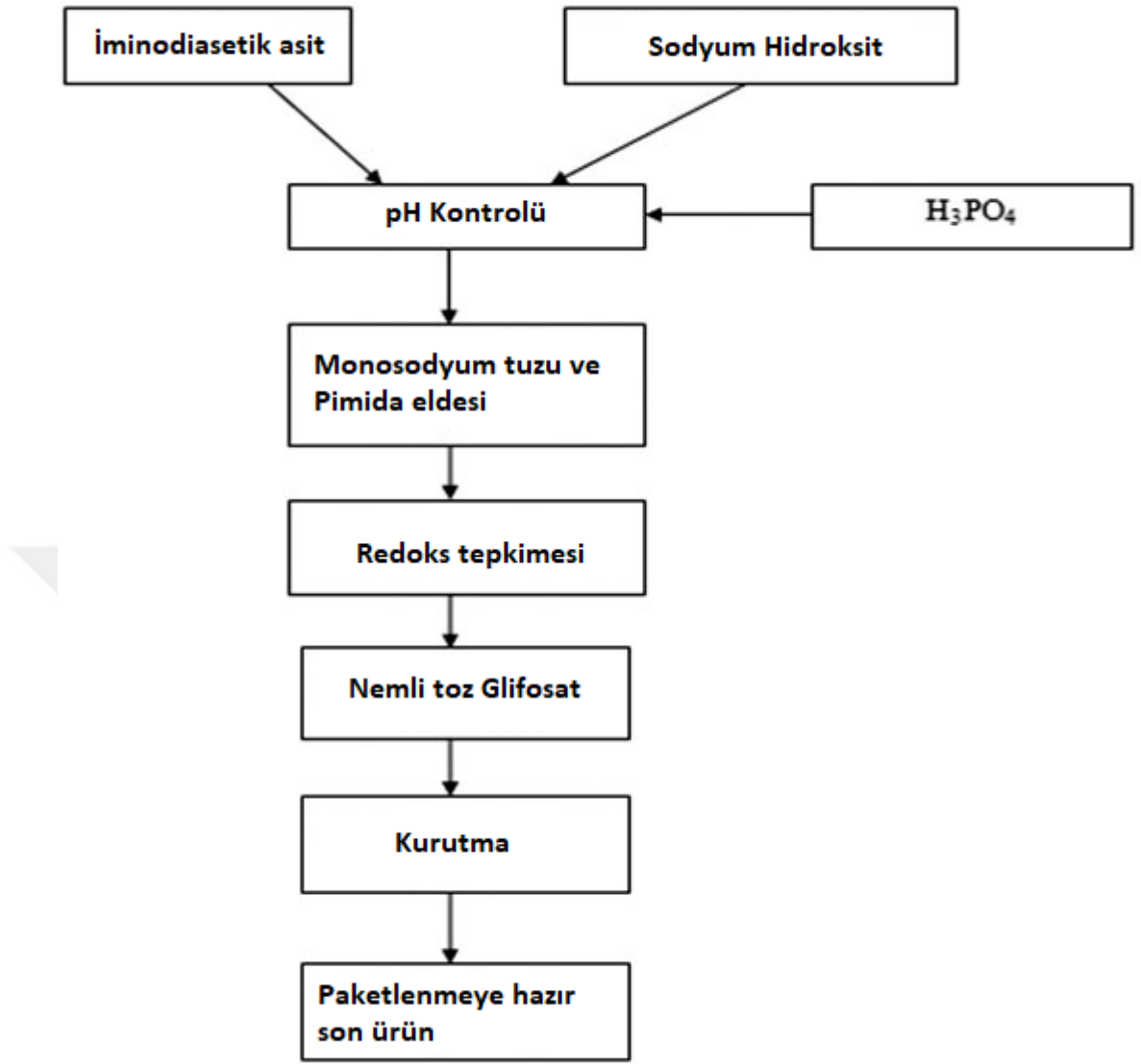
Organofosfat ve karbamat pestisitlerin toksik etkileri, kimyasalların bir nörotransmitter olan asetil-kolinesterazı düzenleyen enzimi bozduğu sinir sisteminde meydana gelir. Piretroidler, nöronal hiper uyarılabilirliğin bir sonucu olarak ikincil bir şekilde olumsuz etkiler üreten fonksiyonel toksinlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya çapında her yıl bir milyon pestisit zehirlenmesi vakasının meydana geldiğini tahmin ediyor. Aynı zamanda bu pestisitlere uzun süre maruz kalmak, kanser gibi birçok kronik ve ölümcül hastalık riskinin artmasına neden olur.

Pestisitlerdeki yaklaşık 100 aktif maddenin deney hayvanlarında veya insanlarda kansere neden olduğu bulunmuştur (Encyclopedia of Pest Management, 2002).

Tablo 1.1. Başlıca pestisit grupları, hedef organizmaları ve yaygın örnekleri

Pestisit grubu	Hedef organizma	Temel örnekleri
İnsektisit Fungisit	Böcekler Mantarlar	Karbamil, DDT, aldrin, endosülfan, HCH, malathione, Lindane, Bordo karışımı, kaptan, dinokap, күкүрт, tiram, Pentachlorophenol (PCP)
Herbisitler/Yabani otlar	Yabani Otlar	Atrazin, 2,4D, dinozor, izoproturon, maleik hidrojit, MCPA, simazin, 2,4,5-T, decamba
Nematisitler Rodentisitler	Nematodlar Kemirgenler	DBCB, ECB, metil bromür, metil izosiyanat Alüminyum fosfit, metil bromür, sodyum floroasetat, çinko fosfit
Avisidler	Kuşlar	Endrin, metil paration, fenthion, talyum
Bakteriositler	Bakteriler	Bordo karışımı, kuprik hidroksit, streptomisin, tetrasiklin
Yumuşakçalar	Yumuşakçalar	Karbonil, metaldehit, metikarb, PCP, forat
Akarisitler	Akarlar	Chlorenthol, chlorfenson, cyhexatin, dicofol, dinoseb, DNOC

Asetilkolinesteraz'ı (AChE) inhibe eden sistemik bir insektisit işlevi gören glifosat, su habitatı için oldukça toksik bir etkiye sahiptir (Lau ve ark., 2015). Bu insektisit, çeşitli antioksidan enzimlerde lipid peroksidasyonunun artmasıyla kanıtlandığı gibi oksidatif hasarı ikna edici özelliklere sahiptir (Mansour ve Abdel-Tawab, 2009). İnsektisitlerin hücre dışı ve hücre içi boşluklarda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olarak oksidatif strese neden olduğu belirtilmektedir (Ferreira ve ark., 2010). Çeşitli ksenobiyotikler, ROS üretiminden oksidatif strese neden olur (Limphn-Pacheco ve Gonsebatt 2009). Oksidatif stresten kaçınmak için hücreler, toksik etkileri azaltmak için antioksidanlar aracılığıyla detoksifikasyon süreçlerini aktive eder. Katalaz (CAT), aşırı ROS oluşumuna karşı hücresel antioksidan savunmada önemli bir profile sahiptir. CAT, oksidatif stresin yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçidir ve ayrıca hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürür (Lasczyca ve ark., 2004). Bu, CAT'in dolaylı olarak ROS birikimi ile biyotransformasyon sürecine dahil olduğu anlamına gelir (Schreck ve ark., 2008). Glutasyon S-transferaz (GST), çok fazla bileşenin biyotransformasyonunda ve çeşitli organik bileşiklerle glutasyon peroksidaz (GSH)'nin konjugasyonunu katalize etmede ana bir role hizmet eder (Vos ve Bladeren 1990). Sitokrom P450 enzimleri, ksenobiyotiklerin ve endojen moleküllerin biyotransformasyon adımından sorumludur (Nelson ve ark., 2004). Glifosat bağlı oksidatif hasar, mikrobiyal sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sistemi tarafından biyoaktivasyonla ilgili olarak protein oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonunu başlatan sülfoksit, oksoninisiyat ve sufonun gelişmesine neden olmaktadır (Zama ve ark., 2007). Omurgasızlar arasında *Gammarus* cinsi amfipodlar ve özellikle *Gammarus pulex* (*Crustacea, amphipoda*), kirleticilerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Adam ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Glifosatın' in hazırlanışı

1.2. Pestisitlerin Bozulmasına Yönelik Mikrobiyal Potansiyel

Pestisitlerin mikrobiyal bozunması uzun süredir bilinmektedir. Son araştırmalar, organik bileşikleri biyolojik olarak parçalayabilen bir dizi mikrobiyal sistemi ortaya çıkarmıştır. Mikroorganizmaların çok çeşitli sentetik herbisitleri ve pestisitleri parçalama konusundaki doğal kapasitesi, toprak kirletici maddelerin bozunmasına yönelik mikrobiyal iyileştirme yöntemi (biyoremediasyon) olarak adlandırılır ve yeşil teknolojilerin temelidir. Mikroorganizmaların çok ilginç bir diğer özelliği de sadece sentetik olarak üretilen bazı organik maddeleri parçalayabilmeleridir. Pestisitlerin mikrobiyal bozunması her zaman detoksifikasyona yol açmasa da birçok durumda ürünler çok daha az tehlikelidir ve/veya

daha fazla bozunmaya duyarlı hale gelir. Pestisit bozunma potansiyeline sahip mikroplar, esas olarak bakteriler, özellikle aktinomisetler ve siyanobakteriler, algler ve mantarlardır. Alifatik hidrokarbonları kullanabilen bakteri türlerinin yirmi sekizi izole edilmiştir (Encyclopedia of Pest Management, 2002). Bunlar arasında en yaygın olanları *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Methylococcus*, vb. türleridir. *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhodotorula*, *Pleurotus*, *Phaenerochaete*, vs. türleri gibi pestisit parçalama potansiyeline sahip birkaç mantar türü aşağıda tanımlanmıştır (Tablo 1.2). Katalitik güç, geniş yüzey hacim alanı ve mikroorganizmaların üreme hızı, kimyasal dönüşümde oynadıkları ana role katkıda bulunur. Bazı organizmalar, pestisitleri parçalayan enzimlere saldırmadan önce, yapısal sentezi için bir adaptasyon süresine ihtiyaç duyar. Bazıları, rastgele mutasyon yoluyla bu yeteneği kazanırken, bazıları da parçalayıcı enzimlerin sentezi için belirli bir pestisit varlığında indüklenir.

Tablo 1.2. Organik bileşikleri, böcek ilaçlarını veya bunların metabolitlerini parçalayabilen bakteriler

	Parçalayabilen bakteriler	Organik bileşik veya pestisit
I. Bakteriler:		
1	Alkaligen denitrifikasyonu	Floranten (PAH)
2	Alkalgen dışkısı	Arilasetonitriller
3	Arthrobacter sp	Karbofuran, Parathion
4	Arthrobacter sp	EPTC, Pentaklorofenol, glifosat
5	<i>Bacillus sphaericus</i>	Üre herbisitler, Parathion
6	<i>Brevibacterium oxydans</i> DH35A	Sikloheksilamin
7	Burkholderia sp. P514	1,2,4,5-Te CB
8	Klostridyum	Kinolin, Glifosat
9	<i>Corynebacterium nitrophilus</i>	Asetonitril, Karboksilik asit
10	<i>Dehalococcoides etanojenler</i>	Trikloretilen (TCE)
11	Desulfovibrio sp.	Nitroaromatik bileşikler
12	Flavobacterium sp.	Pentaklorofenol, Parathion
13	Geobacter sp.	Aromatik bileşikler
14	<i>Klebsiella pnömonisi</i>	3&4 Hidrobenzoat
15	<i>Metilokok kapsulatus</i>	Trikloretilen
16	<i>Nitrosomonas europaea</i>	1,1,1-Trikloroetan
17	Nocardia	Kinolin
18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Paration, Metil paration
19	Pseudomonas kapasitesi Pseudomonas sp.	2,4,5-T Diazinon
20	<i>Rhodococcus klorofenolikus</i>	Pentaklorofenol (PCP)

Biyoyileştirme yöntemleri dışında mikroorganizmalar; tortu, su ve topraktaki kirleticilerin uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir (Demnerova ve ark., 2005). Leckie (2005), beslenme gereksinimleri nedeniyle bakterilerin muhtemelen en çeşitli mikroorganizmalar olduğunu bildirmiştir. Pestisitler (Mohamed ve ark., 2018), poliaromatik hidrokarbon (Abdelhaleem ve ark., 2019) ve ağır metaller (Mohamed ve ark., 2020) gibi bakteriler artık biyolojik arıtma sürecinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda Glifosatı parçalayabilen birçok bakteri suşu zaten herbisit ile tedavi edilmiş bölgelerden izole edilmiştir (Benslama ve Boulahrouf, 2013).

Aerobik ve anaerobik koşullar altında mikroorganizmalar tarafından indüklenen biyokimyasal süreçler mineralizasyon, detoksifikasyon, kometabolizma ve aktivasyondur. Organoklorlu pestisitlerin aksine, organofosfat, karbamat ve piretroid pestisitler biyolojik olarak parçalanabilir. Ana detoksifikasyon süreçleri, hidroliz ve oksidasyondur. Hidroliz, her üç pestisit türü için de en verimli yoldur.

1.2. Biyoremediasyon: Çevre Temizliği için Gelişmekte Olan Bir Teknoloji

Dünya genelinde pestisitlerin üretimi ve kullanımı muazzam bir şekilde artmaktadır ve pestisit endüstrisi tarafından üretilen atık, fiziko-kimyasal ve biyolojik arıtmaları içeren mevcut yetersiz ve etkisiz atık arıtma teknolojisi nedeniyle ciddi bir çevre sorunu haline gelmektedir. Sonuç olarak inatçı pestisit kalıntıları yüzey toprağında kalarak toprak-su ortamının toksisitesine yol açar. Pestisitlerin toksik etkileri göz önüne alındığında, bu kemo-kirleticilerin çevreden uzaklaştırılması esastır. Fitoremediasyon ve rizoremediasyon dâhil olmak üzere biyoremediasyonun, pek çok pestisit türlerinde kirlenmiş toprak için yararlı bir temizleme yöntemi olması beklenmektedir (Matsumoto ve ark., 2009). Geleneksel pestisit detoksifikasyon yöntemleri, pestisitlerin çevredeki toprağa ve yeraltı su kaynaklarına sızması ve potansiyel olarak toksik yan ürün emisyonlarının üretilmesi nedeniyle ikincil kontaminasyon sorunları yaratan depolama alanlarına ve yakmaya dayanmaktadır. Ayrıca yakma, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu (US EPA) tarafından onaylanmasına rağmen, büyük miktarlarda enerji gerektiren çok maliyetli bir süreçtir (Chen ve Mulchandani, 1998). Bu açıdan bakıldığında, biyobozunma, pestisitleri detoksifiye etmek için çok daha güvenli ve ekonomik bir süreçtir. Birçok dağıtma, toplama, uzaklaştırma, düzenli depolama bertarafı ve yakma teknikleri, kirleticileri basitçe seyreltir, ayırır veya başka bir ortama aktarır. Buna karşılık, biyoremediasyon, pestisitler gibi organik

kirleticilerin kısmen veya tamamen mikrobiyal biyokütleyle ve stabil toksik olmayan son ürünlere biyolojik olarak dönüştürülmesiyle sonuçlandığı için daha etkili ve çevreye zarar vermeyen bir temizleme teknolojisi olarak görülebilir (Bakerand Herson, 1994).

Biyoremediasyon, “çevresel suistimale karşı biyolojik bir tepki” olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, tanımı gereği, çevresel kirleticileri daha az toksik formlara indirmek için başta mikroorganizmalar olmak üzere canlı organizmaların kullanılmasıdır. Biyoremediasyon, iki kelimenin birleşimidir. Proseste kullanılan organizmanın türüne bağlı olarak, biyoremediasyon farklı tiplerde olabilir. Bunlardan fitoremediasyon çevreyi temizlemek için bitkilerin kullanılması; mikoremediasyon ise kirlenmiş ortamın temizlenmesi için mantarların kullanılması anlamına gelir. Biyoremediasyon genellikle kirleticilerin çevreden uzaklaştırılması için çevre dostu ve uygun maliyetli bir yaklaşım olarak tanımlanır.

Biyoremediasyon teknolojisinin birçok avantajı vardır:

- a. Doğal biyojeokimyasal süreçleri kullanır.
- b. Uygun maliyetli bir alternatiftir.
- c. Zehirli kimyasallar yok edilir veya çevreden uzaklaştırılır ve sadece ayrıştırılmaz.
- d. Düşük sermaye harcaması.
- e. Diğer teknolojilerle karşılaştırıldığında daha az enerji gerekir.
- f. Daha az manuel denetim gereksimi gerektirir.
- g. Ön yatırım işlemleri için gerekli zaman fazla olsa da daha sonraki aşamalar az zaman alır

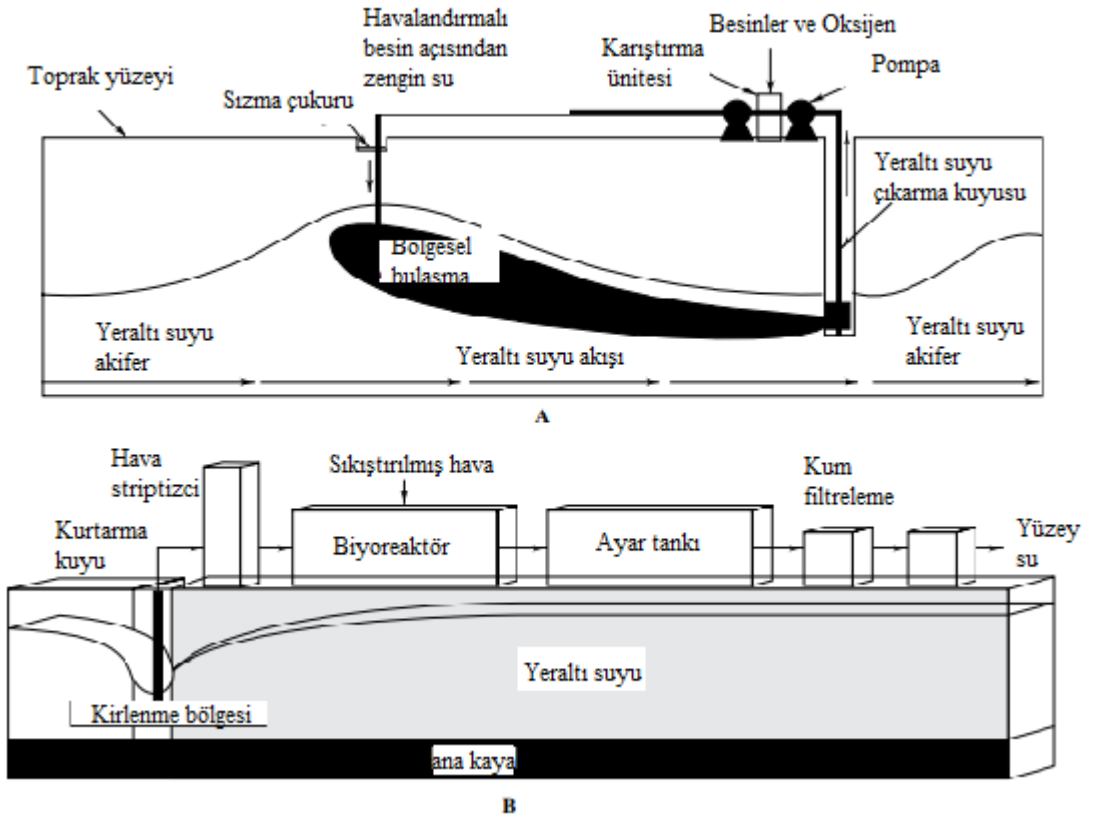
h. Kimasal madde ilavesi pH ayarı gibi nispeten daha az kimyasal madde sarfıyatı gerektirir

- i. Kimyasal madde masrafı minimum seviyededir
- j. Cihazlar için fiziksel alt yapı ve donanım masrafları minimum seviyededir.
- k. Elde edilen sonuçların diğer çalışmalar için referans olma özelliği vardır.
- l. Özellikle son yıllarda uygulanışı yaygın olduğu için geniş bir literatür ağı vardır.
- m. Çalışılan sistem doğa dostu bir sistem olduğu için kirliliği de kendi içinde

giderebilme özelliğindedir. ,

1.3. Bioremediasyon Teknolojileri Türleri

Biyoremediasyon teknolojileri, biyobozunmanın yerinde uyarıldığına mı yoksa kompost yığınlarında veya biyoreaktörlerde ex situ mu gerçekleştirildiğine bağlı olarak iki kategoriye ayrılmıştır. Organik kirleticiler, in situ veya ex situ sistemler kullanılarak biyoremediasyona tabi tutulabilirler (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. (A) in situ ve (B) ex situ bioremediasyon ile yeraltı kirlenmiş toprak ve yeraltı suyunun biyolojik ıslahı teknolojisi.

1.4.1. Yerinde biyoremediasyon teknikleri

Yerinde biyoremediasyon teknikleri, etkilenen alandaki (toprak, tortu ve yüzey suyu veya yeraltı suyu ortamları) organik kirleticilerin biyolojik bozunma hızının artırılmasını içerir. Latince'de "menşe yerinde" anlamına gelir. Biyotransformasyon için mikroorganizmalar ile çözülmüş ve emilmiş kirleticiler arasındaki teması doğrudan içeren

temizleme yaklaşımıdır (Alcalde ve ark., 2006). Bu tür teknolojiler daha ucuzdur, daha az toz oluşturur ve daha az uçucu kirletici madde salınımına neden olur. Yerinde biyoremediasyon yöntemlerinin potansiyel avantajları arasında minimum saha bozulması, kirlenmiş toprak ve yeraltı suyunun aynı anda arıtılması, halkın ve saha personelinin minimum maruz kalması ve düşük maliyet sayılabilir. Ancak bu tekniklerin diğer iyileştirme yöntemlerine göre zaman alıcı olması, değişen çevre koşullarının etkisi altında mikrobiyal aktivitenin mevsimsel olarak değişmesi ve arıtma katkı maddelerinin (besinler, yüzey aktif maddeler ve oksijen) sorunlu uygulanması gibi bazı dezavantajları da vardır. Doğal mikroorganizmalar biyolojik olarak parçalanma kapasitesine sahip olmadığında, in situ biyoremediasyon sırasında yüzeye Genetiği Değiştirilmiş Mikroorganizmalar (GDM) eklenebilir ve bu uyarım ham maddelerin ve atıkların yan ürünlerinin uzaklaştırılması için gerçekleştirilir. Bakteriler, bu biyolojik bozunma süreçlerinde en sık kullanılan ajanlardır. Biyo-uyarım, kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasını gerçekleştiren yerli türlerin büyümesini ve metabolizmasını uyarmak için besinlerin veya gübreler gibi substratların verilmesini içerir. Biyolojik püskürtme, yeraltı suyu oksijen konsantrasyonlarını artırmak ve kirleticilerin yerel mikroorganizmalar tarafından biyolojik bozunma oranını artırmak için su seviyesinin altında basınç ve hava enjeksiyonunu içerir. Biosparging, doymuş bölgedeki karışımı artırır ve böylece toprak ile yeraltı suyu arasındaki teması artırır. Küçük çaplı hava enjeksiyon noktalarının kurulumunun kolaylığı ve düşük maliyeti, sistemin tasarımında ve yapımında önemli ölçüde esneklik sağlar.

1.4.2. Ex situ biyoremediasyon teknikleri

Ex situ biyoremediasyon teknikleri genellikle aerobiktir. Katı veya bulamaç fazlı sistemler kullanılarak kirlenmiş toprak veya tortuların işlenmesini içerir. Aslında, mikrobiyal bozunmayı kolaylaştırmak için kirlenmiş alandan atık malzemenin çıkarılmasını ve bunların kirlenmiş alandan uzak bir yerde toplanmasını içerir. Bu teknolojinin maliyetli bir süreç olmasının yanı sıra bazı sınırlamaları ve dezavantajları da bulunmaktadır. İşlenmekte olan kirletici maddenin fiziksel doğasına bağlı olarak, bu teknoloji iki türe ayrılır: (i) biyoreaktörlerde katı sıvı süspansiyonların işlenmesini içeren bulamaç fazlı biyoremediasyon sistemleri; (ii) arazi çiftçiliğini (toprak arıtma üniteleri) içeren katı faz biyoremediasyon sistemlerini içerir. Kompostlaştırma teknikleri, yüksek oranda kirlenmiş sahaların iyileştirilmesi için kullanılır. Bulamaç fazlı biyoremediasyon, kazılan toprak veya

tortuların suyla karıştırıldığı biyoreaktör kaplarında, kapalı göletlerde ve lagünlerde işlendiği kontrollü bir yığın arıtma tekniğidir. Toprağın işlenmesi, düşük bir viskozite sağlamak için kirlenmiş topraktan taşların ve molozların ayrılmasını içerir. Daha sonra toprak, bulamaç oluşturmak için önceden belirlenmiş miktarda su ile karıştırılır. Bu nedenle, bulamaç fazlı arıtma, üç ana bileşeni içeren üç fazlı bir sistemdir: su, hava ve istenen mikroorganizmayı içeren asılı partikül madde. Eklenen suyun konsantrasyonu, kirleticilerin konsantrasyonuna, biyolojik ayrışma hızına ve toprağın fiziksel yapısına bağlıdır (USEPA, 2006). Yeterli havalandırma ve karıştırmanın sağlanmasına ek olarak, gerektiğinde yüzey aktif maddeler veya dağıtıcı maddelerle birlikte besinler evrensel olarak eklenir. Biyoreaktör kaplarında optimum pH ve sıcaklık koşulları da sağlanmaktadır. Pestisitler, petrol hidrokarbonları, pentaklorofenol, poliklorlu bifeniller (PCB'ler), vb. dahil olmak üzere çok çeşitli organik bileşiklerle kirlenmiş toprak ve tortular için bulamaç fazlı sistemlerle etkili biyoremediasyon elde edilmiştir. Biyolojik olarak, üç tür bulamaç faz biyoreaktörü vardır: Havalandırılmış lagünler, düşük kesmeli hava taşıma reaktörü ve akışkan yataklı toprak reaktörü. Bir bulamaç biyoreaktörü, toprağa bağlı ve suda çözünür kirleticilerin biyoremediasyon oranını artırmak için üç fazlı (katı, sıvı ve gaz) bir karıştırma koşulu oluşturmak için kullanılan bir muhafaza kabı ve aparatı olarak tanımlanabilir. Hedef kirleticileri parçalayabilen toprak ve biyokütle (genellikle yerli mikroorganizmalar) oluşturmaktır. Genel olarak, biyobozunmanın hızı ve kapsamı, bir biyoreaktör sisteminde yerinde veya katı fazlı sistemlere göre daha fazladır, çünkü kapalı ortam daha yönetilebilir ve dolayısıyla daha kontrol edilebilir. Biyoreaktör sistemlerinin avantajlarına rağmen, kirlenmiş toprağın ön arıtma gerektirmesi (örn. kazı) veya alternatif olarak kirletici maddenin toprak yıkama veya fiziksel ekstraksiyon (örn. bir biyoreaktöre yerleştiriliyor) gereklidir. Katı faz sistemi, organik atıkları, gübreleri, arıtma çamurunu ve kentsel katı atıkları içerir. Geleneksel temizlik uygulamaları, organik materyallerin resmi olmayan bir şekilde işlenmesini ve toprağı iyileştirmek için kullanılabilecek kompost üretimini içerir. Katı faz biyoremediasyonda, kirlenmiş toprak kazılır ve yığınlara yerleştirilir. Bakteriye büyüme, yığınlar boyunca dağıtılan bir boru ağı aracılığıyla uyarılır. Borulardan hava çekilerek mikrobiyal solunum için gerekli havalandırma sağlanır. Nem, toprağa su püskürtülerek verilir. Katı fazlı sistemler büyük miktarda alan gerektirir ve temizleme işlemlerinin tamamlanması bulamaç fazlı işlemlere göre daha fazla zaman gerektirir. Bazı katı faz arıtma işlemleri, mineral yüzeyler, reaktif organik bileşikler ve inorganik metaller üzerindeki arazi çiftçiliği kimyasal gruplarını içerir. Pestisitlere mikrobiyal adaptasyonun kesin mekanizması

tam olarak anlaşılamamıştır. Mikroorganizmalar, potansiyel bir substrat ile başa çıkmak için gerekli biyokimyasal mekanizmaları kodlamak için genetik materyal alabilirler. Mikrobiyal biyoremediasyon, aerobik ve anaerobik koşullar altında gerçekleşebilir. Aerobik koşullarda mikroorganizmalar, pestisit bozunması yoluyla karbondioksit ve su üretmek için metabolik işlevleri için mevcut atmosferik oksijeni kullanır. Ancak anaerobik koşullar altında, oksijenin yokluğundan dolayı, mikroorganizmalar topraktaki bu kimyasal bileşikler substrat olarak kullanırlar ve ihtiyaç duydukları enerjiyi elde etmek için onları parçalarlar. Alan ve ark. (1995)' de aerobik ve anaerobik ortamlarda aromatik kirleticilerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini sınırlayan içsel kimyasal hususları gözden geçirmişlerdir.

1.4. Aerobik koşullarda pestisit biyoremediasyon

Oksijenaz enziminin aerobik türler tarafından aromatik moleküller üzerinde elektrofilik saldırıyı başlatmak için kullanılması, kloro, nitro ve azo grupları gibi çok sayıda elektron çeken süstitüentin varlığıyla ciddi şekilde engellenir. Organizmalar tarafından ortak metabolizma, mikrobun hidroliz reaksiyonunu katalize etmesine izin verir. Pestisit kontamine olmuş toprağın biyoremediasyonunda önemli bir faktör, kirleticinin mikroorganizmalar için mevcudiyetidir. Bu mevcudiyet, organik bileşiğin toprağa adsorpsiyonunun afinitesinin bir fonksiyonudur. Nem içeriği ayrıca pestisitlerin mikrobiyal bozunmasında önemli bir rol oynar. Pestisitlerin organizmaya mevcudiyeti, bileşiğin sudaki çözünürlüğüne bağlıdır. %50' lik bir nem içeriği, iyi bozunma oranları verecektir. Topraktaki pestisit konsantrasyonu da bozunma hızına katkıda bulunur. Çoğu zaman, toprakta pestisitler gibi belirli bileşikler bulunduğunda, bu bileşikler bozan önemli mikrop popülasyonları mevcut değildir. Bu toprakların ıslahı genellikle biyo-büyütme, özel tohum kültürlerinin geliştirilmesi ve toprak veya biyoreaktörün aşılması yardımıyla yapılır. Dikloro Difenil Trikloroetan (DDT), lindan ve heptaklor gibi bazı pestisitler aerobik bozunmadan daha iyi çalışır. (Fathepure ve ark., 1995). Anaerobik koşullar altında, aromatik bileşik bozunması genellikle nükleofilik saldırı ile başlatılır. Sonuç olarak, kloro, nitro veya azo halkası ikame edicilerinin varlığı, anaerobik bakteriler tarafından aromatik kirleticiye karşı ilk indirgeyici saldırıyı destekleyecektir. Öte yandan, amino grupları gibi elektron veren fonksiyonel gruplar, aromatik bileşiklerin anaerobik dönüşüme duyarlılığını azaltırken, aerobik bozunmaya duyarlılıklarını artırır. Ayrıca, herhangi bir fonksiyonel grubun olmaması, anaerobik ortamda hidrokarbonların gözlenen direnci ile ilişkilendirilmiştir. Pestisitlerin

anaerobik olarak parçalanmasını karakterize eden birçok bozunma reaksiyonu vardır, örneğin:

- a) hidrojen atomunun yerine hidroksil grubunun eklenmesi,
- b) sülfürün SO_2 'ye oksidasyonu. Bu, bir epoksit grubunun oluşumuyla sonuçlanan yaygın bir reaksiyondur. Epoksit grubu, mikrobiyal bozunmaya karşı dirençli olabilir ve mikroorganizmaların hücre materyalleri için toksik olabilir,
- c) bir metil grubunun eklenmesi/çıkarılması. Arsenikli pestisitlerin metilasyonunda,
- d) klorun uzaklaştırılmasında yaygındır. Halojenli bileşikler arasında yaygındır. Bu süreçte bir hidrojen atomu veya hidroksil grubu, klor atomunun yerini alır,
- e) klor göçü. Klorun halka üzerinde bir konumdan başka bir konuma hareketi,
- f) bir nitro ($\text{NO}_2 -$) grubunun amino grubuna (NH_3) indirgenmesi,
- g) sülfürün oksijenle yer değiştirmesidir. Bir insektisit bir kükürt-fosfor çift bağı içerdiğinde ortaya çıkabilir,
- h) bir eterin bölünmesi.

Doğal mikrobiyal topluluklar, çeşitli mikroorganizmaların yüksek oranda birbirine bağımlı olduğu karmaşık topluluklardır. Pek çok bakteri ve mantardan oluşan karmaşık bir toplulukta temsil edilen parçalayıcı yetenekler aralığı, tek başına herhangi bir organizmanın yeteneklerinden çok daha fazladır. Ayrıca, bir ksenobiyotiğin bir organizma tarafından kısmen bozunmasının ürünü, başka bir organizma için bir substrat görevi görebilir. Birkaç farklı organizmanın uyumlu eylemi, ksenobiyotiğin tamamen mineralleşmesine yol açabilir. Bir mikrobiyal topluluğun, biyobozunmanın toksik bir ürününe karşı soliter bir türden daha dirençli olması muhtemeldir, çünkü üyelerinden biri onu detoksifiye edebilir. Böylece, bir mikrobiyal topluluğun bileşimi, besinlerden en etkili şekilde yararlanmak için zamanla gelen çevresel koşullara yanıt verir. Toprağa verilen organik bileşiklerin kaderi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin bir kombinasyonu tarafından belirlenir. Belirli bir molekül buharlaşma, süzme, adsorpsiyon, fotokimyasal bozunma yoluyla uzaklaştırılabilir veya abiyotik oksidasyon veya hidrolize maruz kalabilir. Son olarak, molekül, mikroorganizmaların etkisiyle biyolojik bozunmaya uğrayabilir. Bazı durumlarda, biyolojik ve biyolojik olmayan bozunma ürünleri aynı olabilir. Tek bir organik bileşiğin akıbetiyle ilgili laboratuvar çalışmaları, ksenobiyotiklerin çevrede kalıcılığı konusunda net ve doğru sonuçlar vermemektedir, çünkü doğal habitatlarda mikrobiyal toplulukların çeşitli organik bileşiklerin ve ağır metallerin karışımlarına maruz kalma olasılığı yüksektir. Birçok organizma, ağır metallerin varlığında büyüyemez. Bu nedenle, polisiklik aromatik

hidrokarbonlar veya klorlu organik bileşikler gibi bazı kalıcı organik pestisitleri parçalayabilen bakteriler, ağır metaller de mevcut olduğunda muhtemelen çevreden kaybolacaktır. Bu şekilde, doğal mikrobiyal topluluklardaki mikrobiyal etkileşimler, belirli bir pestisitın biyolojik bozunmasını veya biyotransformasyonunu büyük ölçüde etkiler. Pestisitlerin mikrobiyal bozunmasını etkileyen üç temel faktör vardır:

- a) kommensalizm ve karşılıklılık,
- b) kometabolizm ve
- c) nedensiz biyolojik bozunma olgusu.

Kommensalizm, bir popülasyonun dernekten yararlandığı ve diğerinin etkilenmediği, birlikte yaşayan farklı türlerin iki popülasyonu arasındaki etkileşimli bir birlikteliktir. Karşılıklılık, farklı türden iki organizmanın karşılıklı yararları için yakın fiziksel birliktelik içinde yaşadığı bir etkileşim olan bir simbiyozdur. Gereksiz biyolojik bozunma, bir enzim, doğal substratından başka bir bileşiği dönüştürebildiğinde meydana gelir. Ancak doğal olmayan substratın dönüşümü, onun katalitik aktivitesini etkilemeden enzimin aktif bölgesine bağlanmasını gerektirir. Çeşitli metabolik potansiyele sahip olan ve çok çeşitli moleküller üzerinde hareket edebilen birkaç enzim üreten birkaç bakteri ve mantar vardır. *Cometabolism*, bir organizmanın, büyüme substratı veya başka dönüştürülebilir bileşik de mevcut olduğu sürece, büyümeyen bir substratı dönüştürme yeteneğidir. Büyümeyen bir substrat, saf bir bakteri kültürü için tek karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet edemeyen ve dolayısıyla hücre bölünmesini destekleyemeyen bir substrattır. Pestisitlerden bazıları inatçı görünebilir, ancak kometabolizma süreciyle bozulabilir. Bir dizi mikrobiyal hücreye bağlı ve hücre dışı enzim, örneğin monokloroasetatın (MCA) ve herbisit monokloropropiyonatın (MCPA) kometabolizması gibi herbisit moleküllerindeki bağların kırılmasını katalize edebilir. *Pseudomonas putida* suşu PP3 bu haliyle MCA'yı metabolize edemez, ancak MCPA'yı metabolize ederken, organizma MCA'nın halojensizleşmesini katalize eder (Chatterji, 2007).

1.5. Pestisitlerin Mikrobiyal Bozunmasına İlişkin Biyokimyasal Mekanizmalar

AChE, serin hidroliz ailesine aittir (Masson ve ark., 2009, Small ve ark., 1996) ve esas olarak nörotransmitter asetilkolini spesifik olarak hidrolize eder. AChE'nin organizmada çok önemli bir işlevi vardır ve fizyolojik işlevi, organofosfor bileşikler gibi birçok toksik maddeden etkilenir.

CAT, Süperoksit Dismutaz (SOD), İndirgenmiş Glutasyon (GSH), Glutasyon-S-Transferaz (GST) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin doğal işlevinin bozulması, oksidatif ROS ile sonuçlanan yüksek bir ROS seviyesine yol açar (Raibeemol ve Chitra, 2018). Bu nedenle, bu antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişiklikleri gözlemlemek, oksidatif stres hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir ve bu enzimler, ekotoksikolojik çalışmalarda mükemmel bir biyobelirteç görevi görebilir (Nataraj ve ark., 2017).

Karbarilin yüksek toksisitesi, merkezi ve periferik sinir sisteminde AchE aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek nörotransmitter iletimini bloke etme ve ölümcül sonuçlara yol açabilecektir (Yi ve ark., 2013). Bu nedenle, karbaril kalıntılarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi, dünya çevresini ve insan sağlığını korumak için büyük önem taşımaktadır.

Stres koşulu altında, oksijen içeren serbest radikaller, biyolojik zar üzerindeki çoklu doymamış yağ asitleri üzerinde etki edecek, bu da lipid peroksidasyon reaksiyonuna ve ardından malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksitlerin ve yeni oksijen içeren serbest radikallerin oluşmasına yol açacaktır (Kumari ve ark., 2020). Bu nedenle, yüksek bir MDA seviyesi, antioksidan sistemin bozulmasına bağlı olarak yüksek lipid peroksidasyonunu gösterebilir ve MDA seviyesi dolaylı olarak serbest radikal saldırısının şiddetini yansıtabilir. Ek olarak, antioksidan enzim aktivitesi, serbest oksijen radikallerinin süpürme yeteneğini gösteren bir belirteç görevi görebileceğinden, antioksidan enzimler ve MDA da bitkinin oksidatif hasarını gösterebilir (Kumari ve ark., 2020).

Ksenobiyotik bileşiklere maruz kalınması bir organizmada ROS üretiminde artışa neden olur. (Rosales ve ark., 2019). Bu serbest oksijen radikalleri, oksidatif stres yoluyla amino asitler, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), DNA gibi biyomoleküllerde kayda değer hasara neden olur ve lipid peroksidasyonunu (LPO) indükler (Shah ve diğerleri, 2020). CAT, SOD, GSH, GST ve GPx gibi antioksidan enzimlerinin doğal işlevinin bozulması, oksidatif ROS ile sonuçlanan yüksek bir ROS seviyesine yol açar (Raibeemol ve Chitra, 2018). Bu nedenle, bu antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişiklikleri gözlemlemek, oksidatif stres hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir ve bu enzimler, ekotoksikolojik çalışmalarda mükemmel bir biyobelirteç görevi görebilir (Nataraj ve ark., 2017).

1.6. Oksidatif Dönüşümler

1.7.1. Sitokrom P450 ile reaksiyonlar

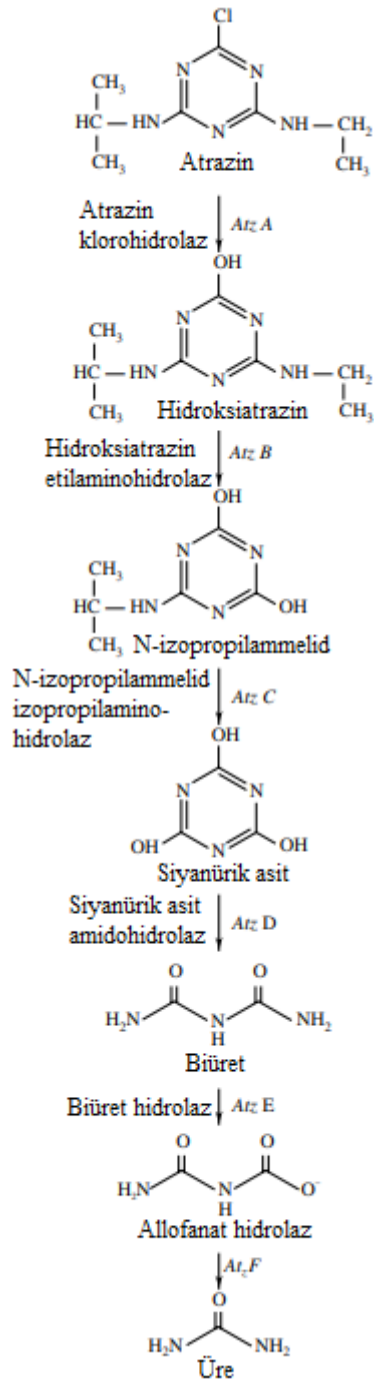
Oksijenleme, pestisitlerin ve diğer organik ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda en sık görülen ilk adımdır. Bu reaksiyonların çoğuna oksidatif enzimler, örneğin sitokrom P450'ler aracılık eder. Bunlar en kapsamlı şekilde incelenen oksidatif enzimlerdir ve Faz I pestisit metabolizmasında en önemli enzimlerdir (Barrett, 2000). Sitokrom P450'ler hayvanlarda, bitkilerde, bakterilerde ve ipliksi mantarlarda karakterize edilen hemetiyolat proteinleridir. Sitokrom P450'ler genellikle monooksijenaz reaksiyonlarını katalize eder ve genellikle hidroksilasyonla sonuçlanır. Zirai kimyasallar, efektörler olarak hareket ederek, böylece pestisit metabolizmasını değiştirerek veya bir organizmanın genel metabolizmasını modüle ederek sitokrom P450 sistemlerini etkileyebilir. Bu etkiler, büyüme ve gelişmeyi etkileyebilecek fizyolojik aktiviteleri artırabilir veya azaltabilir.

1.7.2. Peroksidazlar, fenoloksidazlar ve ilgili oksidoredüktazlar ile transformasyon

P450'lere ek olarak, mikroorganizmalar, çeşitli anilinlerin ve fenollerin polimerizasyonunu katalize eden diğer oksidatif enzimleri (örneğin, peroksidaz, polifenoloksidaz, lakkaz ve tirozinaz) üretir (Dec ve Bollag, 2001). Beyaz çürüklük mantarları (*Phanerochaete chrysosporium*), PCB'ler ve nitroaromatik patlayıcılar gibi çok çeşitli kirleticileri parçalayabilen lignin peroksidaz ve manganez bağımlı peroksidazlara sahip oldukları için ksenobiyotik dönüşüm için yüksek potansiyel sunar. Propanil (herbisit) gibi bazı pestisitler, kanserojen olan azo bileşikleri oluşturmak üzere kısmen biyolojik olarak parçalanır ve bu nedenle biyolojik olarak parçalanmaları başka bir soruna yol açabilir. Çoğu durumda, polimerizasyon ürünleri, substrat ile karşılaştırıldığında azaltılmış toksisiteye sahipken, 3,4-dikloroanilin (propanil metaboliti) toprak mikroorganizmaları tarafından polimerizasyonu, kanserojen tetrakloroazobenzen oluşumuyla sonuçlanır (Pothuluri ve ark., 1991) (Şekil 1. 4).

1.8. Hidrolitik Transformasyon

Hidrolitik enzimler, her bir ürüne H_2O 'dan $-H$ veya $-OH$ grubu ekleyerek bir substratın bağlarını ayırır. Çeşitli substratları, özellikle amid, karbamat veya ester fonksiyonel grupları içerenleri metabolize edebilen birçok hidrolitik enzim vardır. Bu enzimler bölümlere ayrılabilir veya aerobik ve anaerobik koşullar altında hücre dışı reaksiyonlar meydana getirebilir. Ester hidrolizi yaygın olarak esteraz tarafından ve çok daha az ölçüde lipazlar ve proteazlar tarafından gerçekleştirilir. *Pseudomonas fluorescens*'te, her biri protein yapısı, hücresel lokalizasyon ve substrat özgüllüğü bakımından farklılık gösteren dört tip esteraz karakterize edilmiştir. Atrazinin geleneksel olarak orta derecede kalıcı olduğu düşünülmüştür, ancak atrazini tamamen mineralize edebilen bakteriler bulunmaktadır. Atrazin bozunmasının ilk üç enzimini kodlayan gen bölgeleri izole edilmiştir. Bu bakteri, herbisiti tek nitrojen kaynağı olarak kullanarak hem büyüme hem de büyüme olmayan koşullar altında yüksek konsantrasyonlarda atrazini mineralize eder. AtzA geni, atrazini hidrolitik olarak fitotoksik olmayan metabolit hidroksiatrazine klorsuzlaştıran atrazin klorohidrolaz kodlar (Şekil 1.5). Bozunma yolundaki bir sonraki adım, aminoetil grubunun atzB gen ürünü, hidroksiatrazin etil amidohidrolaz tarafından hidroksiatrazinden hidrolitik olarak uzaklaştırılmasıdır. Son olarak atzC geni, N-izopropilammelidi siyanürik aside dönüştüren başka bir amidohidrolaz kodlar (Wackett ve ark. 2002). Yakın zamanda bu suştan tam katabolik plazmit pADP-1'i sıraladılar ve siyanürik asit amidohidrolaz, biüret hidrolaz ve nitroaromatik ksenobiyotikleri kodlayan üç ek gen atzD, atzE ve atzF tanımladılar, aerobik ve anaerobikte bulunan nitroredüktaz enzimlerinin aracılık ettiği bakteriler ve O_2 konsantrasyonlarına karşı değişen hassasiyetlere sahip birkaç mantar türü. Difenil eter herbisitleri metabolize etmek için bir bakteriyel nitroredüktaz genini eksprese eden ve böylece bu herbisitlere karşı mahsul toleransı sağlayan transgenik mahsuller geliştirme potansiyeli vardır (Hoagland ve Zablotowicz, 2001). Çok sayıda bakteri, NH_3 salınımı ve müteakip halka bölünmesi ile sonuçlanan kısmi nitroredüksiyon yeteneğine sahiptir.



Şekil 1.5 Degradasyon için metabolik yol Atrazin, *Pseudomonas* sp. ADP suşu

1.9. Karbon-Fosfor Bağ Parçalanma Reaksiyonları

Pestisit olarak kullanılan organofosfonatlar, fotokimyasal, hidrolitik, termal veya kimyasal bozunmaya uğramayan bir karbon-fosfor (C-P) bağına sahiptir. Bununla birlikte,

birçok organofosfonat bileşiği, mikrobiyal bozunma nedeniyle çevrede kalıcı değildir. C-P bağlarının bozunması, bakterilerde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Örneğin, *Escherichia coli*'den 17 genden oluşan phn olarak adlandırılan bir gen kümesi, çok çeşitli fosfonatların parçalanmasından sorumludur ve muhtemelen bir C-P liyazını kodlar (Kim ve ark., 1993). Organofosfonat C-P bağlarının doğrudan bölünmesinden sorumlu olan enzim(ler), C-P liyaz genel adıyla bilinir.

1.10. Pestisit Konjugasyon Reaksiyonları

Pestisit konjugasyonu son zamanlarda "eksojen veya endojen doğal bir bileşiğin bir pestisit veya metabolitlerine katılarak detoksifikasyon, bölümlendirme, sekestrasyon ve/veya mineralizasyonu kolaylaştıran metabolik süreç" olarak tanımlanmıştır (Hall ve ark., 2001). Pestisitlerin konjugasyonu genellikle mevcut enzimatik makinelerin kullanımını içerir ve bu nedenle kometabolik bir süreç olarak adlandırılır. Selüloz biyosentezinde yer alan bir enzim olan üridin difosfat-glikozil (UDPG) transferaz, pestisit-glikoz konjugasyonuna ve pestisit-glikoz ester konjugasyon reaksiyonlarına aracılık eder. Yukarıda bahsedildiği gibi, pestisitlerin glukoz esterleri esterazlar tarafından bölünür ve bu da genellikle pestisit salınmasına neden olur. Mikrobiyal pestisit konjugasyon reaksiyonları, ksilosilasyon, alkilasyon, asilasyon ve nitrozasyonu içerir ve hücre içi veya hücre dışı olarak meydana gelebilir. Ligninin mantar bozunması sırasında karbonhidratlar üretilir, ancak aynı zamanda toksik fenoller de salınır. Bu fenoller, bir detoksifikasyon mekanizması olarak hücre dışı olarak ksiloza konjuge edilir. Biyolojik olarak dönüştürülmüş pestisit, bakteriler tarafından daha fazla metabolizmaya duyarlı olduğu toprağa salınır. Hem mantarlar hem de bakteriler, ksenobiyotikleri detoksifiye etmek için ortak bir konjugasyon reaksiyonu olarak metilasyonu kullanır. Örneğin, *Trichoderma virgatum*'un mantar kültürleri tarafından O-metillenmiş pentaklorofenol oluşumu, daha az toksik ama daha inatçı bir pentakloroanisol ile sonuçlanır. *Phanerochaete chrysosporium*, hücre dışı parçalayıcı bir enzim sistemi olan bir mangan-oksijen peroksidaz yoluyla klorofenoksiasetik asidi metile eder (Joshi ve Gold, 1993). Topraktaki fenoller ve anilinler genellikle mantarlar tarafından seçilir.

1.11 Bağlı Pestisit Kalıntılarının Oluşumu

Pestisitler (esas olarak konjuge pestisitler) genellikle bitki hücre duvarlarına bağlanır. Bağlı pestisit kalıntıları genellikle sulu ve organik çözücülerle özütlenemeyenler olarak kabul edilir, ancak daha kesin bir tanım sağlanmışır: "bağlı ksenobiyotik kalıntı, bir veya daha fazla endojen makromolekül sınıfıyla ilişkili bir kalıntıdır. İlişkili endojen makromoleküllerin doğasını önemli ölçüde değiştirmeden kapsamlı ekstraksiyon veya sindirim kullanılarak doğal makromolekülden ayrıştırılmaz. (Skidmore ve diğerleri, 1998). Literatürdeki raporlara dayanarak, ksenobiyotiklerin farklı hücre duvarı bileşenlerine rastgele dahil edildiği görölmektedir; ancak, bu bağlamada yer alan bağlantıların türü hakkında çok az şey bilinmektedir. *Phanerochaete chrysosporium*'un bağlı kloroanilini ve 2, 4-diklorofenölü mineralize ettiği gösterildi, bu da bu bileşiklerin biyolojik olarak kullanılabilir hale gelebileceğini gösteriyor. Bununla birlikte, bağlı pestisit kalıntılarının tipik olarak düşük konsantrasyonlarının biyolojik önemi bilinmemektedir. şu anda, ABD Çevre Koruma Ajansı, konsantrasyonlar ana eşdeğerlerin 0,05 ppm'inden veya toplam pestisit kalıntısının %10' undan azsa, bağlı pestisit kalıntılarının karakterizasyonunu gerektirmez. Konsantrasyonlar bu seviyeleri aşarsa, biyoyararlanımın belirlenmesi gerekir.

1.12. Rizosferdeki Pestisitlerin Bioremediasyonu

Bitkiler tarafından salınan kimyasallar, ksenobiyotik bozulmayı artırabilir ve bu nedenle, kirlenmiş toprakların iyileştirilmesinde bitkilerin kullanılması faydalı olabilir. Rizosferin antropojenik kirleticilerin ko-metabolizmasını artırmak için hareket edebileceği üç genel mekanizma vardır:

a) Rizosfer, köksüz toprakta ksenobiyotikleri önemli ölçüde bozamayacak kadar düşük yoğunluklara sahip ayrıştırıcı organizmaların seçici olarak zenginleştirilmesine izin verebilir.

b) Rizosfer, ksenobiyotik konsantrasyonu düşük olduğunda veya mevcut olmadığında doğal bir substrat sağlayarak büyümeye bağlı metabolizmayı artırabilir veya mikrobiyal büyümeyi uyarabilir.

c) Rizosfer, parçalayıcı genler veya plazmitler taşıyan belirli mikroorganizmalarda ksenobiyotiklerin kometabolizmasını indükleyebilen doğal bileşikler açısından zengindir.

Bu, aksi takdirde karbon kaynağı olarak bulunamayacak olan ksenobiyotiklerin başlangıçta bozunmasına izin verebilir.

İnorganik katı, cam gibi katı yüzeylerde adsorpsiyon, polimerik jellerde tutma, kapsülleme veya moleküller arası çapraz bağlama yoluyla desteklenir. Desteklerin hazırlanması zaman alıcı ve pahalı olabilse de, destek genellikle yeniden kullanılabilir. Enzimatik arıtma, kirlenmiş toprak ve suyun biyoremediasyonunda büyük umut vaat etmektedir. İndirgeyici halojen giderme (RDE), PCB'ler, TCE, heksaklorobenzen gibi halojenli aromatik, alifatik ve heterosiklik bileşiklerin ve heptaklor ve aldrin gibi halojenli pestisitlerin parçalanması için tek önemli mekanizmadır. Teorik olarak, rizosfer içindeki belirli mikro bölgeler RDE için elverişlidir (anaerobik koşullar, düşük redoks potansiyelleri ve mevcut elektron alıcıları), dolayısıyla halojenli bileşiklerin dönüşümünü kolaylaştırır. Rizosfer ortamındaki O₂ dağılımındaki uzamsal ve zamansal heterojenlik genellikle (ancak her zaman değil) mikroplara anaerobik olan ve düşük redoks potansiyeline sahip yerel ortamlar sağlar, böylece RDE reaksiyonlarını destekler (Barkovskii, 2001). Ayrıca, nitrat, ferrik demir, sülfat ve kinonlar gibi terminal elektron alıcılarının çoğu rizosferde bol miktarda bulunur. Hidrofobik kirleticilerin biyoyararlanımı, ksenobiyotik dönüşüm ve mineralizasyon oranını belirler.

1.13. Biyoindikatörler

Biyoindikatörler, çevredeki doğal ekosistemin sağlığını tanımlama için kullanılan bitkiler, planktonlar, hayvanlar ve mikroplar gibi canlı organizmalardır. Biyoindikatörler aynı zamanda çevre sağlığını ve çevrede meydana gelen biyocoğrafik değişiklikleri değerlendirmek için kullanılırlar. Biyolojik bir sistem içindeki her organik varlık, çevredeki ortamda meydana gelen değişikliklere hızla yanıt veren ve su kalitesinin yanı sıra su kirliliğinin bir göstergesini değerlendirmek için önemli bir biyobelirteç görevi gören plankton gibi çevresinin sağlığına ilişkin bir gösterge sağlar. Su florasının ekosistemdeki sağlığı en iyi şekilde erken uyarı sinyali görevi gören plankton tarafından yansıtılır (Parmar vd., 2015).

Bilim adamları biyoindikatörler için geleneksel olarak kimyasal tahliller yapmışlardır ve ortamın fiziksel parametrelerini (ortam sıcaklığı, tuzluluk, besin çeşidi ve miktarı, kirleticiler, mevcut ışık ve gaz seviyeleri) doğrudan ölçmüşlerdir. Oysa biyogöstergelerin kullanımı her iki kimyasal kirleticinin kümülatif etkilerini değerlendirmek için biyotayı

kullanılmaktadır ve durum da zamanla habitat değişiklikleri meydana getirmiştir. Sonuç olarak, biyogöstergelerin kullanımı, klasik çevresel kalite ölçümlerinden temelde farklıdır ve çok sayıda avantaj sunar. Birincisi, biyogöstergeler, bir organizmanın belirli bir sistemdeki yaşam süresine veya kalma süresine karşılık gelen geçici bir bileşen ekleyerek mevcut, geçmiş veya gelecekteki çevresel koşulların entegrasyonuna izin verir. Buna karşılık, birçok kimyasal ve fiziksel ölçüm, yalnızca numune alma sırasındaki koşulları karakterize ederek, kirleticilerin sporadik darbelerini kaçırma olasılığını artırır. Ek olarak, kirletici maddeler son derece düşük konsantrasyonlarda oluşabilir. Bu kadar düşük konsantrasyonları tespit etmek için çok yüksek bir maliyetle son derece hassas teknolojilerle yapılan analizler gereklidir. Bir kez tanımlandıktan sonra, bilim adamları, bu tür bağlantılar büyük ölçüde bilinmediğinde, herhangi bir potansiyel biyolojik tehlikeyi bu eser miktardaki kirletici maddelerle ilişkilendirmelidir. Alternatif olarak, biyogöstergelerin tolerans aralığı, ne kadar küçük olursa olsun, biyolojik olarak anlamlı kirletici düzeylerinin bir göstergesini sağlamış olur (Rosenberg vd., 1992).

Biyoin dikatörlerin kullanımının bir başka yararı da, birçok fiziksel veya kimyasal ölçümün yapamadığı durumlarda, kirleticilerin dolaylı biyotik etkilerini gösterebilme yetenekleridir. Fosforca zengin lağı m suyunu bir göle boşaltan bir borunun ekosistemi olumsuz etkileyeceğı aşıkardır. Fosfor genellikle tatlı su ekosistemlerinde birincil üretimi sınırlar; bu nedenle, yüksek fosfor konsantrasyonlarının bazı türlerin büyümesini ve üremesini artıracığını tahmin edebiliriz. Bununla birlikte, kimyasal ölçümler, tür çeşitliliğindeki azalmayı veya diğ er türlerin büyümesinin ve üremesinin rekabetçi dışlanma nedeniyle nasıl azalabileceğini doğru bir şekilde yansıtmayabilir. Dolaylı kirletici etkilerin, biyolojik birikim durumunda kimyasal veya fiziksel ölçümlerden elde edilmesi özellikle zordur. Diğ er kirleticilerin yanı sıra metaller biyolojik organizmalarda birikerek metal konsantrasyonlarının besin ağları yoluyla çoğ almasına neden olur. Bu nedenle, daha yüksek trofik seviyelerdeki kirletici seviyeleri, fiziksel veya kimyasal ölçümlerle yetersiz temsil edilebilir (Tanebe vd., 2006).

İzlenecek binlerce madde ve faktör göz önüne alındığında, bilim adamları artık biyotanın kendisinin, ekosistemlerin rahatsızlığa veya bir stres kaynağının varlığına nasıl tepki verdiğinin en iyi tahmincisi olduğunu anlamışlardır. Tüm toplulukların (ve onların içindeki tüm türlerin tepkilerinin) kullanımı bilgilendirici olabilsede, özellikle özel habitatlarda sorunlar ortaya çıkabilir. Ortalama bir tropik yağmur ormanı hektar başına yaklaşık 300 ağ aç türü içerebilir ve her bir türün bir rahatsızlığa tepkisini tek tek sıralamak

açıkça gerçekçi değildir. Ayrıca, net bir biyoendikasyon sinyali, aşırı sayıda farklı türlerin tepkileri tarafından gizlenebilir (örneğin, bazı türler artarken diğerleri azalır). Bu durumlarda, bir bozukluğun tüm doğrudan ve dolaylı etkilerini entegre etmek için bilim adamları, yalnızca biyotanın bir alt kümesine veya tek bir türe odaklanır. Bu daraltılmış yaklaşım, izlemeyi biyolojik olarak daha alakalı ve uygun maliyetli hale getirir. Ayrıca, kimyasal ve fiziksel ölçümlerle ilgili ortak bir sorun, tür açısından zengin bu habitatların doğasında bulunan karmaşık bir yanıtı basitleştirmeleridir. Biyogöstergeler, ekosistemlerin karmaşık inceliklerine dayanır ve ortamın durumunun dinamik bir resmini iletme için temsili veya kümelenmiş bir yanıt kullanır (Tanebe vd., 2006).

Spesifik ortama, mevcut türlere ve yerel rahatsızlıklara bağlı olarak, uygun biyoindikatör türler veya tür gruplarının seçilmesi gerekir. Ekolojistler, türlerin iyi biyogöstergeler olarak değerlendirilmesi için sergilemesi gereken geniş bir kriterler seti oluşturmuşlardır (Tablo 1.3) (Holt vd., 2010).

Tablo 1.3. Biyoindikatörlerin ekosistemdeki davranışı

İyi gösterge yeteneği	Ölçülebilir yanıt sağlar (rahatsızlığa veya strese karşı duyarlı ancak ölüm yaşamaz veya doğrudan çevrelerinden kirlenici madde biriktirmez)
	Tüm popülasyon/topluluk/ekosistem yanıtını yansıtır
	Kontaminasyon veya bozulma derecesi ile orantılı olarak yanıt verir
Bol ve yaygın	Yeterli yerel nüfus yoğunluğu (nadir türler optimal değildir)
	Yaygın, soru alanı içindeki dağılım dahil
	Orta derecede iklimsel ve çevresel değişkenliğe rağmen nispeten kararlı
İyi çalışılmış	Ekoloji ve yaşam öyküsü iyi anlaşılmış

	Taksonomik olarak iyi belgelenmiş ve kararlı
	Araştırması kolay ve ucuz
Ekonomik/ticari açıdan önemli	Halihazırda başka amaçlar için hasat edilen türler
	Türlere halkın ilgisi veya farkındalığı

Biyogöstergelerin pek çok avantajı, dünyadaki yaygın kullanımları ve çeşitli uluslararası anlaşmalara dahil edilmeleri için yasal zorunluluklarını da beraberinde getirmiştir. Yine de biyogöstergeler sorunsuz değildir. Kömür madenindeki kanaryalar gibi, erken uyarı sinyalleri işlevi görmek için bazı biyogöstergelerin hassasiyeti güvenilirdir. Bazı durumlarda, doğal değişkenliği insan etkilerinden kaynaklanan değişikliklerden ayırt etmek zor olduğundan heterojen ortamlarda biyogöstergelerin uygulanabilirliğini sınırlıdır. Buna göre, gösterge türlerin popülasyonları, değişim mekanizmalarını karmaşıklaştıran, rahatsızlık veya stres dışındaki faktörlerden (örn. hastalık, parazitlik, rekabet, avlanma) etkilenebilir. Biyogöstergelerin kullanımına yönelik ikinci bir eleştiri, gösterge yeteneklerinin ölçeğe bağlı olmasıdır. Örneğin, büyük bir omurgalı göstergesi (örneğin bir balık), yerel böcek topluluğunun biyolojik çeşitliliğini göstermede başarısız olabilir. Üçüncüsü, biyoindikatör türler, ekosistemlerindeki diğer türlerden her zaman farklı habitat gereksinimlerine sahiptir. Belirli bir biyogöstergenin habitat gereksinimlerine göre bir ekosistemi yönetmek, farklı gereksinimleri olan nadir türleri korumada başarısız olabilir. Son olarak, biyogöstergelerin genel amacı, bir ortamın kalitesini ve zaman içinde nasıl değiştiğini değerlendirmek için tek bir türü veya küçük bir tür grubunu kullanmaktır, ancak bu, karmaşık bir sistemin aşırı derecede basitleştirilmesini temsil edebilir (Holt vd., 2010).

Biyogöstergelerin dezavantajları, avantajlarının gölgesinde kalmaktadır. Biyogöstergeler, belirli bir ekosistemin sağlığını değerlendirmek için hücresel düzeyden ekosistem düzeyine kadar çeşitli ölçeklerde kullanılabilir. Çevre koşullarına adaptasyon, nüfus yoğunluğu, topluluk bileşimi ve ekosistem süreçlerinde değişiklikler gösteren biyolojik, fiziksel ve kimyasal bileşenlerinden meydana gelir. Yönetim perspektifinden bakıldığında, biyogöstergeler biyolojik olarak neyin sürdürülebilir olup olmadığı konusunda eylemleri bilgilendirir. (Holt vd., 2010).

1.14. Model Canlı Olarak *Gammarus pulex*

Gammarus pulex, en yaygın tatlı su makroomurgasızlarından biridir ve Avrupa'da yaygın olarak dağıtılmaktadır. Organik maddenin parçalanmasında merkezi bir rol oynar (Foucreau ve ark., 2013) ve besin ağında zorunlu bir unsur oluşturur (Macneil ve ark., 1999). Laboratuardaki çok sayıda araştırma, pestisitlerin *Gammarus pulex* ve ilgili kabuklularda üreme, beslenme davranışı ve hayatta kalma üzerinde yaprak çöpü bozulmasının azalmasına neden olan zararlı etkilerini bildirmiştir (Baudy ve ark., 2017). *Gammarus pulex* çok çeşitli kimyasallara karşı hassastır ve sıklıkla risk değerlendirmesi için kullanılmıştır (Vigneron ve ark., 2015). Yüksek risk altında olmadığını düşünmektedir (Rasmussen ve ark., 2012).

Gammarid türleri hem denizde hem de tatlı sularda önemli biyobelirteç organizmalardır (Gerhardt ve ark. 2007). *G. pulex*, önceki çalışmalarda kanıtlanmış olan organofosfatlı pestisitlere aşırı duyarlı olma özelliğine sahip bir test organizması olarak seçilmiştir (Maltby ve Crane 1994)

1.15. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikaller ile onların stabilize edici ajanlarının antioksidan enzimleri arasındaki dengesizliği ifade eder. Reaktif oksijen türleri veya serbest radikaller, normal hücrel metabolizma tarafından üretilebilir ve protein, lipid ve DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücrel hasara neden olur ve dejeneratif değişikliklerden sorumludur. Düşük konsantrasyonda serbest radikaller, fizyolojik düzenlemede ve hücrel sinyalleşme süreçlerinde hayati bir rol oynar, ancak yüksek seviye hücrede zararlı değişikliklere neden olabilir. Bu antioksidanların aksine, serbest radikali stabilize etmek ve reaktif olmayan bir bileşik yapmak için kendi elektronunu vererek oksidanları düşürür ve bu radikallerin hücrede oluşturduğu zararlı etkileri en aza indirir (Manisha vd., 2017).

1.16. Antioksidanlar

Antioksidanlar, ROS'u stabilize edebilen bileşiklerdir. Bu moleküller serbest radikallerin temizleyicileridir ve kolayca oksitlenirler. Antioksidanlar, serbest radikalleri

stabilize etmek ve serbest radikallerin zararlı etkisini en aza indirmek için onu kararlı bir bileşik haline getirmek için elektronlarını bağışlarlar (Manisha vd., 2017).

Antioksidanlar şu şekilde sınıflandırılmıştır:

- I. Konumlarına göre

- Plazma antioksidanları; ürik asit, askorbik asit, bilirubin, transferrin, seruloplazmin.

- Hücre zarı antioksidanları; α - tokoferol (membranöz zincir kırıcı antioksidan)

- Hücre içi antioksidanlar; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz.

- II. Doğaları ve eylemleri temelinde

- Enzimatik antioksidanlar; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz.

- Enzimatik olmayan antioksidanlar ve besinsel antioksidanlar; Beta karoten, atokoferol, askorbik asit.

- Metabolik antioksidanlar; GSH, bilirubin, ürik asit, transferrin, seruloplazmin, albümin, haptoglobin (Mccall., 1998).

1.17. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), sitosolik bakıra bağımlı enzimken, mitokondriyal süperoksit dismutaz, manganez bağımlı enzimdir ve diğerlerini stabilize eder (Sheng ve ark., 2014). Süperoksit dismutaz, en güçlü hücre içi enzimatik antioksidanlardan biri ve süperoksit anyonlarının dioksijen ve sınırlayıcı peroksit iletimini katalize eder.

Hidrojen peroksit, yukarıda tarif edildiği gibi katalaz veya glutatyon peroksidaz ile çıkarılır. Süperoksit dismutaz, aktif metal merkezinin taşıdığı, amino asit grubu, kofaktörler ve diğer özellikleri bir arada gösteren çeşitli izoformlarda bulunur. İnsanlarda üç SOD formülü vardır: sitozolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı-SOD. Süperoksit dismutaz, aktif bölgedeki geçiş metali iyonlarının ardışık oksidatif ve indirgeyici döngülerinden alınan övgüler süperoksit iyonlarını nötralize eder. Bu enzimin iki benzer alt birimi vardır ve alt birimlerin her biri aktif olarak bakır ve gezegen iyonlarından oluşan bir dinükleer metal küme içerir ve spesifik olarak süperoksit anyonunun oksijenlerini ve suya dismutasyonunu katalize eder. Mitokondriyal Mn-SOD, 96 kDa ağırlığa sahip bir homotetramerdir ve alt birim başına bir manganez atomu içerir ve iki boyutta dismutasyon sırasında Mn(III)'ten Mn(II)'ye ve tekrar Mn(III)'e döner Hücre dışı süperoksit dismutaz,

bazı glikozaminoglikanlar için yüksek bir afiniteye sahip olan bir tetramerik sekreter glikoproteindir (Sheng vd., 2014).

1.18. Katalaz (KAT)

Peroksizomdan gelen katalaz enzimi, asidik hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürür (Lobo ve ark., 2010). Katalaz (EC 1.11.1.6), karakterize edilen ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden ilk antioksidan enzimdir.

Katalaz, her biri NADPH molekülü içeren dört alt birimden oluşur. Bu enzim, aerobik hücrelerin peroksizomunda bulunur ve hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü teşvik etmede çok etkilidir. Katalaz, tüm enzimler için en yüksek devir hızlarından birine sahiptir: bir katalaz molekülü, her dakika yaklaşık 6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir. En büyük aktivite karaciğer ve eritrositlerde bulunur, ancak tüm dokularda bir miktar katalaz bulunur (Sies, 2015).

1.19. Tiyo Barbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS)

Lipit peroksidasyonu, membranfosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif ayrışma sürecini içerir, bu da lipithidroperoksit karışımlarının ve MDA Lipid peroksidasyonu gibi aldehidik son ürünlerin karışımlarının oluşumuna yol açar ve hücre zarlarının geçirgenliğini ve akışkanlığını değiştirir. (Esterbauer vd., 1991).

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) olarak ölçülen lipid peroksidasyonu, farklı çevresel kirleticilere yanıt olarak oksidatif stresin bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmıştır (Roméo ve ark. 2000). TBARS biyolojik örneklerde doğal olarak bulunur ve oksidatif strese yanıt olarak konsantrasyonu artan lipid hidroperoksitleri ve aldehitleri içerir. TBARS tahlil değerleri genellikle çoklu doymamış yağ asidi lipid peroksitlerinin ayrışmasından kaynaklanan bir bileşik olan MDA eşdeğerlerinde rapor edilir (Armstrong., 1994).

1.20. Glutasyon (GSH)

Sistein ve glutamik asit parçalarından oluşan bir tripeptit tiyol olan glutasyon, neredeyse tüm canlı hücre tiplerinde yüksek konsantrasyonda bulunur (Ogino vd., 1989).

McLennan ve ark. (1991), glutatyonun, proteinlerin disülfür gruplarını ve diğer hücrel molekülleri indirgeyerek veya serbest radikalleri ve aktif oksijen türlerini yakalayarak hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. İkinci etki, esas olarak, glutatyon peroksidaz tarafından katalize edilen reaksiyonlar yoluyla hidrojen peroksitlerin ve lipid hidroperoksitlerin detoksifiye edilmesiyle gerçekleşir. GSH, kurbağa erken embriyolarında bol miktarda hücre içi tiyoldür ve farklı organizmalarda hücrel redoks durumunun kontrolüne katıldığı bilinmektedir (Kosower vd., 1969). GSH, detoksifikasyon ve hücrel proliferasyon ve gelişimin düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli kritik hücrel süreçlere katılır (Alien vd., 1989). Ayrıca, GSH'nin tiyol-disülfid değişim reaksiyonlarında ve protein-SH gruplarının korunmasında bir kofaktör olduğu bildirilmiştir. Bu gruplar hücre bölünmesinde yer alırlar ve oksidasyonları bu önemli fonksiyona zarar verir (Goddard vd., 1983).

1.21. Nörotoksisite

Nörotoksisite, ajanların (kimyasal, biyolojik veya fiziksel) sinir sisteminde ters fonksiyonel veya yapısal değişikliklere neden olma kapasitesi olarak tanımlanabilir. Çevresel nörotoksisite, çevredeki kimyasallara maruz kalmanın neden olduğu nörotoksisiteyi tanımlar. Buna karşılık, ekolojik nörotoksisiteyi (eko-nörotoksisite), insanlar dışındaki türlerde (örn. balıklar, kuşlar, omurgasızlar) çevresel kimyasallara maruz kalma sonucu ortaya çıkan nörotoksisite olarak tanımlarız. Bileşiklere maruz kalmanın hem düzeyler ve yollar hem de sinir sisteminin yapısı ve işlevi açısından etkileri türler arasında büyük farklılıklar gösterebileceğinden, insan ve insan dışı nörotoksisite arasında ayırım yapmak önemlidir (Legradi, 2018).

1.22. Asetilkolinesteraz (AChE)

Kolinesterazlar, asetilkolin'i hidroliz yoluyla sinaptik yarıktan fizyolojik olarak uzaklaştıran her yerde bulunan bir serin hidrolaz sınıfıdır (Habig vd. 1999). AChE aktivitesinin inhibisyon seviyesi, yaygın olarak organofosfat (OP) ve karbamat (CB) pestisitlerine maruz kalmanın bir biyobelirteci olarak kullanılır. Asetilkolinesteraz, aktif bölgede bulunan ve inaktif bir kompleks oluşturmak için organofosfatlı pestisitlerle etkileşime giren bir hidroksimetil grubuna sahip bir serin enzimidir.

Asetilkolinesterazın fizyolojik rolü, merkezi veya periferik sinir sistemlerinde önemli bir nörotransmitter olan asetilkolinin hidrolizini katalize etmektir. Asetilkolinesteraz, sinir uyarısını sonlandırmaktan sorumlu anahtar bir enzimdir.

Asetilkolinesteraz inhibisyonu, sinaptik yarıktaki asetilkolin birikmesine neden olur ve postsinaptik membran sürekli olarak uyarılır. Nöromüsküler sistemin koordinasyon eksikliği bu etki mekanizmasının doğrudan bir sonucudur ve nihai tepki ölüm olabilir (Aygün ve ark. 2002).

Bu çalışmadaki amaç çeşitli konsantrasyonlarda zenginleştirilmiş *B. aryabhatai* toprak bakterisinin; glifosat herbisitinin tarım arazisinde kullanılan konsantrasyonunun ilave edildiği yapay tarla düzeneğinde gösterdiği biyoremediasyon performansının topraktan elde edilen süzüntü sularında iki önemli çevre parametresi olan kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve toplam organik karbon ihtiyacı (TOK) parametreleriyle günden güne takibi ve biyoremediasyon sonucunda elde edilen bu süzüntü sularının *G. pulex* üzerinde verdiği toksik etkilerinin bazı enzimlerle belirlenmesidir.

Literatürdeki boşluğa göre bu çalışma, *B. aryabhatai* tarafından glifosat herbisitinin biyoremediasyon öncesi ve sonrası glifosat herbisitine maruz bırakılan *G. pulex*'de SOD, CAT, GSH gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan parametrelerdeki değişimler, Lipid peroksidasyonun göstergesi olan TBARS seviyelerindeki değişimler ve Nörotoksisitenin göstergesi olan AChE seviyelerindeki değişimler belirlenerek biyoremediasyon verimi değerlendirilmiştir. Ayrıca KOİ ve TOK parametrelerindeki değişimlere de incelenerek *B. Aryabhatai*'nin biyoremediasyonda etkinliği araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Pestisit ve Kimyasalların Temini

Glifosat, yerel zirai ilaç satıcısından 500g' lık ambalajda temin edilmiştir. Sitokrom P4501A1'in (CYP1A1) biyokimyasal tahlilleri için kullanılan deney kitleri Cusabio şirketinden (katalog no: CSBEL006395FI), GST ve CAT tahlil kitleri sırasıyla 703302 ve 707002 katalog numaralarıyla Cayman Chemical şirketinden satın alınmıştır. COD kitleri, LCK114 ürün koduyla Hach Lange, Türkiye'den temin edilmiştir.

2.2. Yapay Tarla Düzenğinde Kullanılan Toprakların Kalite Ölçümleri

Toprak örnekleri üzerinde saturasyon %, pH, toplam tuz %, kireç %, organik madde %, alınabilir fosfor (P_2O_5 kg/da), alınabilir potasyum (K_2O kg/da) Gıda Tarım ve Hayvancılık Tunceli İl Müdürlüğü Toprak Analiz Laboratuvarı' nda tespit edilmiş olup bu sonuçların eldesinde kullanılan yöntemler ve sonuçları tezin sonuçlar ve tartışma kısmında sunulmuştur.

2.3. Bakteri Türünün Tanımlanması

Çalışmada, bakteri örneklerinin bulunduğu tarım toprağının temini için Tunceli Elazığ karayolu üzerinde buğday ekimi yapılan bir tarım arazisinden 0-30 cm derinliklerden toprak örnekleri alınıp steril cam kavanozlara Zelles ve ark. (1991)' de belirtilen yöntemlere göre toplanmıştır. Buna göre yaklaşık 10 g toprak örneği ilk olarak %0,8'lik sodyum klorürlü izotonik suda 10^6 ' kadar seyreltilmiştir. İzotonik su ile seyreltme yapılmasının maksadı, izotonik suyun saf suya göre bir turgor basıncı oluşturmayacağı ve izolasyon sırasında bakterilerin daha rahat işaretlenebileceğinden dolayıdır. Bu seyreltiden 0,1 ml'lik porsiyonlar otoklavda $121^{\circ}C$ 'de 15 dk 1 atm basınç altında sterilize edilerek hazırlanan plate count agar besiyerine aseptik şartlara sahip ekim kabine Travers ve ark. (1987)' de belirtildiği şekilde ekilmiştir. Ekimden sonra eldeki petri kutuları $25^{\circ}C$ 'lik inkübatöre alınmış ve bakterilerin gelişimi tamamlanmıştır. İnkübatörün $25^{\circ}C$ ' a ayarlanmasının sebebi de toprak örnekleri alındığında toprak sıcaklığının bu sıcaklıklarda olması ve dolayısıyla çalışılan bakterinin de mezofilik şartlarda gelişmesinden dolayıdır. Petri kutuları üzerinde

gelişen bakteriler ekim kabininde steril öze kullanılarak bakteri kolonileri için subaraud dextrose brotha alınıp daha sonra inkübe edilerek zenginleştirilmeleri Cruikshank (1972)' de belirtilen yöntemlere göre sağlanmıştır.

Moleküler tür teşhis çalışmaları için öncelikle petri kutularından izole edilen kültürler, stok edilmek üzere, plate count agar besi yerleriyle hazırlanan eğik besiyerlerine alınmıştır. Bu bakteriler daha sonra tür teşhis çalışmaları için Ankara'da bulunan oligonükleotid ve primerler, moleküler DNA problemleri, sentetik genler ve klonlama, DNA dizilimi, protein sentezi, protein ve gen ekspresyonu analizleri ve hücre kültürü analizleri alanlarında ürün ve hizmetler sunan SENTEBİOLAB BIOTECH firması ile koordineli olarak yürütülmüştür. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemleri için bu laboratuvarında elektroforez cihazı ile mycycler thermal cycler system ve jel görüntüleme sistemi (ORTE) ile genetik analiz sistemi (Beckman Coulter CEQ 8000) kullanılmıştır.

Moleküler karakterizasyon çalışmaları adımımda Wizard Genomic DNA Purification kit yöntemine göre "Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria" metodları Beutler ark. (1990)' da belirtildiği şekilde yürütülmüştür. Mikrobiyal tür tayini basamakları sırasıyla nükleik asit ekstraksiyonu, PCR, Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGGE) ve nükleik asit dizisinin belirlenmesi aşamalarından meydana gelmiştir. Alınan numuneler öncelikle moleküler tekniklerde kullanılmak için uygun hale getirilmiştir. Nükleik asit ekstraksiyonu numunelere uygulanan ilk işlemdir. Ekstre edilen DNA'lar, -20°C'de koruma altına alınıp bu DNA karışımlarından elde edilen 16S rRNA genleri, PCR yöntemi kullanılarak ısı döngüleme (Thermal Cycler) aleti ile zenginleştirilmiş ve daha sonra bakterilerin metanojenik tür çeşitliliği, DGGE ve DNA dizi analiziyle identifiye(tespit) edilmiştir. Bakterilerin sekansları SnapGene programında tespit edilmiştir. Bakterilerin sekansını gösteren kromatogram görüntüsü (sekans dizisi) bir bütün halinde seçilerek bu ekranda tanımlanmıştır ve Blast tıklandıktan sonra çıkan tür analiz dosyasında en yüksek skordaki tür seçilmiştir.

2.4. Glifosat Herbisit Çözeltilerinin Hazırlanması

Glifosat, kullanım tarifinde ve çiftçilerin uygulama dozu baz alınarak hazırlanmıştır. 15g/litre (15000ppm) olarak tavsiye edilen hazırlanış şekli olarak yapay tarla düzeneklerine ilave edilmiştir.

2.5. Glifosatın Biyoyıslah İşlemiyle Giderimi

Plate count agar besi yerlerinden izole edilen ve tür tespiti yapılan *B. aryabhatai* bakterisi glifosatlı ortamlarındaki biyoyıslah faaliyetlerini tespit etmek amacıyla bu bakteriden oluşan karışımları zenginleştirilmiş besi yerlerine (sabouraud dextrose broth) alınarak burada çoğalmaları sağlanmıştır. 24 saatte bir alınan numunelerde Munzur Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü laboratuvarında KOİ ölçümleri yapılırken, örneklerin birer tanesi de TOK analizleri için Fırat Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarına gönderilmiştir. KOİ için standart method 5220B Kapalı reflüks yöntemi kullanılırken, TOK deneyi için Standart Method 5310B Yüksek sıcaklıkta yakma metodu kullanılmıştır.

Giriş TOK ve KOİ değerleri pestisit in KOİ ve TOK değerine yakın olduğunda biyoremediasyon faaliyetlerine başlanmıştır. Çalışmalar 3, 5, 7, 11 ve 13. Günlerde yürütülmüştür.



Resim 2.1. Yapay tarla düzeneği

2.5.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Tayini

Kimyasal oksijen ihtiyacı organik maddelerin redoks reaksiyonlarıyla parçalanması sırasında ihtiyaç duyulan oksijen miktarıdır. Çalışmada organik maddenin yerini glifosat herbisiti almıştır. Kimyasal oksijen ihtiyacı ile pestisit çözeltisinin içeriğindeki organik maddeler, kimyasal oksidasyonları için gerekli oksijen miktarı cinsinden belirlenmiştir. Yöntem birkaç istisna dışında tüm organik maddelerin kuvvetli oksitleyicilerle asit ortamlarda oksitlenebilecekleri esasına dayanmaktadır. Çalışmada HACH DRB 200 model termoreaktör ile Hach DR 890 Colorimeter cihazı ile uyumlu 0-1500 mg/l aralığında ölçüm yapabilen Cat. 23459-52 model KOİ kitleri kullanılmıştır. Çalışmada KOİ aralığı tarım arazilerinde kullanımı tavsiye edilen konsantrasyonlardır

2.5.2. Toplam Organik Karbon (TOK) Tayini

Atıksulardaki organik kirlilik derecesini ölçen önemli bir parametredir. Organik kirleticiler; sularda çözünmüş halde bulunan oksijeni tüketerek kirlenmeye neden olurlar. Bu tip kirleticiler insan faaliyetleri sonucunda sulara karışırlar. Karışıkları sular eğer durgun suysa bunlar suyun dibinde birikirler. Buna sedimentasyon denir. Sedimentasyonla çöken organik maddeler içinde birtakım inorganik maddeler de bulundurulur. Organik ve inorganik maddelerin bir karışımı olan sedimentler mikroorganizmalar için iyi bir besi ortamıdır. Böyle bir ortamda mikroorganizmalar suda çözünmüş oksijeni kullanarak sedimentteki organik maddeleri parçalarlar. Bunlarda su, CO₂, NO₃, SO₄, ve PO₄ meydana getirirler. Çalışmamızda TOK analizleri Fırat Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan SHIMADZU TOC-V model TOK cihazında Standart Method 5310A yüksek sıcaklıkta yakma metodu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan numuneler KOİ deneylerinde kullanılan numunelerin birer örneğidir.

2.5. Model Organizma *G. Pulex*

Model organizmalar Munzur Nehri'nden (39.156820 K, 39.499640 D) toplanmıştır (Resim 2.2). *G. pulex* bireyleri hızla plastik şişelerde Munzur Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarına götürülmüştür (Resim 2.3).



Resim 2.2. *G. pulex* lerin toplandığı Munzur Nehri



Resim 2.3. Akvaryumda bulunan stok *G. pulex*

2.6. *G. pulex*'in Arıtılmış Ve Arıtılmamış Glifosat Çözeltisine Maruziyeti

Arıtılmış ve arıtılmamış Glifosat çözeltileri 3 farklı subletal dozda (Glifosat için belirlenen LC değerinin 1/16, 1/8 ve 1/4 oranlarında) hazırlanmıştır ve organizmalar 24 ve 96 saat boyunca bu çözeltilere maruz bırakılmıştır. Glifosat için LC₅₀ değeri 422,49±35.65 olarak belirlenmiştir.

Organizmalar 20 L'lik bir akvaryumda 12:12 ışık:karanlık döngüsünde 18 °C'de stoklanmış ve denemeden önce 15 gün boyunca canlılar söğüt yaprakları ile beslenmiştir. (De Lange ve ark. 2006). Her bir grupta bulunan organizma sayısı 10 olarak belirlenmiştir. Tüm uygulamalar 3 tekerrürlü yapılmıştır. Deney sırasında ölü bireyler çıkarılmıştır.

2.7. Diseksiyon İşlemleri Ve Dokuların Hazırlanması

Deneylerin bu aşamasında yapılan tüm çalışmalar Munzur Üniveristesi Merkezi ARGE Laboratuvarında yürütülmüştür. Model canlı olarak kullanılan canlı *G. pulex* tir. Dokular tartılmış ve 1/5 w/v PBS tamponu (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) ilave edilerek, homojenizatör kullanılarak buz yardımıyla homojenize işlemi yapılmıştır (Resim 2.4) Elde edilen bu örnekler 15 dakika soğutmalı santrifüjde 17000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantlar -86 °C' de derin dondurucuda deneyler tamamlanıncaya kadar muhafaza edilmiştir.



Resim 2.4. Deney düzeneği

2.8. Biyokimyasal Yanıtın Belirlenmesi

Çalışmada biyokimyasal yanıtın belirlenebilmesi amacıyla SOD, KAT, AChE aktiviteleri ile GSH, MDA düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan kitler CAYMAN firmasından satın alınmıştır. Katalog numaraları: (KAT: 707002, SOD: 706002, AChE: CSB-E17001Fh, GSH:703002 TBARS: 10009055)

2.9.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kit içeriğinin belirlendiği bu yöntemde ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerini belirlemek için tetrazolium tuzu kullanılır. Süperoksit radikalinin %50'sinin dismutasyonunu gösteren bir ünite SOD olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem üç tip SOD'un aktivitesini belirlemek içinde kullanılmaktadır (Cu/Zn, Mn, Fe-SOD).

2.9.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

KAT peroksidatik fonksiyonu kullanılan kitin enzim aktivitesinin belirlenmesinde rol almaktadır. Yöntemin temel prensibi enzimin optimal bir H₂O₂ konsantrasyonunun eşlik etmesiyle metanol ile reaksiyona girmesidir. Üretilen formaldehit, 4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald) ile kromojen olarak spektrofotometrik olarak ölçümü yapılmaktadır. 1,2 Purpald, özellikle aldehitlerle bisiklik bir heterosikl oluşturur ve oksidasyon değişimine bağlı olarak renksizden mor renge doğru bir değişim gözlenir.

2.9.3. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan homojenatlar 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak AChE enzim aktivitesi CUSABIO marka CSB-E17001Fh katalog numaralı kitlerle ELISA yöntemine göre mikropate okuyucu ile belirlendi.

2.9.4. Glutasyon Seviyelerinin Belirlenmesi

GSH sülfhidril grubu, DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2- nitrobenzoik asit, Ellman reaktifi) ile reaksiyona girer ve sarı renkli bir TNB üretir. Disülfür karışımı GSH'nin geri dönüşümü ve daha fazla TNB üretmek için GSTNB (GSH ile TNB arasında), glutasyon redüktazı azaltılır. TNB üretiminin hızı, direkt numunedeki GSH konsantrasyonu ile orantılı olan bu geri dönüşüm tepkimesiyle doğru orantılıdır. TNB'nin 405 veya 412 nm'de emiliminin ölçülmesi, numunede GSH'nin doğru bir tahminini sağlar. GSH disülfid dimer GSSG'ye kolayca okside edilir. GSH test kitinde glutasyon redüktaz kullanımı nedeniyle hem GSH hem de GSSG ölçülür ve test toplam glutasyonu yansıtmaktadır. Çalışmada ticari bir firmadan satın alınan Elisa Kitleri ile GSH seviyeleri ölçülmüştür. Kit bünyesinde bulunan standartlarla absorban eğrisi oluşturulmuş firmanın hesaplama formülleri kullanılarak GSH seviyeleri hesaplanmıştır.

2.9.5. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddesi) Düzeylerinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, bitkilerde hücresel hasarın iyi bilinen bir mekanizması olup, hücrelerdeki ve dokulardaki oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Poli doymamış yağ asitlerinden türetilen lipid peroksitler dengesizdir ve MDA gibi reaktif karbonil bileşiklerini içeren kompleks bir dizi bileşik oluşturmak üzere ayrışır. MDA, tiyobarbitürik asit ile kontrollü bir reaksiyon vasıtasıyla nicelleştirilebilir ve TBARS üretir. Cayman firmasının TBARS kiti Yüksek sıcaklık (90-100 ° C) ve asidik koşullar altında MDA ve TBA reaksiyonu sonucu oluşan MDA-TBA addüktünün 530-540 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

2.9.6. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal çalışma sonunda verilerin istatistiksel analizleri SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Glifosat hebisitinin *G. pulex*' deki LC₅₀ değeri Probit analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı uygulama süre içinde farklı gruplar arasındaki istatistiksel fark (A, B, C, D, E, F ve kontrol) Duncan testi ile belirlenmiştir. Uygulama süreleri (24 ve 96 saat) arasındaki fark ise bağımsız t testi ile belirlenmiştir.

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

3.1. Mikrobiyal Tür Teşhis Sonuçları

16S RNA sonuçlarına göre Tunceli Elazığ Karayolu buğday ekili alandan alınan toprak örneklerinden izole edilen bakteri türlerinden biri de *B. aryabhatai* olarak belirlenmiştir ve bu bakteri biyoremediasyon çalışmasında kullanılmıştır.

3.2. Toprak Tahlili Sonuçları

Gıda Tarım ve Hayvancılık Tunceli İl Müdürlüğü Toprak Analiz Laboratuvarı'nda tarım toprağının özellikleri tespit edilmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.1' de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Çalışmada biyoremediasyon faaliyetinde ve bakteri izolasyonunda kullanılan tarım toprağının analiz sonuçları

Analiz adı	Sonuç	Derecesi	Analiz metodu/Referansı
Saturasyon %	77	Killi	TS 8333 + %10 Hava kuru
pH	7.78	Hafif alkali	Yurdakul 2018
Toplam Tuz %	0.03	Tuzsuz	TS 8334 (Çamurda)
Kireç %	26.35	Çok fazla kireçli	TS EN ISO 10693 (Modifiye)
Organik madde %	0.87	Çok az	TS 8336
Alınabilir Fosfor P ₂ O ₅ kg/da	4.18	Olsen'e göre az Kurtz'a göre az	Olsen (Konsantrasyon)TS
Alınabilir Potasyum K ₂ O kg/da	575.87	Yüksek	8341 Absorbans

Elde edilen toprak kalitesi sonuçlarına göre biyoremediasyon çalışmasında kullanılan toprak türünün saturasyon bakımında %77 ile killi; pH değeri olarak 7.8' lik bir değer ile alkali; Toplam tuz içeriği %0.03 ile tuzsuz; kireç yüzdesi bakımında %26.35' lik bir değer ile çok fazla kireçli; toprağın besin maddelerinin oranları incelendiğinde organik madde bakımından %0.87' lik bir değer ile çok az organik madde içerdiği; alınabilir fosfor miktarı göz önüne alındığında 4.18kg/da' lık az değerler alınabilir potasyum olarak da hesaplanan 575.9 kg/da' lık değer yüksek olduğu yönündedir. Bu değerler göz önünde tutulduğunda Shanahan (2004)' e göre bu toprak türü, besin maddesi takviyesiyle biyoremediasyona uygundur. Besin maddesi takviyesi de *B. aryabhatai* ile sabouraud dextrose broth besi yeri ile sisteme verilmiştir.

3.3. Biyoislah Çalışmaları Sonuçları

Tarım arazisinden izole edilen *B. aryabhatai* türü steril bir öze yardımıyla subauraud dextrose broth (SDB) ortamına alınmıştır. Tarım toprağının mikroorganizma izolasyonu için daha önceden alındığı toprak sıcaklığı 27⁰ olduğu için SDB ortamının da sıcaklığı Ttyitech marka ZHWY-2008 model çalkalayıcılı inkübatörde bu sıcaklığa ayarlanmıştır ve KOİ değerleri 24'er saat arayla takip edilerek çalışmada kullanılacak olan glifosat herbisitinin tarım arazisinde kullanılan tavsiye edilen KOİ değerine eşit olması beklenmiştir. 120 saat sonunda glifosat insektisitinin tavsiye edilen kullanım KOİ değeri olan 1400 mg/L ye ulaşınca bu zenginleştirilmiş ortamdan alınan 10, 20 ve 40' ar ml'lik kültürler pestisit içine aşılanmış ve 48' er saat arayla alınan örneklerden Standar Method (SM) 5220 kapalı Reflux yöntemiyle KOİ, SM 5210B ile SM 5310A yöntemi ile de Toplam Organik Karbon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler toplamda 13 gün sürmüştür.

Biyoremediasyon sistemi sırasıyla Toprak + Pesitit, Toprak + Pestisit + 10 ml *B. aryabhatai*, Toprak + Pestisit + 20 ml *B. aryabhatai*, Toprak + Pestisit + 40 ml *B. aryabhatai* bakteri konsorsiyumundan oluşmaktadır. Biyoremediasyon sonuçları sistem verimi ve gerçek sistem verimi olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır.

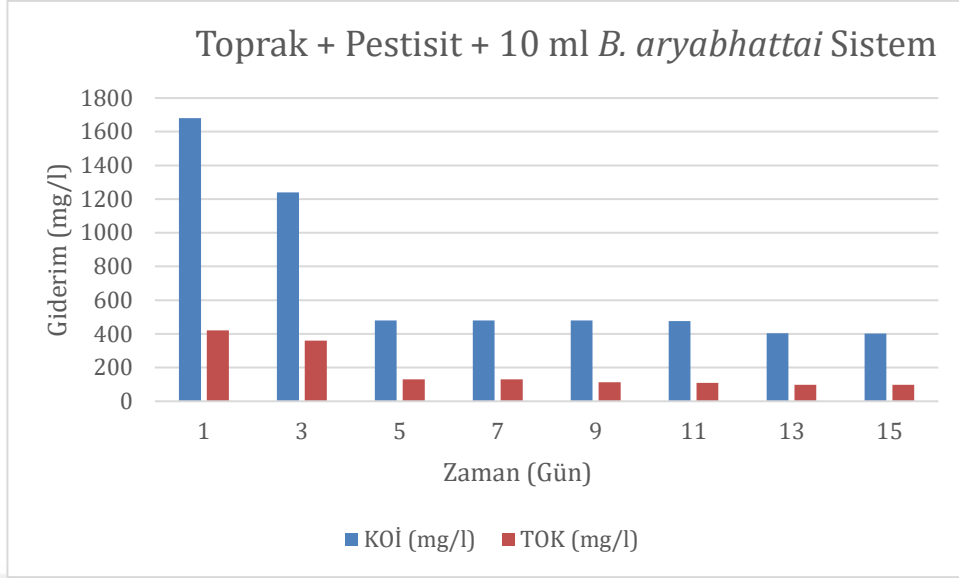
Sistemden elde edilen KOİ ve TOK parametrelerine ilişkin biyoislah deney sonuçları mg/L bazında Şekil 3.1-3.3 arasında; bu sonuçlardan elde edilen giderim verimleri ise Şekil 3.4-3.6 arasında verilmiştir. Elde edilen grafiklerde başlangıç KOİ değeri olan 1400 mg/' nin ölçülemeyiş sebebi toprağın içerisinde KOİ yükü getiren partiküllerin tutulmuş olmasıdır. Pestisit kullanılan konsantrasyonunu olan 1400 mg/L' lik KOİ ve 680 mg/L'

lik TOK değerlerinin de biyoremediasyon hesaplamalarına dahil olmasıyla elde edilen gerçek sistem biyoremediasyon grafikleri ise mg/L bazında ekil 3.7-3.9 arasında; verim bazında ise ekil 3.10-3.12 arasında verilmiştir.

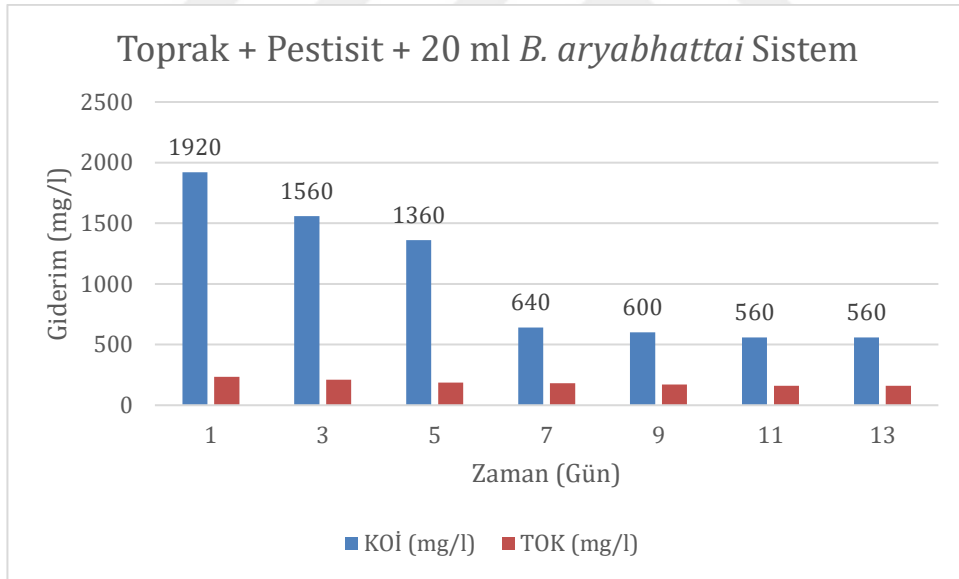
3.3.1. Sistem Verimleri

Sisteme ait KOİ giderim verimleri incelendiğinde en iyi giderim verimi 10 ml *B. aryabhatai* konsorsiyumunun toprak içinde gosterdiği giderim miktarı başlangıçta 1400 mg/l olan ancak bakteri yükünün de etkisiyle 1680 mg/l olan KOİ yükünün 404 mg/L' ye düşüşü şeklinde dir. Bu giderimin verimi %75.9 olarak bulunmuştur. TOK parametresine bakıldığında yine 10 ml miktarındaki *B. aryabhatai* bakterisi 420.8 mg/l olan TOK değerini 97.4 mg/l' ye dşrmştir ve bu da % 76.8' lik bir giderim verimi anlamına gelir (ekil 3.1 ve ekil 3.4). Sistemin diğer unsurlarının biyoremediasyon giderim verimlerine bakıldığında KOİ ve TOK parametrelerindeki giderim verimleri 20 ml' lik *B. aryabhatai* konsorsiyumunda 13. Günün sonunda sırasıyla % 70.8 ve % 31.7dir. Bu giderim veriminin anlamı da 1920 mg/L' lik KOİ değerinin 560 mg/L' ye ve 234.2 mg/L' lik başlangıç TOK değerinin de 159.9mg/L' ye düşmesi şeklinde dir (ekil 3.2 ve ekil 3.5)

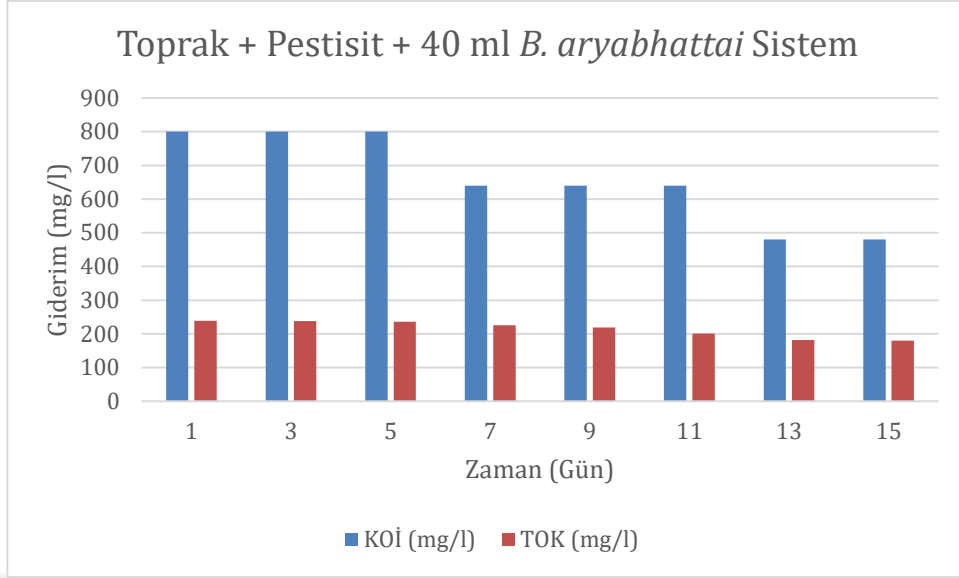
Pestisit + Toprak + 40 ml *B. aryabhatai* konsorsiyumunun biyoremediasyon süresi 15 gün srmştir. Bu süre sonucunda KOİ parametresindeki azalış 800 mg/L' den 480 mg/L' ye; TOK parametresindeki azalış ise 680' den 180.4 mg/L' ye doğrudur. KOİ ve TOK için giderim yüzdeleri ise sırasıyla %40 ve % 24.5' tir (ekil 3.3 ve ekil 3.6). Dolayısıyla gerek KOİ, gerek TOK parametrelerinde en iyi giderim verimi Toprak + Pestisit + 10 ml *B. aryabhatai* den oluşan sistemdedir. Sistemde kullanılan zenginleştirilmiş besi ortamındaki *B. aryabhatai* türü, sistemdeki KOİ ve TOK yknu besi ortamıyla birlikte arttırmakta ve bu durum da KOİ ve TOK giderim değerlerini ve dolayısıyla verimlerini de düşürmektedir (ekil 3.1 ve ekil 3.4)



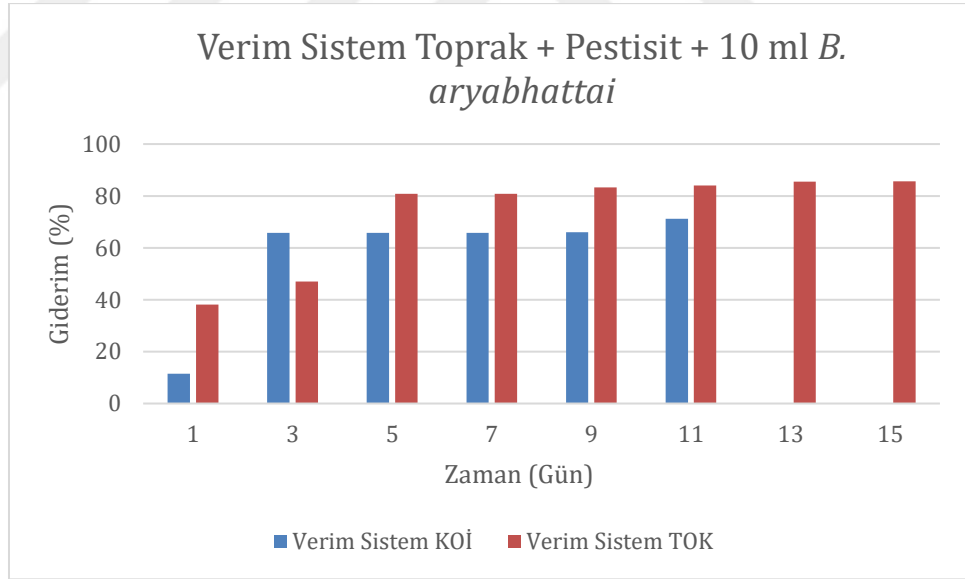
Şekil 3.1. Toprak + Glifosat + 10 ml *B. aryabhatai*' den oluşan düzenden elde edilen süzüntüye ait KOİ – TOK grafiği



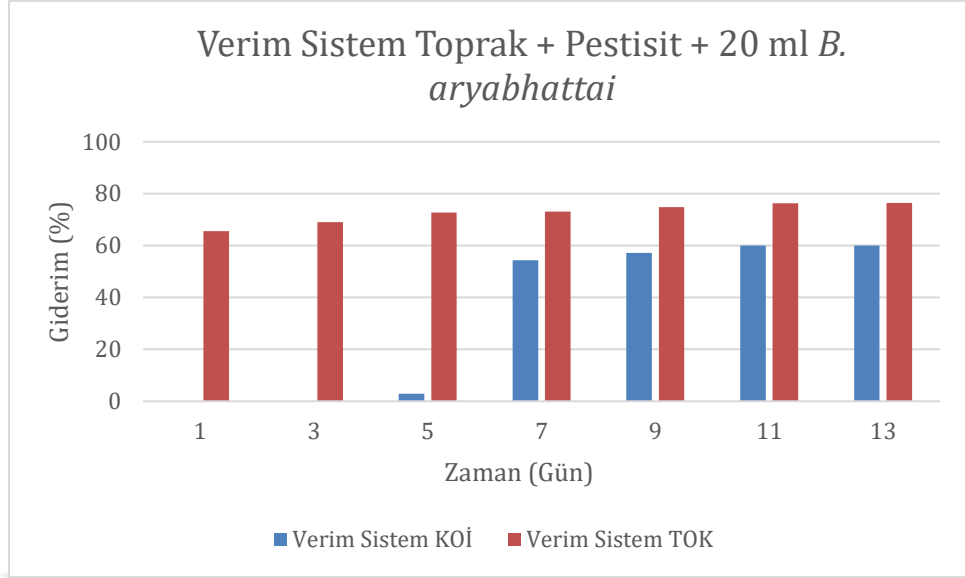
Şekil 3.2. Toprak + Glifosat + 20 ml *B. aryabhatai*' den oluşan düzenden elde edilen süzüntüye ait KOİ – TOK grafiği



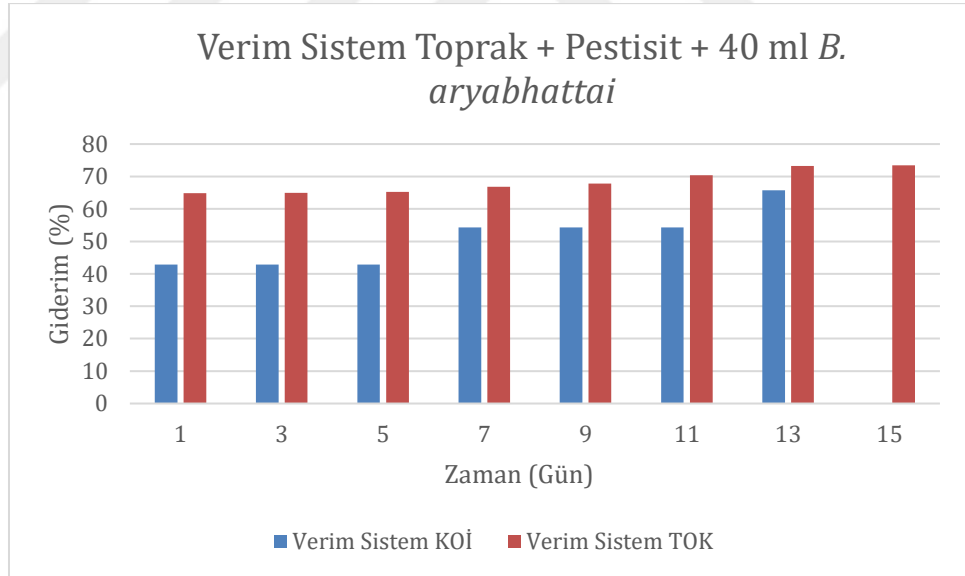
Şekil 3.3. Toprak + Glifosat + 40 ml *B. aryabhattai*’ den oluşan düzenden elde edilen süzünüye ait KOİ – TOK grafiği



Şekil 3.4. Toprak + Glifosat + 10 ml *B. aryabhattai*’ den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği



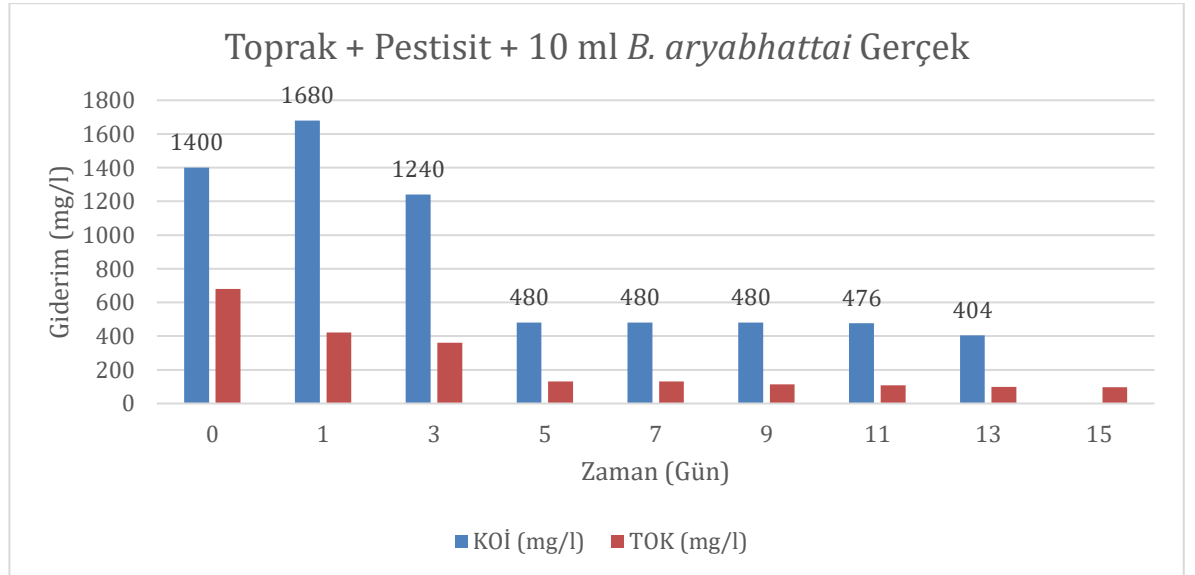
Şekil 3.5. Toprak + Glifosat + 20 ml *B. aryabhatai*’ den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği



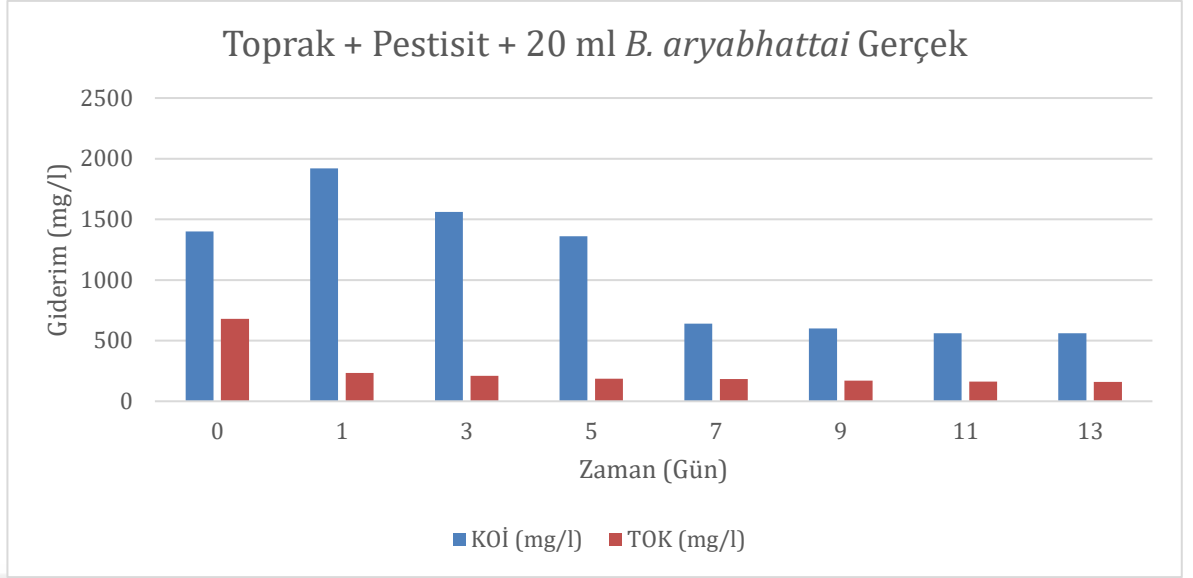
Şekil 3.6. Toprak + Glifosat + 40 ml *B. aryabhatai*’ den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında giderim verimliliği

3.3.2. Gerçek Giderim Verimleri

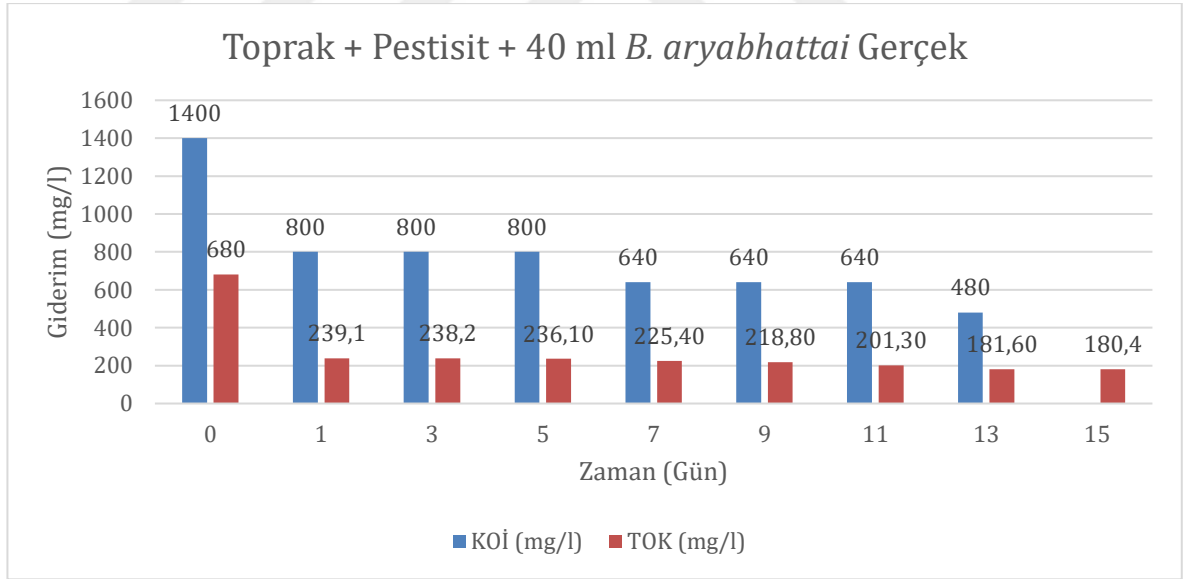
Gerçek giderim verimleri, Glifosat'ın tarım arazisinde kullanımı tavsiye edilen ve aynı zamanda oluşturulan biyoremediasyon düzeneğine lave edilen Glifosat'ın sahip olduğu 1400 mg/l KOİ ve 680 mg/l TOK değeri ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre giderim verimleri bu iki değer üzerinden hesaplanılmıştır. Bu sonuçlara göre 10 ml *B. aryabhatai* 1400 mg/l olan KOİ değerini 13 günde %71,1'lik bir giderim oranı ile 400 mg/l'ye indirirken TOK değerindeki düşüş 680 mg/l'den %85,6'lık bir verimle 97,4 mg/l seviyesindedir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.10). 20 ml *B. aryabhatai*, 1400 ve 680 mg/l'lik KOİ ve TOK parametrelerini sırasıyla %60 ve %76,5'lik giderim verimleriyle 13. Günü sonunda 560 ve 160 mg/l'ye düşürmüştür (Şekil 3.8 ve Şekil 3.11). 40 ml'lik *B. aryabhatai* bakterisinin yine aynı miktardaki KOİ ve TOK değerlerini 13. ve 15. Günlerin sonunda sırasıyla 480 ve 180 mg/l'ye %65,7 ve %73,5'lik bir giderim oranlarıyla indirebilmeyi başarmıştır (Şekil 3.9 ve Şekil 3.12). Bu sonuçlara göre her iki parametre için en iyi giderim gerçek verimi de sistem giderim veriminde olduğu gibi 10 ml'lik *B. aryabhatai* miktarındadır (Şekil 3.7 ve Şekil 3.10).



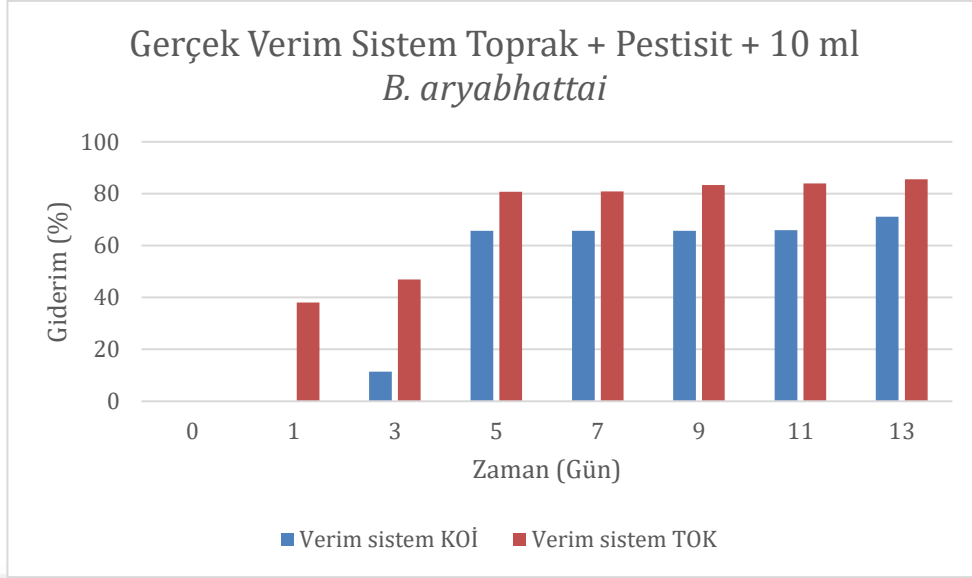
Şekil 3.7. Toprak + Glifosat + 10 ml *B. aryabhatai*'den oluşan düzenden elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği



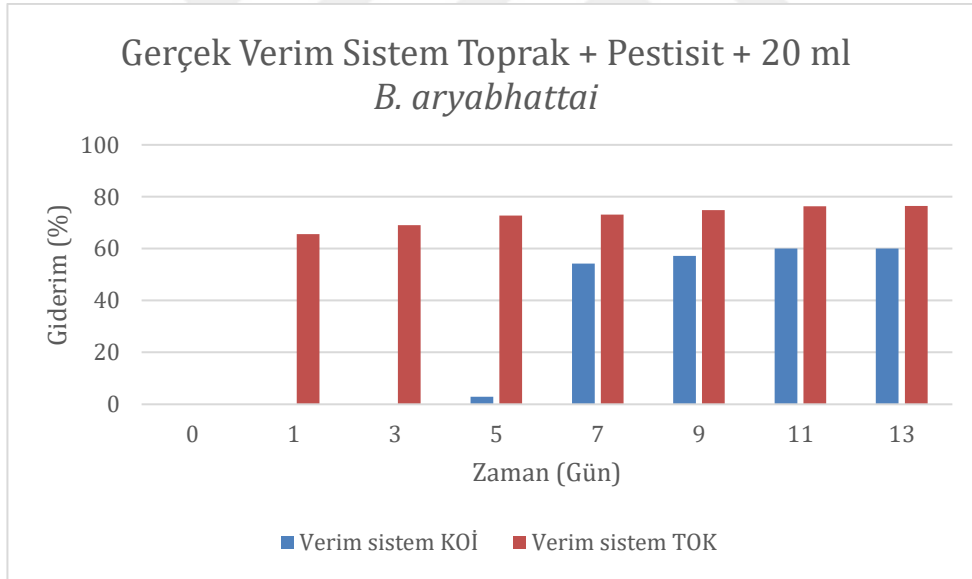
Şekil 3.8. Toprak + Glifosat + 20 ml *B. aryabhatai*’ den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği



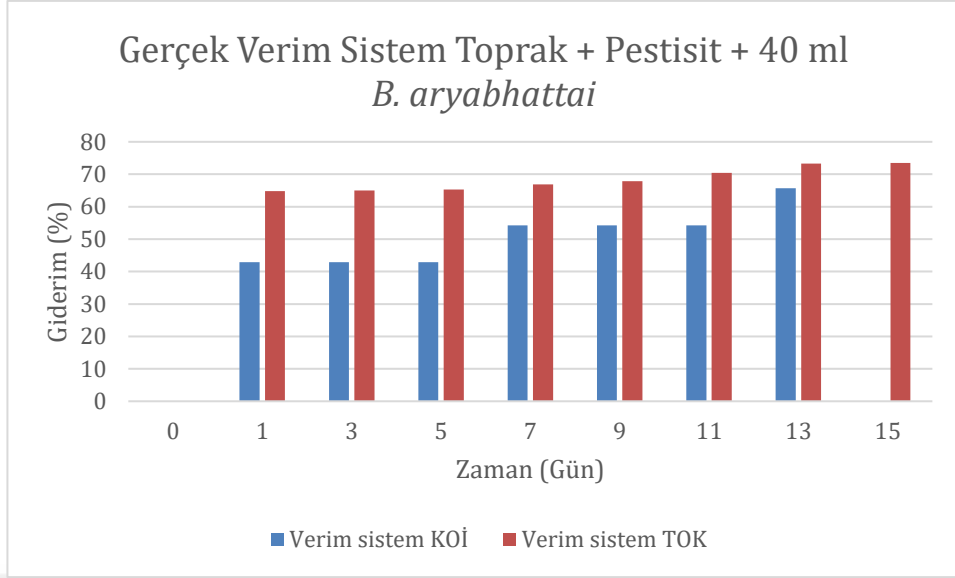
Şekil 3.9. Toprak + Glifosat + 40 ml *B. aryabhatai*’ den oluşan düzenekten elde edilen süzüntüye ait gerçek KOİ – TOK grafiği



Şekil 3.10. Toprak + Glifosat + 10 ml *B. aryabhatai*' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği



Şekil 3.11. Toprak + Glifosat + 20 ml *B. aryabhatai*' den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği



Şekil 3.12. Toprak + Glifosat + 40 ml *B. aryabhatai*’ den oluşan sistemin KOİ ve TOK bazında gerçek giderim verimliliği

Dünya çapındaki talepleri karşılamak için mahsul üretimini artırma gerekliliğine dayalı olarak herbisitlere yüksek talep vardır. Bununla birlikte, herbisit kullanımının, dirençli yabancı otları seçmesi, kısmi olarak parçalanması, toksik metabolitlerin üretilmesi, toprak mikrobiyal topluluklarında ve biyojeokimyasal döngülerde değişikliklere neden olması, bitki beslenmesinde ve toprak verimliliğinde değişikliklere yol açması ve kalıcı çevresel kirlenme olarak ortaya çıkan olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bazı herbisitler, konak metabolizmasına doğrudan müdahale ve oksidatif stres mekanizmaları yoluyla hedef olmayan mikroorganizmalara zarar verir. Bu nedenlerle, bu çevresel yükümlülüklerin azaltılması için sürdürülebilir, verimli yöntemlerin belirlenmesi gerekmektedir. (Pileggi,2020). Tarımsal ve tarım dışı alanlarda en yaygın kullanılan pestisitlerden biri de seçici olmayan, sistemik herbisit olan glifosattır ((N-fosfonometil) glisin) (Maggi ve ark., 2019). Bitkilere uygulandığında glifosat, bitki aromatik amino asit metabolizmasında yer alan bir enzim olan 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) inhibe ederek etki eder (Duke ve Powles, 2008). Glifosatın dünya çapında en yaygın uygulanan pestisitlerden biri olduğu (Benbrook, 2016;) ve arıların yiyecek ararken maruz kalabileceği göz önüne alındığında, tozlayıcılar üzerinde etkisinin olup olmadığının belirlenmesi çok önemlidir (Thompson ve ark., 2022). Biyoremediasyon yöntemleri kirleticileri uzaklaştırmak için esas

olarak mikroorganizmaların degradasyon etkisini kullanan çevre dostu, alternatif, güvenli, düşük maliyetli bir yöntemdir (Brian ve ark., 2002).

Góngora-Echeverría ve ark. (2020)' de saf suşlarda ve mikrobiyal konsorsiyumda glifosatın bozunmasını incelemişlerdir. *Pseudomonas nitroreducens*, *Ochrobactrum sp. B18* ve *Pseudomonas citronellolis ADA-23B* suşunu kullanmışlardır. Ölüm oranı sonuçlarına göre, glifosatu detoksifiye etme konusunda oldukça yetenekli olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Zhao ve ark. (2015), *Pseudomonas spp.* GA09, GA07 ve GC04 suşlarının glifosata karşı en iyi biyolojik bozunma yeterliliğini sağladığını belirlemişlerdir. Glifosat dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir herbisit olduğu için karasal ve sucul bitkileri kontrol etmek için, diğer hedef olmayan türlere karşı toksik potansiyelin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (Williams ve ark., 2000).

Toprak içerisinde bulunan pestisit kalıntılarının biyoremediasyonu toprağın su içeriği ve mikroorganizmaların faaliyet süresi ile ilgilidir (Arias-Estevez vd., 2018). Pestisitlerin biyodegradasyonu mikroorganizma aktivitelerine bağlıdır (Erguven ve Yıldırım, 2016). Araştırmacıların çoğu, bazı mikroorganizmaların pestisitlere karşı toleransı olduğunu ileri sürmüştür. Bir başka insektisit olan klorpirifozun biyoremediasyon çalışmasında *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. melitensis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescence* ve *S. marcescens* 'in bu insektisiti bir tek karbon kaynağı olarak kullandığında %46-72 oranında giderdiği görülmüştür (Lakshmi ve ark., 2008).

Bu ve benzeri çalışmalar, biyoremediasyon kullanılarak Glifosat gibi birçok insektisitinin çevre kirliliğini iyileştirmede etkili ve alternatif bir yöntem olabileceği anlamına gelir. Farklı bakteri suşlarının biyoremediasyonu, alıcı ortamlarda olumlu bir şekilde geliştirilmiştir. Bu, tarım alanlarında böcek ilaçlarının ters etkilerini azaltmak için uygun bir mikroorganizma topluluğu olduğu anlamına gelir. Pestisitlerin toksik etkilerinden tarım alanlarını iyileştirme konusunda bilgi edinmek için, pestisitlerin zıt etkisini gösterdikten sonra kontamine alanlara mikroorganizma konsorsiyumlarının kullanılması tavsiye edilir. TOK ve KOİ, herbisitlerin mikrobiyal ayrışması hakkında bize önemli fikirler sağlayan, yaygın olarak kullanılan çevresel parametrelerdir. Biyoremediasyon çalışmalarının çoğu, pestisit üreticilerinin aktif çamurlarından izole edilen bakterilerin kullanımına yöneliktir. Ancak bu araştırma çalışmasının farklı bir yönü, mikroorganizmaların tarımsal alanlardan izole edilmesi ve laboratuvar ölçekli çalışmaların ilk etapta glifosat herbisitine uyarlanmaya çalışılmasıdır. Benzer bir başka çalışma örnek verilecek olursa pestisitler üzerinde immobilize edilmiş *Candida Tropicalis* tarafından fenolün artan biyoremediasyon oranı da

sunulabilir (Başak ve ark., 2018). Bakteri suşları, biyoreaktörlerde başarılıdır çünkü biyoremediasyon adımlarına kadar aktif kalırlar (Lin ve ark., 2015). Bu çalışma, yeni izole edilmiş *B. aryabhatai* bakteri suşları ile glifosatla kirlenmiş toprak ortamlarının biyoremediasyonu ve *G. pulex* ile ölüm oranının değerlendirilmesi üzerine ilk rapordur. Uygulama gruplarında (P, B, S ve konsorsiyum) azalan TOK ve COD değerleri, yeni izole edilen *B. aryabhatai* bakterisinin aşılmasının, tasarlanan toprak biyoremediasyonunda glifosatın biyolojik bozunmasını arttırdığını göstermiştir. *G. pulex*' in ölüm değerlerinin kontrol grubuna göre azalması da bu durumu kanıtlamıştır. Bu biyoremediasyon etkinliği, çalışmamızda kullandığımız bakterilerin glifosat ile kontamine olmuş toprak ve su kaynaklarından izole edilmesinden kaynaklanıyor olabilir. Daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu çalışmada kullanılan bakteri izolatları, glifosat ile kontamine olmuş alıcı alanın biyoremediasyonu için umut verici bir araç oluşturmaktadır. Anaerobik koşullar altında kalan pestisitler, daha fazla anaerobik biyolojik bozunma için kalıcı özelliklerini kaybeden daha düşük klorlu aromatlara indirgenir, ancak aerobik koşullarda kolayca mineralleşirler (Arias-Estevez ve ark. 2008). Bakterilerin aktivitesi ile ilgili kalıcı organik bileşiklerin biyolojik bozunma süreci farklılıklara gösterebilir (Field ve ark. 1995). Boschini ve arkadaşları (2003)' e göre klorsülfuron' un *Aspergillus niger* yoluyla kimyasal bozunması 30. günün sonunda yaklaşık %30 olarak belirlenmiştir. Mohamed (2009)' da yaptığı bir biyoremediasyon çalışmasında *Stenotrophomonas maltophilia* M1 suşunun glifosat insektisitini parçalama yeteneğine sahip olduğunu savunmuştur. Ergüven ve Yıldırım (2016)' da klorsülfuron pestisitinin biyolojik bozunma oranını sadece KOİ kullanarak araştırmışlardır ve 4.5 günün sonunda *B. simplex*, *B. muralis*, *M. luteus*, *M. yunnanensis* ve *C. tetani*'nin KOİ giderim verimlerinin %70 ila %93 arasında olduğunu ortaya çıkardılar. Diğer bir biyoremediasyon çalışması Ergüven (2018) tarafından herbisit asetoklor ile ilgiliydi. Laboratuvar ölçekli bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ajite kültür ortamlarında farklı toprak mikroorganizmaları tarafından asetoklor aktif maddeli herbisit, KOİ, TOK ve BOİ₅ parametrelerinde %91 ile %50 arasında bir giderime maruz kalmıştır. Başka bir çalışmada, asetamiprid pestisiti, *Pseudomonas* FH₂'de oksidatif stresi, bozunmayan *Escherichia coli* K12 bakterisine kıyasla daha az indüklemiştir (Lu ve ark. 2004). Panda ve ark. (2018)' de yaptığı bir başka biyoremediasyon çalışmasında *Carbendazim* fungusinin *Bacillus licheniformis* tarafından uzaklaştırılma oranı %73 olarak belirlenirken; *Ralstonia* sp. (Gui-Shan ve ark. 2005) ve *Pseudomonas* sp. aynı zaman diliminde sırasıyla sadece %19 ve %33 bozunma oranı göstermiştir (Fang ve ark. 2010).

Ekinlerde, böceklerde ve bakterilerde pestisit metabolizması, etkili kullanım için pestisit geliştirme ve kontamine toprak veya su sistemleri için biyoremediasyon/biyodegradasyon yöntemleri geliştirmek için gereklidir. Pestisit biyotransformasyonu, cometabolizm veya metabolizma olarak bilinen çok adımlı stratejiler aracılığıyla gerçekleşir. Alıcı ortamlarda bulunan pestisitler, ekinlerde genellikle çeşitli metabolik süreçlerle toksik olmayan veya daha az toksik ürünlere metabolize edilir (Erguven ve Demir 2019). Erguven ve Yıldırım (2019)' da *M. radiotolerans* ve *M. artrosphaerae* suşlarını kullanarak imidacloprid iyileştirmesini inceledi. 18 gün sonra, KOİ parametresi için, Imidacloprid'in iyileştirmesi, 20, 40 ve 80 ml bakteri konsorsiyumu ile sırasıyla %52, %96 ve %99 olarak bulunmuştur. Aynı bakteri hacimlerinde BOİ5 giderim etkinlikleri %88, %79 ve %50 olarak bulunmuştur. Tatar ve ark. (2020), toprak bakterileriyle insektisit metomil iyileştirme toksisitesini inceledi. Çalışmalarına göre 8 gün sonra KOİ ve BOD5 deney sonuçları *Ochrobactrum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis* konsortianın %94,7 ve %96,8 oranında azalma sağladığını göstermiştir. *Ochrobactrum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis*, Metomil'i iyileştirebilir, bu da bu biyoremediasyonun *G. pulex*'in oksidatif stresi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu anlamına gelir. Korkmaz vd., (2021) *Bacillus aryabhatai*'nin üç izolatının (*Pseudomonas azotoformans*, *Sphingomonas pseudosanguinis* ve bunların konsorsiyumlarının) Kimyasal oksijenin indirgenmesi yoluyla araştırılan glifosat eklenmiş toprak ortamı elde edilen süzüntü sularında (KOİ) ve toplam organik karbon (TOK) parametrelerindeki değişiklikler incelenerek biyoremediasyon kapasitesi araştırılmıştır Ek olarak, süzülen sulara maruz kalan *Daphnia magna*'da mortalite testleri yapılmıştır. Sonuçlara göre 11. günün sonunda deneylerde görülen en yüksek KOİ azalma oranı *S. pseudosanguinis* olan ortamda %92.1 iken, konsorsiyum besiyerinde TOK oranı % 69.13 olarak bulunmuştur.

Durmuş vd., (2022) tarafından *Sphingomonas melonis* ve *Bacillus muralis*'in herbisit diquot dipremide-(etilen-d4) üzerinde biyoremediasyon performansını araştırılmıştır.

Bu izole edilmiş bakterilerin farklı konsantrasyonlarındaki (250, 500 ve 1000 ppm) herbisit Diquot Dipremide-(etilen-d4) (DDE4) üzerine biyolojik bozunma performansı, batık kültür koşulları altında incelenmiştir. Farklı inkübasyon dönemlerinde kültür ortamında KOİ, TOK ve BOD5 azalma oranları ile izole edilen bakterilerin biyodegradasyon performansı izlenmiştir. Sonuçlara göre; *S. melonis*, KOİ giderimi için en yüksek biyoremediasyon kapasitesine sahiptir (250 ppm'de %91). TOK için. *B. muralis* 250 ppm'de %82 ile en yüksek uzaklaştırma oranına sahiptir. Öte yandan, BOİ5 için 250 ppm %85'te *S.*

melonis en iyi uzaklaştırma performansını göstermiştir. KOİ için 250 ppm konsantrasyonlarda en etkili giderim oranı 216. saat sonunda *S. melonis* ve *B. muralis* tarafından sırasıyla %91 ve %88 olarak elde edilmiştir. Ergüven ,(2017) yaptığı çalışmada klorsülfuron herbisit çözeltilerinin biyoremediasyonu için bazı toprak mantarlarının performanslarını araştırmıştır. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ), toplam organik karbon (TOK) gibi parametrelerdeki değişimleri incelemiştir. Laboratuvar deney sonuçlarına göre *A. Alternata* bütün parametrelerde yaklaşık 5-6 günde en yüksek giderim verimine sahiptir. İlâveten *M. chlamydosporia* en düşük KOİ ve aktif madde giderim verimini göstermiştir. Diğer bir taraftan TOK giderim oranları *P. simplicissimum*, *M. chlamydosporia* ve *S. chartarum* türlerinde yaklaşık %53 olarak benzerdir. Ergüven., (2018) yaptığı başka bir çalışmada bazı toprak mantar türlerinin asetoklor aktif maddeli herbisit asetoklorun biyoremediasyon etkinliğini kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ₅) ve toplam organik karbon (TOK) parametrelerine bakarak araştırmıştır. Sonuçlar, *Tolypocladium geodes* ve *Cordyceps cicadae*'nin asetoklorun biyoremediasyonunda önemli bir KOİ, TOC ve BOD₅ azaltımı ile herbisitlerin ters etkilerini gidermek ve tarım alanlarının veya alıcı ortamların rehabilitasyonu için kullanılabileceğini göstermiştir (Ergüven, 2020)

Fluazifop-p-bütil herbisitinin bioremediasyonu araştırılmıştır. Onbeş steril cam kavanoz 2, 5, 10, 20 cm³ homojenize bakteri karışımı (10⁹ CFU/cm³) ile inoküle edildi, ardından steril tarım toprağı ve her birine 60 µg fluazifop-p-bütil (sıvı formda) eklendi. Her hafta, şişelerden boşaltılan filtrelenmiş su, fluazifop-p-bütil konsantrasyonu, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ₅) ve toplam organik karbon (TOK) açısından analiz edildi. Ek olarak, pH ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu izlendi. En yüksek biyobozunma oranı 20 cm³ kültür ortamı içeren toprak örneğinde gözlenmiştir. Bu besiyerinde fluazifop-p-butyl, COD, BOİ₅ ve TOC giderimleri %91, 83, 96 ve %86 olarak ölçülmüştür. Ergüven ve Demirci (2020) yapay tarım alanında *Ochrobacterum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis* bakterilerinin Imidacloprid insektisit üzerindeki biyoremediasyon performansını değerlendirmiştir. Yapılan izleme sonucunda *Ochrobacterum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis* türlerinin ve karışımlarının Imidacloprid pestisitini iki hafta içerisinde yok edebildiği belirlenmiştir. Her bir bakteri ve karışımları için aktif madde giderim verimleri %100 iken, *Ochrobacterum thiophenivorans* için KOİ %97 ve %96 idi ve *Sphingomonas melonis*., sırasıyla. TOC ve BOİ₅ giderim oranları her iki tip ve bunların karışımları için bir veya iki haftalık periyotta %97 olmuştur.

Ochrobacterum thiophenivorans ve *Sphingomonas melonis* karışımı KOİ, BOİ₅ parametreleri için %98,5 ve TOK parametresi için %97,5 göstermektedir. Munoz vd., (2010) kirlenmiş bir toprakta atrazin pestisitini parçalamak için iki yerli bakteri, *Pseudomonas synxantha* BS2 ve *Pseudomonas cedrella* BS4 kullanmışlardır. 20 gün sonra, atrazinin %20'den fazlası *Pseudomonas cedrella* BS4 ile aşılانmış steril toprakta ve %30'dan fazlası steril olmayan toprakta bozunduğu bulunmuştur. Mohammad ve ark. (2017)' de yaptıkları çalışmada Diazinon & malathion biyoremediasyonu, in vitro olarak topraktan izole edilmiş bakteri suşları tarafından sıvı bir ortamda yapılmıştır. Sonuçlara gör, F1, F3 ve D3 olarak adlandırılan üç izolatin, 14 gün sonra malathion için sırasıyla %35.8, %56.1 ve %29.8 ve diazinon için sırasıyla %33.6, %49.7 ve %24.5 parçalama yeteneği gösterdiği bulunmuştur. Suman vd., (2020) tarafından Pestisit *Chlorpyrifos*'un tarım topraklarından izole edilen *Staphylococcus aureus* bakterileri tarafından biyolojik bozunması incelenmiştir. Sonuç, *S. aureus*'un 12. günde 1000 ug/ml *chlorpyrifos* pestisitinin %99'unu bozabildiğini gösterilmiştir. Erguven vd., (2016) aklonifenin mikrobiyal biyobozunması sıvı ve toprak kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada tanımlanmış kültürler ve karışık konsorsiyumlar kullanılmıştır. İzole edilen mantar ve bakteri konsorsiyumu beşinci gün en yüksek degradasyon göstermiştir. KOİ giderim verimi olarak %90 ve %91 TOK giderim verimi olarak 86%, 88% and 88% olarak bulunmuştur. Bizim biyoremediasyon sonuçlarımıza göre Sisteme ait KOİ giderim verimleri incelendiğinde en iyi giderim verimi 10 ml *B. aryabhatai* konsorsiyumunun toprak içinde gösterdiği giderim miktarı başlangıçta 1400 mg/l olan ancak bakteri yükünün de etkisiyle 1680 mg/l olan KOİ yükünün 404 mg/L' ye düşüşü şeklindedir. Bu giderimin verimi %75.9 olarak bulunmuştur. TOK parametresine bakıldığında yine 10 ml miktarındaki *B. aryabhatai* bakterisi 420.8 mg/l olan TOK değerini 97.4 mg/l' ye düşürmüştür ve bu da % 76.8' lik bir giderim verimi anlamına gelir. Bu, biyoremediasyonun metomil insektisit ile çevre kirliliğini iyileştirmede etkili ve alternatif bir yöntem olabileceği anlamına gelir. Farklı bakteri suşlarının biyoremediasyonu, alıcı ortamlarda olumlu bir şekilde geliştirilmiştir. Bu, tarım alanlarında böcek ilaçlarının olumsuz etkilerini azaltmak için uygun bir mikroorganizma olduğu anlamına gelir. Pestisitlerin toksik etkilerinden tarlaları iyileştirme konusunda bilgi edinmek için, pestisitlerin olumsuz etkisini gösterdikten sonra kontamine alanlara mikroorganizma konsorsiyumlarının kullanılması tavsiye edilir. BOİ₅ ve KOİ, insektisitlerin mikrobiyal ayrışması hakkında bize önemli fikirler sağlayan, yaygın olarak kullanılan çevresel parametrelerdir. Bu çalışma ile ilgili çalışmaların çoğu, pestisit üreticilerinin aktif çamurlarından izole edilen bakterilerin kullanımına yöneliktir.

Ancak bu araştırma çalışmasının farklı bir yönü, mikroorganizmaların tarımsal alanlardan izole edilmesi ve laboratuvar ölçekli çalışmaların ilk etapta glifosat herbisitine uyarlanmaya çalışılmasıdır. Kalıcı organik kirleticiler üzerinde immobilize *Candida tropicalis* tarafından fenolün artan biyoremediasyon oranı da gösterilmiştir (Başak ve ark., 2018). Bakteri suşları, biyoreaktörlerde başarılıdır çünkü biyoremediasyon adımlarına kadar aktif kalırlar (Lin ve ark., 2015).

3.4.Biyokimyasal Parametreler

Farklı konsantrasyonlarda glifosat herbisit çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*'te AcHE, SOD, CAT enzim düzeyleri ile MDA ve GSH seviyelerindeki değişiklikler incelenmiş ve bu parametrelere ilişkin sonuçlar Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2. Farklı konsantrasyonlarda glifosat insektisit çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*'te AcHE, SOD, CAT enzim düzeyleri ile MDA ve GSH seviyelerindeki değişiklikler

Enzim türü	Numune cinsi	24. SAAT	96.SAAT
AcHE ng/L	Kontrol	7,15 ± 1,06 ^b	8,37 ± 0,24 ^{cf}
	Ham 1/16 (A)	12,15 ± 0,4 ^a	13,51 ± 0,76 ^a
	Ham 1/8(B)	8,71 ± 0,29 ^b	8,80 ± 0,49 ^{cdf}
	Ham 1/4((C)	9,53 ± 1,4 ^{ab}	10,62 ± 1,18 ^{cd}
	Arıtılmış 1/16(D)	7,06 ± 0,94 ^b	11,10 ± 0,46 ^{bc*}
	Arıtılmış 1/8(E)	9,34 ± 0,46 ^{ab}	12,85 ± 0,18 ^{ab*}
	Arıtılmış 1/4(F)	9,65 ± 1,19 ^{ab}	10,71 ± 0,69 ^{cd}
MDA nmol/mg	Kontrol	3,79 ± 0,02 ^b	3,39 ± 0,28 ^c
	Ham 1/16 (A)	7,00 ± 0,02 ^a	6,69 ± 0,10 ^b
	Ham 1/8(B)	5,87 ± 0,81 ^a	6,35 ± 0,48 ^b
	Ham 1/4(C)	6,24 ± 0,61 ^a	8,94 ± 0,01 ^{a*}
	Arıtılmış 1/16(D)	3,34 ± 0,091 ^b	5,67 ± 0,56 ^{b*}

	Aritılmış 1/8(E)	4,55 ± 0,15 ^b	5,29 ± 0,60 ^b
	Aritılmış 1/4(F)	4,16 ± 0,091 ^b	6,25 ± 0,84 ^b
GSH Mm	Kontrol	25,43 ± 0,79 ^b	24,63 ± 0,49 ^b
	Ham 1/16 (A)	19,52 ± 0,29 ^c	13,57 ± 0,16 ^{c*}
	Ham 1/8(B)	21,07 ± 0,39 ^c	13,20 ± 0,05 ^{c*}
	Ham 1/4(C)	18,53 ± 0,54 ^c	12,16 ± 0,01 ^{c*}
	Aritılmış 1/16(D)	32,68 ± 0,73 ^a	28,16 ± 3,06 ^b
	Aritılmış 1/8(E)	24,56 ± 1,47 ^b	30,36 ± 3,07 ^b
	Aritılmış 1/4(F)	34,69 ± 2,14 ^a	47,45 ± 2,37 ^{a*}
SOD u/ml	Ham 1/8(B)	1,17 ± 0,08 ^c	3,64 ± 0,16 ^{a*}
	Ham 1/4(C)	2,61 ± 0,133 ^b	3,61 ± 0,17 ^{a*}
	Aritılmış 1/16(D)	3,18 ± 0,073 ^a	1,46 ± 0,22 ^{c*}
	Aritılmış 1/8(E)	3,42 ± 0,056 ^a	2,30 ± 0,12 ^{b*}
	Aritılmış 1/4(F)	2,76 ± 0,064 ^b	2,65 ± 0,17 ^b
	Kontrol	250,39 ± 11,74 ^a	172,83 ± 5,90 ^{b*}
	Ham 1/16 (A)	76,1 ± 1,67 ^c	18,83 ± 0,61 ^{f*}
CAT nmol/min/ml	Ham 1/8(B)	24,24 ± 2,68 ^d	31,37 ± 0,77 ^{e*}
	Ham 1/4 (C)	25,67 ± 3,33 ^d	17,62 ± 1,33 ^f
	Aritılmış 1/16(D)	267,98 ± 2,53 ^a	226,49 ± 2,92 ^{a*}
	Aritılmış 1/8(E)	32,68 ± 1,22 ^d	61,78 ± 3,66 ^{d*}
	Aritılmış 1/4(F)	18,83 ± 0,61 ^d	83,49 ± 2,82 ^{c*}
	Ham 1/8(B)	1,17 ± 0,08 ^c	3,64 ± 0,16 ^{a*}
	Ham 1/4(C)	2,61 ± 0,133 ^b	3,61 ± 0,17 ^{a*}

*Üst simgedeki a, b ve c harfleri aynı saatteki farklı gruplar arasındaki ve * ise aynı grubun farklı saatleri (24. ve 96. saatler) arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir. A: LC50 Değerinin 1/16 oranında glifosat içeren artılmamış çözelti, B: LC50 Değerinin 1/8

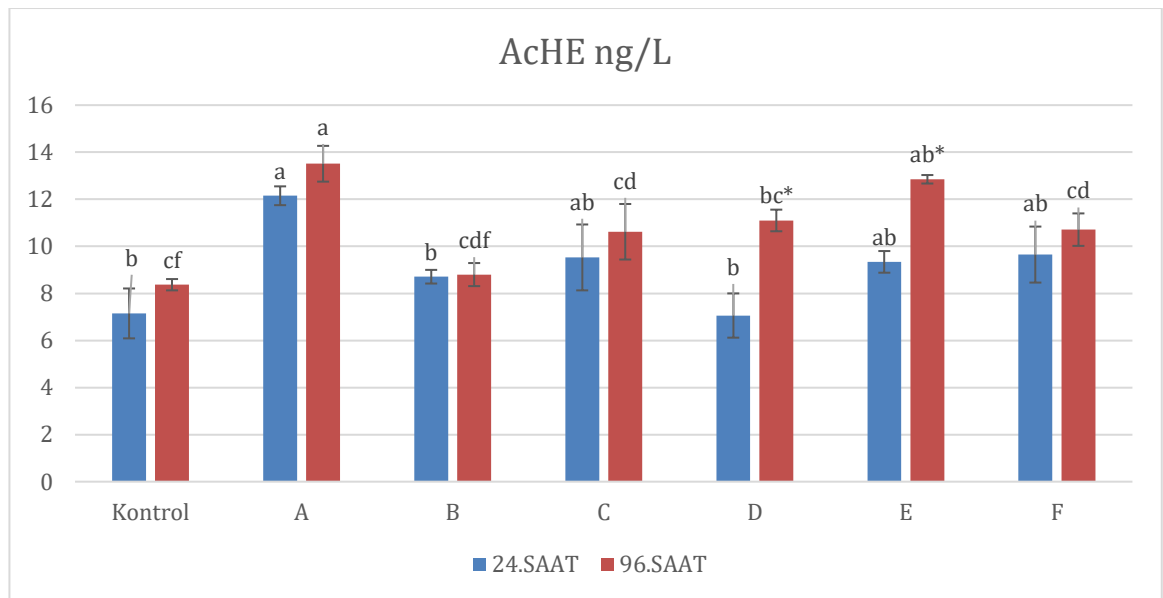
oranında glifosat içeren arıtılmamış çözelti, C: LC50 Değerinin 1/4 oranında glifosat içeren arıtılmamış çözelti, D: LC50 Değerinin 1/16 oranında glifosat içeren arıtılmış çözelti, E: LC50 Değerinin 1/8 oranında glifosat içeren arıtılmış çözelti, F: LC50 Değerinin 1/4 oranında glifosat içeren arıtılmış çözelti

3.4.1. AChE Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*’te AChE enzim düzeyleri belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.2 ve Şekil 3.11’de gösterilmiştir. AChE düzeylerinin kontrol ile kıyaslandığında 24. saatte glifosat uygulamasına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında glifosat uygulamasına bağlı olarak 96.saatte önemli bir artış saptanmıştır ($p<0,05$).

Arıtım öncesi ve sonrası enzim düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte enzim düzeylerinin azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatte ise; D grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu ancak E ve F gruplarında artış bulunmuştur ($p<0,05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; D ile E gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.13).



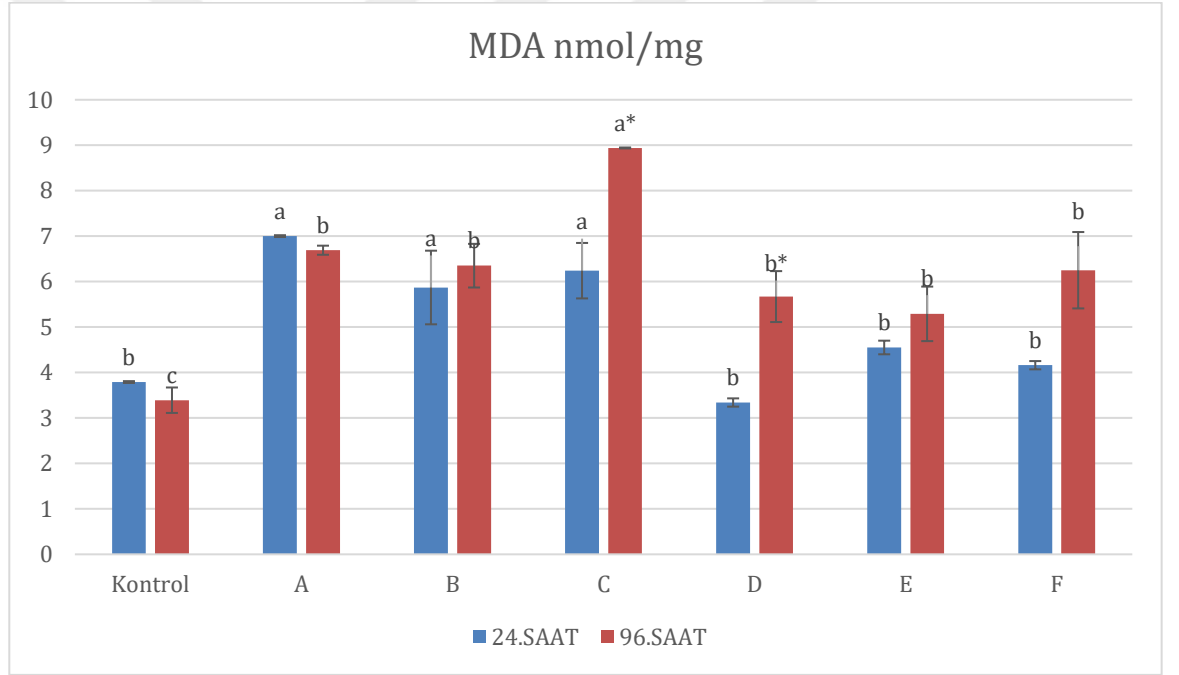
Şekil 3.13. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*’te AChE(ng/L) enzim düzeyleri

3.4.2. MDA Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*’te MDA düzeyleri belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir. MDA düzeylerinin kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda glifosat uygulanan gruplarda hem 24. saatte hem de 96. saatin sonunda arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Arıtım öncesi ve sonrası MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte ve 96. saatte MDA düzeylerinin azaldığı görülmüştür ($p<0,05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; C ile D gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*’te MDA (nmol/mg) düzeyleri

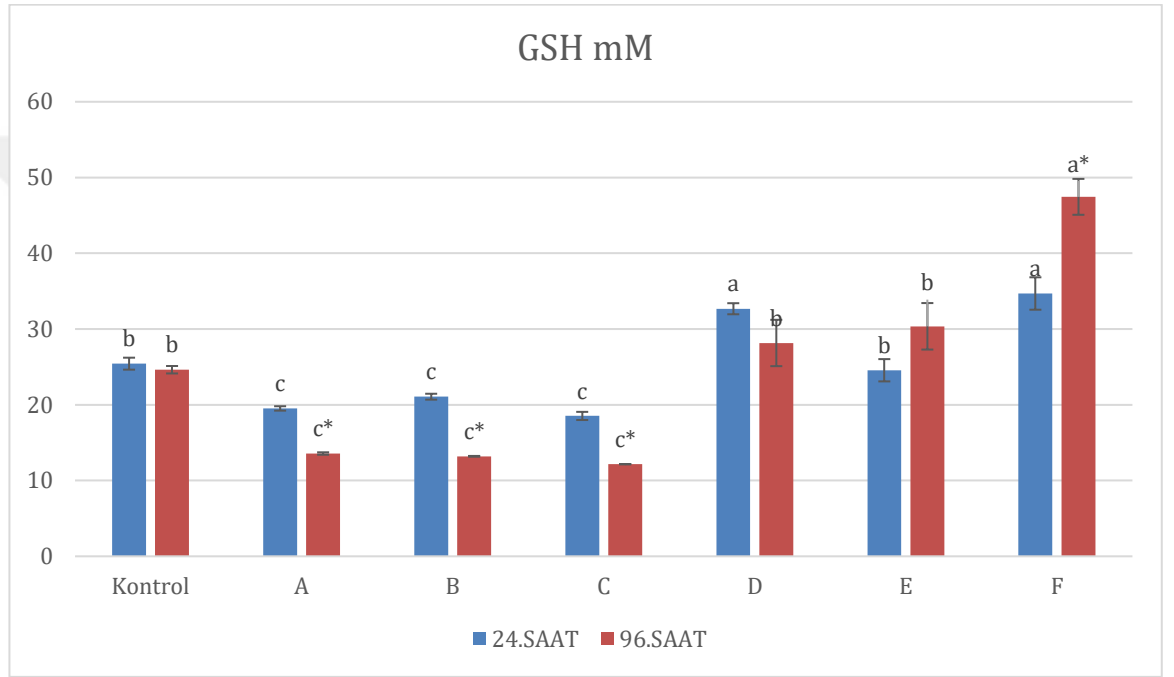
3.4.3. GSH Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*’te GSH enzim düzeyleri belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.2 ve Şekil 3.13’de gösterilmiştir. GSH düzeylerinin kontrol ile kıyaslandığında 24.saatte glifosat uygulamasına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Yine kontrol grubu ile

kıyaslandığında glifosat uygulamasına bağılı olarak 96.saatte önemli bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$).

Arıtım öncesi ve sonrası GSH düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte enzim düzeylerinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatte ise; yine istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; B, C ve D gruplarında ile F grubunda istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.15).



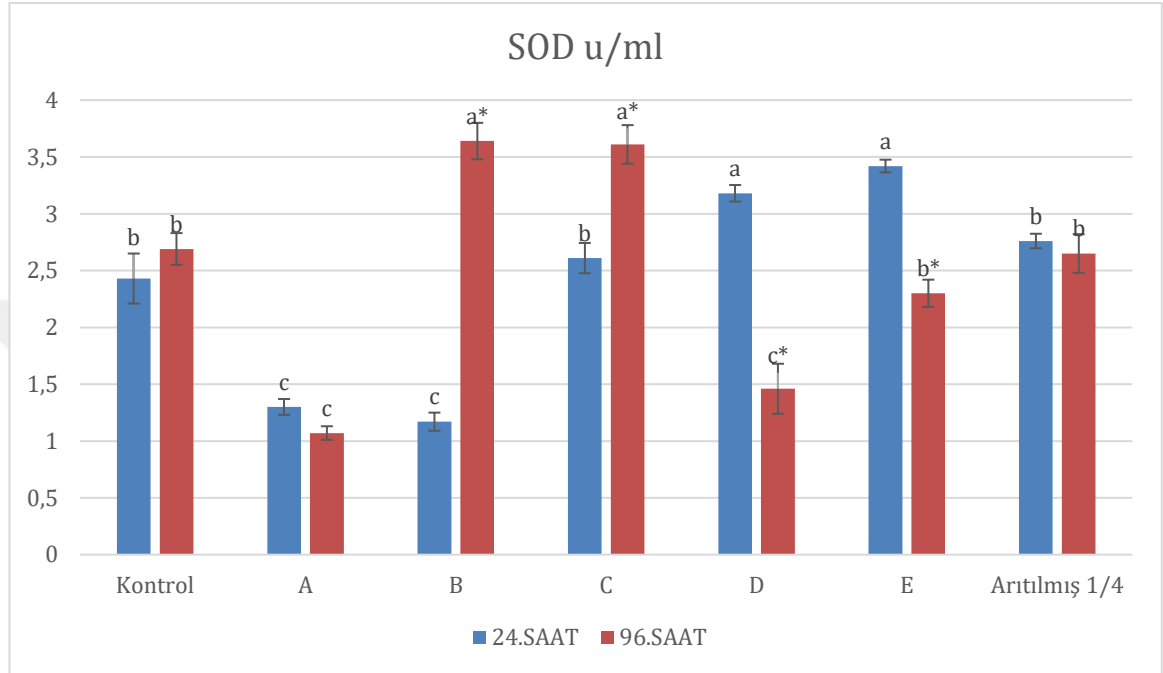
Şekil 3.15. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex* 'te GSH (mM) düzeyleri

3.4.4. SOD Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex* 'te . SOD enzim aktivitelerinin belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 ve Şekil 3.14'de gösterilmiştir. SOD enzim aktivitelerinin kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda glifosat uygulanan gruplarda hem 24. saatin sonunda A ve B gruplarında azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). 96. saatin sonunda ise; A grubunda azalma saptanmıştır($p<0,05$).

Arıtım öncesi ve sonrası SOD enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte SOD enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). 96. saatin sonunda ise arıtım sonrası D grubunda artmış, E ve F gruplarında ise azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; B, C, D ve E gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.16).



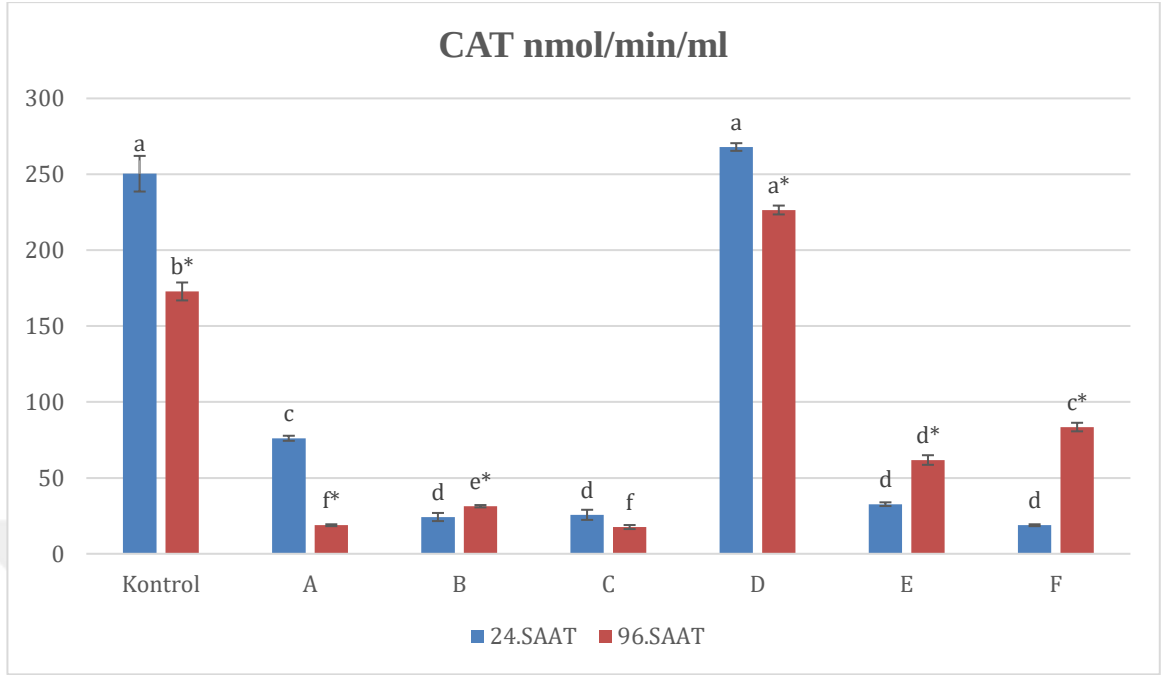
Şekil 3.16. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*'te SOD (U/mL) enzim aktiviteleri

3.4.5. CAT Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex*'te CAT enzim aktiviteleri belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 ve Şekil 3.15'de gösterilmiştir. CAT enzim aktivitelerinin kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda glifosat uygulanan gruplarda hem 24. saatin sonunda hem de 96. Saatin sonunda düşmüştür ($p<0,05$).

Arıtım öncesi ve sonrası CAT enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte CAT enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatin sonunda ise arttığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; kontrol, A, B, D, E ve F gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur (Tablo 3.2, Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Farklı konsantrasyonlarda glifosat çözeltisine arıtım öncesi ve sonrası maruz kalan *G. pulex* 'te CAT (nmol/min/mL) enzim aktiviteleri

Her ne kadar pestisitlerin mikrobiyal bozunması her zaman detoksifikasyona yol açmasada çoğu durumda ürünler çok daha az tehlikeli ve/veya daha fazla bozulmaya duyarlı hale gelmektedir. Organofosfatlı ve karbamatlı pestisitlerin toksik etkileri kimyasalların bir nörotransmitter olan asetilkolinesterazı düzenleyen enzimi bozduğu yer olan sinir sisteminde meydana gelmektedir (Encyclopedia of Pest Management, 2002). Antioksidan savunma, SOD, CAT ve enzimatik olmayan sistemler GSH gibi enzimleri içermektedir. Çevresel kirleticilere yüksek duyarlı olmaları nedeniyle, GSH ksenobiyotiklere maruz kalmanın toksik etkilerinin belirteçleri olarak kullanılmıştır. (Manno ve ark., 1985). MDA, Lipit peroksidasyonunun radikal zincir reaksiyonu gibi görünmektedir ve temel hücre fonksiyonlarını değiştirebilir ve hücrede ölüme yol açabilmektedir. SOD, bir organizmanın hücrelerini serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresten koruyabilir; süperoksit anyonunu O_2 'ye katalize edebilir ve daha sonra H_2O_2 , H_2O 'ya katalize edilir (Oruç vd., 2000). CAT hidrojen peroksiti O_2 ve H_2O 'ya dönüştürerek hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif stresini azaltır (Meng vd., 2014). Antioksidan enzimler kirleticilere karşı duyarlıdır ve hızlı bir şekilde indüklenebilir; dolayısıyla, onlar diğer toksisite parametreleriyle karşılaştırıldığında çevresel zararın nispeten hassas göstergeleridir. Antioksidan enzimler

CAT, SOD ve enzimatik olmayan antioksidanlar indirgenmiş GSH toksik maddelerin neden olduğu kronik hasarın ve zararlı etkilerinin erken tespiti için biyobelirteçler olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Guo.,2006).

Meng vd., 2021.2, 20, 200 μgL^{-1} metomile maruz kalan *Oreochromis niloticus*'larda oksidatif stresin meydana geldiği görülmüştür. GSH seviyelerinin önemli ölçüde düştüğü, CAT ve SOD aktivitelerinin 2 μgL^{-1} gibi düşük konsantrasyonda metomile maruz kalma sonucu arttığı 200 μgL^{-1} metomile maruziyet sonrası ise düştüğü tespit edilmiştir. Mansour vd., (2009) yaptıkları çalışmada Metomilin sıçan eritrositlerinde lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, metomilin AChE, SOD ve GST aktivitelerini azalttığını ve hemoliz yüzdesinin yanı sıra lipid peroksidasyon (LPO) seviyesini arttırdığını göstermiştir. Antioksidan yanıt, konsantrasyona bağlı bir şekilde meydana gelmiştir. Metomile maruz kalma SOD, CAT, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) ve GSH içeriği aktiviteleri açısından hepatik hücrelerin antioksidan kapasitesi azalmıştır (El-Khawaga vd.,2005). Aslantürk vd., (2021) yaptıkları çalışmada Metomil, kan üre nitrojeni, kreatinin, ürik asit ve MDA düzeylerinin konsantrasyonlarında artışa neden olmuştur. Ayrıca metomil, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S transferaz aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Jing vd., (2022) yaptıkları çalışmada 200 $\mu\text{g/L}$ metomil uygulamasına bağlı olarak SOD, CAT aktiviteleri ile GSH seviyeleri önemli düzeyde azalırken 2 $\mu\text{g/L}$ dozunda uzun süreli uygulama sonucunda ise; özellikle de GSH düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Eklem bacaklıların zehirli kimyasallara karşı balık, kuş ve memeliler gibi diğer canlı organizmalara göre daha duyarlı oldukları da bilinmektedir. Bu durum artan sodyum duyarlılığı, vücut boyutlarının küçülmesi ve metabolizma farklılığı ve metabolik hızın düşmesi ile artan risk ile ilişkilidir (Maund ve ark. 2011). Khawaga ve ark. (2012) tarafında yapılan çalışmada metomil uygulaması yapılan farelerin karaciğerinde artan oksidatif stres ve hücresel hasar, karaciğerde artan LDH aktivitesi ile birlikte azalan GSH içeriği ve ayrıca antioksidan enzimlerin aktivitelerinin baskılanması gibi etkilerle sonuçlanmıştır. Habotta vd., (2022) yaptıkları çalışmadan elde ettiği verilere göre kontrollerle karşılaştırıldığında, metomile maruz kalan balıkların beyinlerinde yüksek MDA ve düşük SOD, CAT aktivitelerine ve GSH seviyelerine rastlamıştır. Metomil uygulamasına bağlı olarak beyin ve kasta GABA ve asetilkolin esterase seviyelerinde kayda değer düşüşler de gözlenmiştir. El Demerdash vd., (2015) yaptıkları çalışmada metomilin farklı zaman aralıklarında lipid peroksidasyonu, indirgenmiş GSH, total sülfidril grubu (T-SH), SOD, CAT, Glutatyon S-transferaz gibi

antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Metomile maruz kalmanın zamana bağlı olarak böbrek hasarına, oksidatif strese, antioksidan savunma sisteminde bozulmalara ve fare böbreğinde histopatolojik değişikliklere neden olmuştur. Metomile maruz kalan sıçanların GSH içeriğinde önemli bir düşüş bulunmuştur. Ayrıca metomilin SOD ve CAT aktivitesinde indüklenmeye neden olduğu görülmüştür (Garg vd., (2009). Yaptıkları çalışmada metomile maruz kalan ratların eritrositlerinde lipid peroksidasyon ve SOD aktivitelerinde önemli bir artış gözlenirken, GSH seviyeleri ve katalaz aktiviteleri, Glutasyon-S-transferaz (GST) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. (Capkin vd.,2014) uzun süreli karbosülfana maruz kalmanın Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrosit ve karaciğer AChE aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Enzim ihibisyon derecesinin maruz kalma süresi ile pozitif korelasyon gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada, MDA düzeylerinin kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda metomil uygulanan gruplarda hem 24. hem de 96. saatin sonunda arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Membran lipitlerine serbest radikal aracılı saldırı ile oluşan LPO ürünleri, oksijen varlığında LPO işlemlerinin otokatalitik reaksiyon zincirini yayabilir ve muhtemelen membran yıkımına yol açabilir (Mansour vd., 2009). Metomile maruz kalma membran lipidlerinin peroksidasyonunu artırarak oksidatif hasarın ilerlemesine neden olmaktadır (Banerjee et al., 1999). GSH düzeyleri ile CAT enzim aktivitesi kontrol ile kıyaslandığında 24. ve 96. Saatte metomil uygulamasına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Lipit peroksidasyonundaki artışın tükenmiş GSH depolarının bir sonucu olduğu bilinmektedir (Özden ve ark., 2009). GSH seviyelerindeki azalma GST tarafından katalizlenen metomil ile GSH'nin konjugasyonu nedeniyle (Luo vd.,2006). Ayrıca GP_x tarafından GSH GGSG'ye oksidasyonunu katalize edilerek Ros'lar süpürebilir. Bu da GSH seviyelerinde azalmaya neden olabilir (Oruc vd., 2004). Ayrıca metomile maruz kalmanın neden olduğu stres durumu sırasında adaptif mekanizmaların kaybı ve GSH sentezindeki hasarlar meydana gelmesi GSH içeriğindeki düşüşlerin diğer nedenleri olabilir (Liv d., 2010). SOD enzim aktivitelerinin kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda metomil uygulanan gruplarda hem 24. saatin sonunda A ve B gruplarında azaldığını 96. saatin sonunda ise sadece A grubunda azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). SOD-CAT sistemi oksidatif strese karşı ilk savunma hattını temsil ettiğinden CAT ve SOD aktivitesindeki değişiklikler genellikle çevresel kirleticilere maruziyet sonrası oksidatif stresin meydana geldiği ve stresin üstesinden gelebilmek için organizmanın bir mücadelesinin olduğunun göstergesidir. Çalışmamızda SOD 'daki değişiklikler metomile

yanıt olarak oluşan önemli bir serbest radikal olan süperoksit anyonu doğrudan bir cevap olarak kabul edilebilir (Misra vd., 2009). CAT hidrojen peroksiti oksijen ve suya katalizlemektedir. CAT enzimidaki değişiklikler metomile maruz kalma yoluyla artan hidrojen peroksitin oluşturduğu oksidatif stresi azalmak amaçlı olduğu düşünülmektedir (Meng vd., 2014).

Organofosforlu klorpirifos (CPE) ve karbamat metomil (MT)'un *G. fossarum*'da organizma düzeyinde, özellikle hem beslenme hem de lokomotor davranışlar üzerindeki tepkisi araştırılmış ve sonuçlar, yaklaşık %65' lik AChE inhibisyon seviyelerinin kısa vadede ölüme yol açmadığını göstermiştir. Ayrıca, AChE inhibisyonunun hem beslenme hem de lokomotor davranışların bozulmasına neden olduğu da gösterilmiştir (Xuerep vd., 2009). Hernández-Moreno vd., (2014) karaciğer katalaz aktivitesi kontrollere kıyasla maruz kalan balıklarda biraz artmıştır. Solungaçlarında CAT aktivitesinde değişiklik bulunmamıştır. Beyin AChE aktivitesi kontrollere kıyasla 96 saatlik maruziyetten sonra önemli ölçüde azalmıştır. Yaygın olarak kullanılan pestisitler; karbofuran, diuron ve nikosülfurone maruz kalan *Carassius auratus*'de AChE aktivitesi ölçülmüştür. (5, 50 ve 500 lg/L) dozlarında 6, 12, 24 ve 48 saat uygulama yapılmıştır. Beyinde, AChE aktivitesi tüm maruz kalma dönemleri boyunca önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Golombieski vd. (2008)' de yaptıkları çalışmada kocabaşlı sazani (*Aristichthys nobilis*, Richardson, 1845), Güney Brezilya'da pirinç ekimi sırasında yaygın olarak kullanılan bir insektisit olan diafuran'a maruz bırakmışlardır. Diafuranın beyinde (~%38) ve kaslarda (~%50) oranında AChE aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. (Martins-Gomes vd., 2022). Tarafından yapılan çalışmada dört farklı pestisit nörötoksik potansiyeli araştırılmıştır. Glifosat (herbisit), imazalil (fungisit), imidacloprid (neonicotinoid insektisit) ve lambda-sihalotrin (piretroid) insektisit doğrudan in vitro enzimatik inhibisyon yöntemleri kullanılarak AChE, butirilkolinesteraz (BChE) ve tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerini değerlendirilmiştir. Tüm pestisit uygulamaları doz bağlı olarak enzimi inhibe etmişlerdir. En düşük nörötoksik özellik düşük asetilkolin inhibisyon oranı ile Glifosat uygulaması sonucu görülmüştür. (Sarkar vd., 2022). Çeşitli fosforotioatların (Etil parathion ve Chlorpyrifos) ve fosfatların (DDVP, Monocrotophos ve Phosphamidon) Goa sahilinden avlanan Deniz Uskumru balığı (*Rastrelliger kanagurta*) AChE üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Beş organofosforlu pestisit arasında inhibe edici potansiyellerine bakılarak DDVP'nin en zehirli pestisit olduğu, ardından *Chlorpyrifos*, *Ethyl Parathion*, *Monocrotophos* ve *Phosphamidon* geldiği bulunmuştur. İn-vitro çalışmalarda Uskumru balığında kas AChE

inhibisyonun çevrede nörotoksik kirleticilerin için bir erken uyarı sinyali sağladığı ve AChE inhibisyonun, biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Farrukh vd., 2017). *E. foetida* 'da asetilkolinesteraz ve selülaz gibi iki önemli enzim üzerindeki kronik etkilerini ortaya çıkarmak için bir çalışma yapılmıştır. AChE aktivitesinin inhibisyonunun konsantrasyon bağımlı olduğu bulunmuştur. (Al-Ghanim vd., 2014). Diazinon fosforotiyoatonun etkisini incelemek tatlı su sazanlarında (*Cyprinus carpio* L.) AChE ve lipid peroksidasyon (LPO) seviyeleri belirlenmiştir. Asetilkolinesteraz doza bağımlı bir yanıt oluşturmuştur. LPO ve AChE'nin su ekosistemlerinde su kirliliğinin bir göstergesi olarak değerli biyobelirteçler olduğu gösterilmiştir (Khan vd., 2003). Sipermetrin ve permetrinin farklı konsantrasyonlarının (%0,1 ve %1) *Rana tigrina*'nın böbrek ve karaciğerinde kolinesteraz aktivitesi ve protein içeriklerini azalttığı gözlenmiştir. Bizim sonuçlarımıza göre, AChE düzeylerinin kontrol ile kıyaslandığında 24. ve 96.saatte glifosat uygulamasına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Arıtım öncesi ve sonrası enzim düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24.saatte enzim düzeylerinin azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatte ise; D grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu ancak E ve F gruplarında artış bulunmuştur ($p<0,05$). AChE, tiyole bağımlı olmayan bir enzimdir (Soszynski ve diğerleri, 1996). AChE'nin membran yüzeyinde lokalizasyon onu dış ortamda oluşan (OH) radikallerine kolayca erişilebilir yapmaktadır ve enzimde yapısal değişiklikleri tetikleyebilmektedir. AChE aktivitesindeki değişikliklerin glifosat enzime doğrudan bağlanmasına, zar tabakasının elektrik yükündeki değişiklik meydana gelmesine, ROS artışına ve zararın modifikasyona uğramasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Bukowska and Hutnik, 2006). Sonuçlarımızın glifosat uygulamasının toksik etkiye neden olduğu ve AChE uygun bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Ergüven vd., 2022). *Sphingomonas melonis*'in metomil ile kirlenmiş toprak ortamı için biyoremediasyon kapasitesi incelenmiştir. *Dreissena polymorpha*'daki oksidatif stres ile nörotoksik yanıt incelenerek biyoremediasyon verimi yorumlanmıştır. GSH, MDA seviyeleri ve CAT, SOD, AChE aktiviteleri biyoremediasyon öncesi ve sonrası belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Metomil'in *S. Melonis* ile etkin bir şekilde iyileştirebileceği ve CAT, AChE aktiviteleri ile GSH, TBARS seviyelerindeki değişikliklerin biyoremediasyon kapasitesini değerlendirmek için faydalı birer biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. (Ergüven vd., 2020). Tarafından yapılan başka bir çalışmada bazı biyokimyasal biyobelirteçlerin yanıtı kullanılarak *Methylobacterium radiotolerans* ve *Microbacterium artrosphaerae* tarafından klorpirifos-etil iyileştirme etkinliğinin

değerlendirilmiştir. Çalışmada *Gammarus pulex*'de biyoremediasyona öncesi ve sonrası detoksifiye edici ve antioksidan enzim tepkisi araştırılmıştır. Klorpirifos-etil'e bağlı olarak katalaz enziminin aktivitesi biyoremediasyon öncesi azalmış ve sonrasında enzim aktivitesi artmıştır. Klorpirifos-etil maruziyetinin 96. Saatinin sonunda SOD aktivitesi artmıştır. Biyoremediasyonun ardından, SOD enzim aktivitesi 24 saat sonra tekrar azalmış ancak 96. Saatin sonunda artmıştır. (Tatar vd., 2020). Yaptıkları çalışmada *G. Pulex*'te CAT, GST, CYP1A1 enzim aktivitelerindeki değişiklikler metomil maruziyeti sonrası ve *Ochrobactrum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis* tarafından biyoremediasyondan sonrası araştırılmıştır. Tüm maruz kalma süresinden sonra metomile maruz bırakılan *Gammarus pulex*'te CAT enzimi aktivitesinin azaldığı ancak biyoremediasyon deneylerinden sonra CAT aktiviteleri kontrol sonuçlarına döndüğü görülmüştür. *G. pulex*'teki CYP1A1, CAT ve GST sonuçları *Ochrobactrum thiophenivorans* ve *Sphingomonas melonis*'in metomili etkin bir şekilde iyileştirdiğini göstermiştir. Bizim sonuçlarımıza göre arıtım öncesi ve sonrası MDA düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24. ve 96. saatte MDA düzeylerinin azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım öncesi ve sonrası GSH düzeyleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24. saatte enzim düzeylerinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatte ise; yine istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım öncesi ve sonrası SOD enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24. saatte SOD enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). 96. saatin sonunda ise arıtım sonrası D grubunda artmış, E ve F gruplarında ise azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Arıtım öncesi ve sonrası CAT enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası 24. saatte CAT enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Arıtım sonrası 96. saatin sonunda ise arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). Arıtım öncesi ve sonrası SOD ve KAT enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise; arıtım sonrası enzim aktivitelerinin tekrar arttığının bulunması biyoremediasyon yönteminin etkinliğinin bir göstergesidir.

Bu çalışma, *Bacillus aryabhatai* tarafından glifosat herbisiti içeren sentetik çözeltilerin biyoremediasyon yöntemi ile arıtılması sağlanmış daha sonra arıtım öncesi ve sonrası model canlı *G. pulex*'ideki biyokimyasal değişimler belirlenerek biyoremediasyon verimi değerlendirilmiştir.

İlk aşamada yapılan biyoslah deneylerinde Biyoremediasyon sistemi sırasıyla Toprak + Pesitit, Toprak + Pestisit + 10 ml *B. aryabhatai*, Toprak + Pestisit + 20 ml *B. aryabhatai*, Toprak + Pestisit + 40 ml *B. aryabhatai* bakteri konsorsiyumundan oluşmaktadır. Biyoremediasyon sonuçları sistem verimi ve gerçek sistem verimi olmak

üzere iki aşamadan oluşmaktadır.

Sisteme ait KOİ ve TOK giderim verimleri incelendiğinde en iyi giderim verimi 10 ml *B. aryabhatai* konsorsiyumunun toprak içinde bulunmuştur. Bu giderimin verimi KOİ için; %75,9 olarak bulunmuştur. TOK parametresine bakıldığında %76,8' lik bir giderim verimi bulunmuştur. Çalışmanın sonuçlarına göre, glifosat herbisitinin *B. aryabhatai* tarafından etkili bir şekilde giderilebileceği gösterilmiştir.

İkinci aşamada ise biyokimyasal yanıtı araştırmak için arıtılmış ve arıtılmamış sentetik glifosat çözeltilerine *G. pulex* 'ler 24 ve 96 saat maruz bırakılmıştır.

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; MDA düzeyleri ile AcHe kontrol ile kıyaslandığında üç farklı subletal dozda glifosat uygulanan gruplarda hem 24. hem de 96. saatin sonunda arttığı, GSH düzeyleri ile SOD, CAT enzim aktivitesi azaldığı gözlenmiştir.

4. ÖNERİLER

Kapsamlı biyobozunma kapasitelerine sahip mikroorganizmaları kullanan teknolojiler hem kirliliğin önlenmesinde hem de saha iyileştirmede kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Biyoremediasyon, çevreden kirleticilerin uzaklaştırılması için canlı organizmaları, özellikle mikroorganizmaları kullanan teknoloji, uygulanabilecek çeşitli teknolojilerden biridir. Biyoremediasyonun etkili olabilmesi için kirleticinin mikrobiyal saldırıya veya mikrobiyal transformasyona maruz kalması, metabolik ürünün güvenli olması ve prosesin olumsuz ekolojik yan etkilere neden olmaması gerekir. Çevresel koşullar, biyoreaktörlerde ex situ biyolojik olarak parçalanabilmesi için kirleticiyi biyoremediasyon veya dönüştürme yeteneğine sahip mikroorganizmanın yerinde büyümesine izin vermelidir. Etkili bir yerel suş seçerek veya optimize edilmiş çevresel koşullarla birlikte mikroorganizmaları parçalayan rekombinant bir pestisit geliştirerek, biyoremediasyon, çevresel kaliteyi eski haline getirmek için uygun maliyetli ve daha çevre dostu bir yaklaşım haline gelir. Pek çok durumda, özellikle günümüzde mahsul verimliliğini artırmak için yaygın olarak kullanılan pestisitler için, biyoremediasyon tehlikeli kirleticileri biyolojik olarak parçalayabilir, detoksifiye edebilir veya hareketsiz hale getirebilir ve çevre temizliği için yaygın olarak kullanılan bir teknoloji haline gelmektedir. Ayrıca, entegre haşere yönetimi sistemi (IPM) kapsamında sentetik kimyasal pestisitlerin (kısmen veya tamamen) yerini alan biyolojik kontrol ajanlarının kullanılmasının çevre kirliliğini en aza indirmede daha yararlı olduğu görülmektedir.

Arıtım öncesi ve sonrası kıyaslandığında arıtım sonrası enzim değerlerinin tekrar normal seviyelere ulaştığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre SOD, CAT, AChE, MDA ve GSH biyobelirteçlerinin arıtım veriminin değerlendirilmesinde etkin birer biyobelirteç oldukları bulunmuştur.

Gammarus pulex'in ise; uygun bir model canlı olduğu kanıtlanmıştır.

Çalışma sonucunda şu öneriler sıralanabilir:

- Daha sonra yapılacak farklı çalışmalarda farklı pestisit gruplarının biyoremediasyon verimi değerlendirilebilir
- Farklı mikroorganizmaların biyoremediasyon çalışmalarındaki etkinliği araştırılabilir.
- Farklı mikroorganizmaların kombine etkileri çalışılabilir

- Bu çalışmada kullanılan model canlı olan *G. pulex*'in yerine başka model canlılar kullanılarak biyoremediasyon verimi değerlendirilebilir
- Antioksidan parametrelerin yanı sıra immün yanıt veya farklı toksisite testleri kullanılarak arıtım etkinliği değerlendirilebilir.



5. KAYNAKÇA

- Abdelhaleem, H.A.R., Zeinb, H.S., Azeiza, A. Abdelhadi, A.A.,** 2019. Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 67, pp. 108-116.
- Abeer, M., Nawal, M. S., Al-Malky Rahaf, M., Zurbutan Arts – Al-Dayer.,** 2017. Bioremediation of Pesticides by Bacteria in Jazan Area J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ., Vol.8 (6), 229– 232.
- Adam, O., Degiorgi, F., Crini, G., Badot, P.M.,** 2010. High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: outcomes for risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1402–1407.
- Agrawa, A., Sharma, B.,** 2010. Pesticide induced oxidative stress in mammalian systems. *Int J Biol Med Res* 1(3):90–104.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A.,** 2006. *Trends Biotechnol.*, 24:281-287.
- Al-Ghanim, L., Khalid, A.,** 2014. Effect of an Organophosphate Insecticide Diazinon on the Activity of Acetylcholinesterase and Lipid Peroxidation of a Common Carp, *Cyprinus Carpio Pakistan J. Zool.*, vol. 46(1), pp. 161-166.
- Alien, R.G., Balin, A.K.,** 1989. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med*, 6, 631-661.
- Anwar, W.A.,** 1997. Biomarker and human exposure to pesticides. *Environ Health Perspect* 105:801–806.
- Arias-Estevez, M., Lopez-Periag, E., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J.C., Garcia-Rio, L.,** 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric Ecosyst Environ* 123:247–260.
- Armstrong, D., Browne, R.,** 1994. *Free Rad. Diag. Med.* 366; 43-58.
- Aslanturk, A., Kalender, Y.,** 2021. Methomyl-induced nephrotoxicity and protective effect of curcumin in male rats, *Toxicology Research*, Volume 10, Issue 5, Pages 1003–1012.
- Atlas, M.R., Bartha, R.,** 1998. In: *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications*, IV edition, Benjamin/Cummings Science Publishing California, USA. pp. 511-555.
- Bacchetta, C., Rossi, A. S., Ale, A., Campana, M., Parma, J., Cazenave, J.,** 2014. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multibiomarker approach. *Ecol Indic* 6:532–538.
- Baker, K.H., Herson, D. S.,** 1994. In: *Bioremediation*. (Eds. Baker, K.H. and Herson, D.S.), McGrawHill, New York, pp. 1-7.

- Banerjee, B. D., Seth, V.,** 1999. Bhattacharya A, Pasha ST, and Chakraborty AK Biochemical effects of pesticides on lipid peroxidation and free radicals scavengers. *Toxicology Letters* 107: 33–77.
- Barkovskii, A.L.,** 2001. In: *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*. (Eds. J. C. Hall, R. E. Hoagland, and R. M. Zablotowicz), ACS Symposium Series 777.
- Barrett, M.,** 2000. In: *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. (Eds. A. H. Cobbs and R. C. Kirkwood), Sheffield, Great Britain: Sheffield Academic. pp. 25–37.
- Basak, B., Bhunia, B., Dey, A.,** 2014. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation. *Int Biodeterior Biodegrad* 93:107–117.
- Baudy, P., Zubrod, J.P., Korschak, M., Weil, M., Schulz, R., Bundschuh, M.,** 2017. Does long-term fungicide exposure affect the reproductive performance of leaf-shredders? A partial life-cycle study using *Hyalella azteca*. *Environ. Pollut.*, 222, pp. 458-464.
- Benbrook, C.M.,** 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.*, 28 (1), p. 3.
- Benslama, O., Boulahrouf, A.,** 2013. Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *African J. Microbiol. Res.*, 7 (49), pp. 5587-5595.
- Birkhoj, M., Nelleman, C., Jarfel, K., Jacobsen, H., Andersen, H.R., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M.,** 2004. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 15(201): 10–20.
- Blanco, C.,** 2012. "Heliothis virescens and Bt cotton in the United States". *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*. 3 (3): 201– 12. doi: 10.4161/gmcr.21439. PMID 22892654.
- Boschin, G.D., Agostina, A., Arnoldi, A., Marotta, E., Zanardini, E., Negri, M., Valle, A., Sorlini, C.,** 2003. Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron- methyl by *aspergillus niger* in laboratory conditions. *J Environ Sci Health B* 38(6):737–746.
- Brian, J.R., Fermor, T.R., Semple, K.T.,** 2002. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil associated phenanthrene. *Environ. Pollut.* 118: 65–73.
- Bukowska, B.,** 2003. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Toxicology & Physiology* 135: 435–441.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D.,** 1985. *Science*. 228 (4706) : 1434-1436.

- Capkin, E., Boran, H., Altinok, I.,** 2014. Response of Acetylcholinesterase (AChE) in the Erythrocyte and Liver of Rainbow Trout Exposed to Carbosulfan Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 14: 643-650.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T. and Zablotowicz, R.M.,** 1999. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23:232–241.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D.,** 2009. Antioxidants and the Comet assay. Mutat Res Rev Mutat Res 681(1):51–67.
- Chen, J.L., Chen, X.J., Wang, P., Liu, S.W., Chi, Z.G., Mater, J.H.,** 413 (2021), p. 125306.
- Aygun, D., Doganay, Z., Altıntop, L., Güven, H., Onar, M., Deniz, T., Sunter, T.,** 2002. Serum acetyl cholinesterase and prognosing, Journal of Toxicology Clinical Technology, 40, 903-910.
- Demnerova, K., Mackova, M., Spevakova, V., Beranova K., Kochankova, L., Lovecká, P., Ryslavá, E., Macek, T.,** 2005. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics characterization of microbial populations. Int. Microbiol., 8, pp. 205-211.
- Duke, O., Powles, S.B.,** 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide Pest Manag. Sci., 64 (4) (2008), pp. 319-325.
- Durmuş, B., Aydın, E., Ergüven, G.Ö., Yıldırım N., Kıyan E.,** 2022. Bioremediation Performance of *Sphingomonas melonis* and *Bacillus muralis* on Herbicide Diquot Dipremide-(ethylene-d4) , International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research, Vol. 6(1) 57-67.
- El-Demerdash, F., Dewar, Y., ElMazoudyAzza, R.,** 2013. A.Attia Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. Experimental and Toxicologic Pathology 65, 6, 897-901.
- El-Khawaga, O.Y.,** 2002. Role of selenium on antioxidant capacity in methomyl-treated mice Encyclopedia of Pest Management, Edited By David Pimentel, Ph. D. ISBN 9780824706326.
- El-Khawaga, O.Y.,** 2012. Protective Effects of Tannic Acid against Methomyl- Induced-Oxidative Stress. J Biotechnol Biomaterial 2:127. doi:10.4172/2155-952X.1000127.
- Ergüven, G.O.,** 2018. Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. Bull Environ Contam Toxicol 100:570–575.
- Ergüven, G.O.,** 2018. Comparison of Some Soil Fungi in Bioremediation of Herbicide Acetochlor Under Agitated Culture Media, Bull Environ Contam Toxicol. Apr;100(4):570-575.

- Erguven, G.O., Bayhan, H., İkizoglu, B., Kanat, G., Demir, G.,** Removal rate of herbicide aclonifen with isolated bacteria and fungi applied ecology and environmental research 14(2): 351-365.
- Erguven, G.O., Demir, G.,** 2019. Evaluation of the detoxification potential of *Micrococcus* strains and plants for bioremediate organochlorine herbicides. *Int J Innov Approaches Agric Res* 3(3):353–364.
- Erguven, G.O., Demirci, U.,** 2020. Statistical evaluation of the bioremediation performance of *Ochrobactrum thiophenivorans* and *Sphingomonas melonis* bacteria on Imidacloprid insecticide in artificial agricultural field, *J Environ Health Sci Eng.* 18(2): 395–402.
- Erguven, G.O., Nuhoglu, Y.,** 2020. Bioremediation Of Fluazifop-P-Butyl Herbicide By Some Soil Bacteria Isolated From Various Regions Of Turkey In An Artificial Agricultural Field, *Environment Protection Engineering*, Vol. 46 No. 3 DOI: 10.37190/epe200301.
- Erguven, G.O., Yildirim, N.,** 2016. Efficiency of some soil bacteria for chemical oxygen demand reduction of synthetic chlorsulfuron solutions under agitated culture conditions. *Cell Mol Biol* 62(6):92–96.
- Erguven, G.O., Yildirim, N.,** 2019. The evaluation of imidacloprid remediation in soil media by two bacterial strains. *Curr Microbiol* 76(12):1461–1466.
- Erguven, G.Ö., Serdar, O., Tanyol, M., Yildirim, N.C., Yildirim, N., Durmus B.,** The Bioremediation Capacity of *Sphingomonas melonis* for Methomyl-Contaminated Soil Media:RSM Optimization and Biochemical Assessment by *Dreissena polymorpha*, doi.org/10.1002/slct.20220210.
- Ergüven, G.Ö.,** 2017. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty Ergüven110 Role of Some Selected Fungi Cultures on Bioremediation of Herbicide Chlorsulfuron. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (02).
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H:** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991; 11(1): 81–128
- Fang, H., Wang, Y., Gao, C., Yan, H., Dong, B., Yu, Y.,** 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. *Biodegradation* 21:939–946.
- Farrukh, S.,** 2017. Chronic effects of endosulfan on acetylcholinesterase and cellulase enzyme activity of earthworm *Eisenia foetida*, *MOJ Toxicol*, 3(3):68–72.
- Ferreira, D., Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.,** 2010 Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79(9):914–921.

- Field, J., Stam, A.M., Kato, M., Schraa, G.,** 1995. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Anton Leeuw* 67(1):47–77.
- Fuent, J.,** 2005. *Physiol. biochem*; 61(4):501-506, oct.-dic.
- Garg, D.P., Bansal, A.K., Malhotra, A., Kiran, R.,** 2013. Methomyl induced hematological and biochemical alterations protection by vitamin E, *Pesticide biochemistry and physiology*. 93,3,127-132.
- Gerhardt, A., Kienle, C., Allan, I.J., Greenwood, R., Guigues, N., Fouillac, A.M., Mills, G.A., Gonzalez, C.,** 2007. Biomonitoring with *Gammarus pulex* at the Meuse (NL), Aller (GER) and Rhine (F) rivers with the online Multispecies Freshwater Biomonitor®. *J Environ Monit* 9:979–985.
- Goddard, M.J., Pratt, H.P.M.,** 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: An analysis of the "2-cell block". *J Embryol Exp Morph*, 73, 111-133.
- Golombieski, J. I., Marchesan, E., Camargo, E. R., Salbego, J., Schmitt, J., Vania B.,** 2008. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran, *Animal Science and Pastures • Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 65 (4).
- Góngora-Echeverría, V.R., García-Escalante, R., Rojas-Herrera, R., Giacomán-Vallejos, G., Ponce-Caballero, C.,** 2020. Pesticide bioremediation in liquid media using a microbial consortium and bacteria-pure strains isolated from a biomixture used in agricultural areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 200, 110734.
- Gui-Shan, Z., Xiao-Ming, J., Tian-Fan, C., Xiao-Hang, M., Yu-Hua, Z.,** 2005. Isolation and characterization of a new carbendazim-degrading *Ralstonia* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 21:265–269.
- Guo, X.B.,** 2006. *Environmental Health*; Peking University Medical Press: Beijing, China,
- Habig, C. and Di Giulio, R. D.** 1991. "Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms". In *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment*, Edited by: Mineau, P. New York: Elsevier. Vol 2 – *Chemicals in Agriculture*. 19–3.
- Habotta, O.A., Elbahnaswy, S., Ibrahim I.,** 2022. Neurotoxicity of singular and combined exposure of *Oreochromis niloticus* to methomyl and copper sulphate at environmentally relevant levels: Assessment of neurotransmitters, neural stress, oxidative injury and histopathological changes, *environmental toxicology and pharmacology*, 94, 103935.
- Heikal, T.M., Mossa, A.T., Khalil, W.K.B.,** 2014. Protective effects of vitamin C against metomil-induced injures on the testicular antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rat. *J Environ Anal Toxicol* 5(2):1000255.

- Hernández-Moreno, D., Casa-Resino, I., Flores, J. M., González Gómez, M.J., Neila, C.M., Soler, F., Marcos, M.L.,** 2014. Different enzymatic activities in carp (*Cyprinus carpio* L.) as potential biomarkers of exposure to the pesticide methomyl, Hernández-Moreno D, et al. *Enzyme Activities In Carp Exposed To Methomyl Arh Hig Rada Toksikol.* 65:311-318.
- Holt, E. A. & Miller, S. W. (2010)** Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge* 3(10):8
- Howard, P.H.,** 1991. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Pesticides. Chelsea, MI: Lewis Publishers. pp. 3–15.
- Jing, X., Zheng, Y., Mulbah, J.P., Chen, J., Xu, G.,** 2022. Effect of Methomyl on Growth, Antioxidant System of GIFT (*Oreochromis niloticus*), and Residue in the Presence of Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) *Int J Anal Chem.*: 7434426.
- Khan, M.Z., Tabassum, R.,** 2003. Effect of Cypermethrin and Permethrin on Cholinesterase Activity and Protein Contents in *Rana tigrina* (Amphibia) *Turk J Zool* 27. 243-246.
- Kidd, H., James, D.R.,** 1991. The agrochemicals handbook, 3rd edn. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, Englan.
- Kono, Y., Fridovich. I.,** 1982. Superoxide radicals inhibit catalase. *J Biol Chem* 257:5751–5754.
- Korkmaz, V., Yildirim, N., Erguven, G.O., Durmus, B., Nuhoglu, Y.,** 2021. The bioremediation of glyphosate in soil media by some newly isolated bacteria: The COD, TOC removal efficiency and mortality assessment for *Daphnia magna*, *Environmental Technology & Innovation* Volume 22, 101535.
- Kosower, N.S., Song, K.R., Kosower, E.M.,** Glutathione IV. Intracellular oxidation and cellular injury. *Biochem Biophys Acta*, 192, 23-28, 1969.
- Kumari.,** 2020. Protective effect of *Basella alba* leaf against diabetic nephropathy in rats *Adv. Tradit. Med.* 10.1007/s13596-020-00458-2 10.1007/s13596-020-00458-2.
- Lakshmi, C.V., Kumar, M., Khanna, S.,** 2008. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 62(2):204–209.
- Lang, Q.L., Han, L., Hou C.T., Dj, P., Toutant, P.,** 2000. Saglio Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 117}124.
- Laszczyca, P., Augustyniak, M., Babczyńska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G., Witas, I.,** 2004. Profles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ Int* 30:901–91.

- Lau, E.T.C., Karraker, N.E., Leung, K.M.Y., 2015.** Temperature-dependent acute toxicity of metomil pesticide on larvae of 3 Asian amphibian species. *Environ Toxicol Chem* 34(10):2322–2327.
- Leckie, S.E., 2005.** Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecol. Manag.* 220, pp. 88-106.
- Legradi, J.B., Di Paolo, C., Kraak, M.H.S., 2018.** *et al.* An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environ Sci Eur* 30, 46.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Roman, G., Jana, M., Tomas, R., 2010.** Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comp. Biochem. Phys.* 151, 137–141.
- Lima, P.L., Benassi, J.C., Pedrosa, R.C., Dal Magro, J., Oliveira, T.B., Wilhelm, F.D., 2006.** Time course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 23–30.
- Limón-Pacheco, J., Gonsébat, M.E., 2009.** The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 674(12):137–147.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8), 118-126.
- Lu, Z., Min, H., Xia, Y., 2004.** The response of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Burkholderia cepacia* WZ1 to oxidative stress of exposure to quinclorac. *J Environ Sci Health B* 39:431–441.
- Luo, Y., Su, Y., Lin, R., Shi, H.H., Wang, X.R., 2010.** 2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR.
- Macneil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1999.** The dynamics of predation on *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Biol. Rev.*, 74, pp. 375-395.
- Maggi, F., Tamg, F.H.M., la Cecilia, D., McBratney, A., 2025.** PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to. *Sci. Data*, 6 (2019), p. 170.
- Maltby, L., Crane, M., 1994.** Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, Crustacea) to metalliferous effluents: identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environ Pollut* 84:45–52.
- Manisha, Whidul Hasan, Richa Rajak and Deepali Jat, 2017.** Oxidative Stress And Antioxidants: An Overview International Journal of Advanced Research and Review IJARR, 2(9), 110-119.

- Manno, M., Bertazzon, A., Burlina, A., Galzigna, L.,** 1985. Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. *Enzyme*, 34: 107-112.
- Mansour, S., Mossa, A., Heikal, T.,** 2009. Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: In vitro studies *Toxicology and Industrial Health* 25(8):557-63.
- Mansour, S.A., Abdel-Tawab, H.M.,** 2009. Tarek Effects of metomil on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: in vitro studies. *Toxicol Ind Health* 25(8):557–563.
- Martínez, M.-A., Ares, I., Rodríguez, J.-L., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A.,** 2018. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environ. Res.* 161, 212–219.
- Martins-Gomes, C., Coutinho, T.E., Silva, T.L., Andreani, T., Silva, A.M.,** 2022. Neurotoxicity Assessment of Four Different Pesticides Using In Vitro Enzymatic Inhibition Assays. *Toxics*, 10, 448.
- Masson, P., Carletti, E., Nachon, F.,** 2009. *Protein Peptide Lett.*, 16, pp. 1215-1224.
- Maund, S.J., Campbell, P.J., Giddings, J.M., Hamer, M.J., Henry, K., Pilling, E.D., Warinton, J.S., Wheeler, J.R.,** 2011. Ecotoxicology of synthetic pyrethroids. *Pyrethroids* 13, 7–165.
- McCall, M.R., Frei, B.,** 1998. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 26, Nos. 7/8, pp. 1034– 1053.
- McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR** 1991. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 40, 344-340.
- Meftaul, I.M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Asaduzzaman, M., Parven, A., Megharaj, M.,** 2020. Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: is it to be banned in modern agriculture?. *Environ. Pollut.*, 263. Article 114372.
- Meng, S., Chen, X., Song, C., Fan, L., Qiu, L., Zheng, Y., Chen, J., Xu, P.,** 2021. Effect of Chronic Exposure to Pesticide Methomyl on Antioxidant Defense System in Testis of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Its Recovery Pattern. *Appl. Sci.* 11, 3332.
- Meng, S.L., Chen, J.Z., Xu, P., Qu, J.H., Fan, L.M., Song, C., Qiu, L.P.,** 2014. Hepatic Antioxidant Enzymes SOD and CAT of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Response to Pesticide Methomyl and Recovery Pattern. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 388–392.
- Method. Chemosphere** 2006, 65, 1064–1073.

- Misra, S., Niyogi, S.,** 2009. Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress. *Toxicol. In Vitro.* 23, 1249–1258.
- Mohamed, M.S.,** 2009. Degradation of metomil by the novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* M1. *EJB* 12(4):1–6.
- Mohamed, M.S.M., El-Arabi, N.I., El-Hussein, A., Abu El-Maaty, S., Abdelhadi, A.A.,** 2020. Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation. *Folia Microbiologica* (accepted), 10.1007/s12223-020-00771-y.
- Mohamed, M.S.M., Youssef, A.F.A., Mohamed, Y.A.,** 2018. The potentiality of *Lysinibacillus sphaericus* DM-3 and *Bacillus cereus* DM-5 in degrading dimethoate. *Egypt. J. Bot*, 58 (2), pp. 217-232.
- Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L.,** 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 143(2):141–149.
- Montiel-León, J.M., Munoz, G., Duy, S.V., Do, D.T., Vaudreuil, M.-A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., Sauvé, S.,** 2019. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.* 250, 29–39.
- Moreno, D.H., Resino, I.D.L.C., Flores, J.M., Gómez, M.J.L., Neila, C.M., Soler, F., López, M.P.,** 2014. Different enzymatic activities in carp (*Cyprinus carpio* L.) as potential biomarkers of exposure to the pesticide metomil. *Arh Hig Rada Toksikol* 65:311–318.
- Muñoz, A., López-Piñero, A., Regodón, J.A., Ramírez, M.,** 2010. Soil bioremediation of atrazine pesticide by two strains of soil microorganism *Microorganisms in Industry and Environment*, pp. 129-131.
- Muola, A., Fuchs, B., Laihonon, M., Rainio, K., Heikkonen, L., Ruuskanen, S., Saikkonen, K., Helander, M.,** 2021. Risk in the circular food economy: Glyphosate-based herbicide residues in manure fertilizers decrease crop yield. *Sci. Total Environ.* 750, 141422.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R.,** 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Heal* 15, 1–13.
- Nataraj, B., Hemalatha, D., Rangasamy, B., Maharajan, K., Ramesh, M.,** 2017. Hepatic oxidative stress, genotoxicity and histopathological alteration in fresh water fish *Labeo rohita* exposed to organophosphorus pesticide profenofos. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 12, pp. 185-190.

- Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hofman, S.M., Maltais, L.J., Wain, H.M., Nebert, D.W.,** 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14:1–18.
- Ogino, T., Kawabata, T., Awadi, M.,** 1989. Stimulation of glutathione synthesis in iron-loaded mice. *Biochim Biophys Acta*, 1006, 131–135.
- Oncu, M., Gultekin, F., Karaoz, E., Altuntas, I., Deliba, N.,** 2002. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. *Hum Exp Toxicol* 21:223–230.
- Onder Erguven, G., Tatar, Ş., Serdar, O.,** 2021. Evaluation of the efficiency of chlorpyrifos-ethyl remediation by *Methylobacterium radiotolerans* and *Microbacterium arthrosphaerae* using response of some biochemical biomarkers. *Environ Sci Pollut Res* 28, 2871–2879.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y.,** 2004. Uner, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol.* 137, 43–51.
- Oruç, E.Ö.; Üner, N.,** 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Phys.* 127, 291–296.
- Panda, J., Kanjilal, T., Das, S.,** 2018. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnol Res Innov* 2:45–57.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos. D., Fontainhas Fernandes, A.,** 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pestic Biochem Physiol* 85:91–96.
- Pileggi, M., Pileggi, S.A.V., Sadowsky, M.J.,** 2020. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities, 6:12, e05767.
- Published May 9,** 2002 by CRC Press 952 Pages.
- Raibeemol, K.P., Chitra, K.C.,** 1795. Effects of chlorpyrifos as inducer for oxidative stress in liver, kidney and spleen of freshwater fish, *Pseudotroplus maculatus*. 8 (2018), pp. 20–29.
- Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Monberg, R.J., Kronvang, B.,** 2012. Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Sci. Total Environ.*, 416, pp. 148–155.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., & Girard, J. P. (2000).** Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 48, 185–194

- Rosales, M., Zoltan, T., Yadarola, C., Mosquera, E., Gracia, F., García, A., 2019.** The influence of the morphology of 1D TiO₂ nanostructures on photogeneration of reactive oxygen species and enhanced photocatalytic activity *J. Mol. Liq.*, 281, pp. 59-69.
- Rosenberg, D. M. & Resh, V. H. 1992.** *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. New York, NY: Chapman and Hall.
- Ruuskanen, S., Rainio, M.J., Kuosmanen, V., Laihonon, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I., Helander, M., 2019.** Female preference and adverse developmental effects of glyphosate-based herbicides on ecologically relevant traits in Japanese quails. *Environ. Sci. Technol.* 54, 1128–1135.
- Sahinoz, E., Aral, F., Dogu, Z., Koyuncu, İ., Yuksekdog, O., 2019.** The protective effects of curcumin on organophosphate insecticide chlorpyrifos-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Turk J Fish Aquat Sci* 20(3):185–195.
- Sarkar, A., Vashistha, D., Durga Prasad, P.V.S.S., Lacaze, E., 2022.** Acetylcholinesterase Inhibition of Marine Fish (*Rastrelliger kanagurta*) by Organophosphorus Pesticides as Biomarker of Neurotoxicants. *Adv Clin Toxicol*, 7(1): 000246.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Trilhon, M., 2008.** Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71:1832–1839.
- Serdar, O., 2019.** The effect of dimethoate pesticide on some biochemical biomarkers in *Gammarus pulex*. *Environ Sci Pollut Res* 26(21):21905–21914.
- Shah, H.K., Sharma, T., Banerjee, B.D., 2020.** Organochlorine pesticides induce inflammation, ROS production, and DNA damage in human epithelial ovary cells: an in vitro study. *Chemosphere*, 246, Article 125691.
- Shanahan, P., 2004.** “Bioremediation. Waste Containment and Remediation Technology”, Spring Massachusetts Institute of Technology, MIT Open Course Ware.
- Sheng, Y., Abreu, I.A., Cabelli, D.E., Maroney, M.J., Miller, A.F., Teixeira, M., Valentine, J.S., 2014.** Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* 114, 3854–3918.
- Shi, F., Jia, X., Zhao, C., Chen, Y., 2010.** Antioxidant activities of various extracts from *Artemisia selengensis* Turcz (LuHao). *Molecules* 15: 4934–4946.
- Sies H., 2015.** **Oxidative stress:** a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4:180–3.
- Small, D.H., Michaelson, S., Sberna, G., 1996.** *Neurochem. Int.*, 28, pp. 453-483.

- Song, Y., Chen, M., Zhou, J.,** 2017. Effects of three pesticides on superoxide dismutase and glutathione-S-transferase activities and reproduction of *Daphnia magna*. *Arch Environ Prot* 43(1):80–86.
- Soszynski, M., Filipiak, A., Bartosz, G., Gebicki, J.M.,** 1996. Effect of amino acid peroxides on the erythrocyte. *FreeRadical Biology & Medicine* 20: 45–5.
- Suman, S., Singh, T., Swayamprabha, S., Singh, S.,** 2020. Biodegradation of Pesticide Chlorpyrifos by Bacteria *Staphylococcus aureus* (Accession no. CP023500.1) Isolated from Agricultural Soil. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 20(1&2), 21–26.
- Tanabe, S., Subramanian, A.,** 2006. *Bioindicators of POPs: Monitoring in Developing Countries*. Kyoto, Japan: Kyoto University Press.
- Tatar, S., Yildirim, N.C., Serdar, O., Erguven, G.O.,** 2020. Can toxicities induced by insecticide metomil be remediated via soil bacteria *Ochrobactrum thiophenivorans* and *Sphingomonas melonis*? *Curr Microbiol* 77:1301–1307.
- Thompson, L.J., Smith, S., Stout, J.C., White, B., Zioga, E., Stanley, D.A.,** 2022. Bumblebees can be exposed to the herbicide glyphosate when foraging. *Environ. Toxicol. Chem.* 41 (10), pp. 2603-2612.
- Trishala K. Parmar, Deepak Rawtani and Y. K. Agrawal,** 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution *Frontiers In Life Science*, 9, 2, 110–118.
- Vignerot, A., Geffard, O., Coquery, M., François, A., Quéau, H., Chaumot, A.,** 2015. Evolution of cadmium tolerance and associated costs in a *Gammarus fossarum* population inhabiting a low-level contaminated stream. *Ecotoxicology*, 24, pp. 1239-1249.
- Vos, R.M.E., Van Bladeren, P.J.,** 1990. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 75:241–265.
- Wang, J., Zhang, J., Wang, J., Fang, G., Wang, S. Mater, J. H.,** 2020. 389, pp. 122074-122081.
- Wang, K.Y., Zhang, Y., Wang, H.Y., Xia, X.M., Liu, T.X.,** 2010. "Influence of three diets on susceptibility of selected insecticides and activities of detoxification esterases of *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 96 (1): 51–55. doi:10.1016/j.pestbp.2009.09.003.
- Washington, DC:** *American Chemical Society*. pp. 40–56.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C.,** 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165.

- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., 2009.** Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration, *Aquatic Toxicology*, 94, 2, 31, 114-122.
- Yi, Y.H., Zhu, G.B., Liu, C., Huang, Y., Zhang, Y.Y., Li, H.T., Zhao, J.N., Yao, S.Z., 2013.** Anal. Chem., 85, pp. 11464-11470.
- Yildirim, N.C., Tanyol, M., Serdar, O., Yildirim, N., 2019.** *Gammarus pulex* as a model organism to assess the residual toxicity of slaughterhouse wastewater treated by electrocoagulation process. *Bull Environ Contam Toxicol* 103:447–452.
- Yildirim, N.C., Tanyol, M., Yildirim, N., Serdar, O., Tatar, S., 2018.** Biochemical responses of *Gammarus pulex* to malachite green solutions decolorized by *Coriolus versicolor* as a biosorbent under batch adsorption conditions optimized with response surface methodology. *Ecotoxicol Environ Saf* 156:41–47.
- Zama, D., Meraihi, Z., Tebibel, S., Benayssa, W., Benayache, F., Benayache, S., Vlitinck, A.J., 2007.** Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia arg* Alien RG, Balin AK: Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med*, 6, 631-661, 1989.
- Zhao, H., Tao, K., Zhu, J., Liu, S., Gao, H., Zhou, X., 2015.** Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61, 165–170.