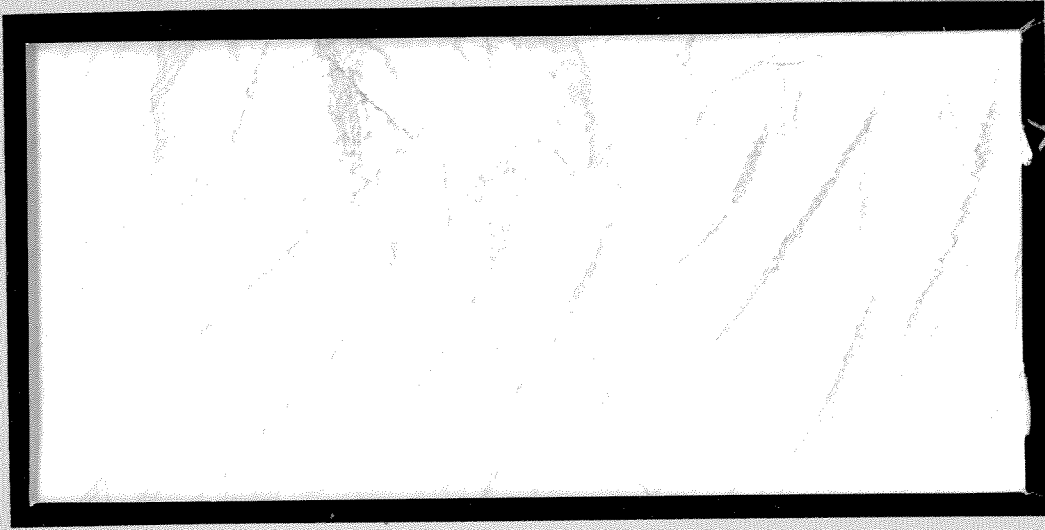


1997-480



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

**KARBAMAT PESTİSİTLERİNİN (ALDİCARB'IN)  
KONTROLLU SALIMI VE MİKROBİYAL  
DEGRADASYONU**

**PROJE NO:TBAG-DPT/27**

Ş

**Prof.Dr.Vasif HASIRCI  
Prof.Dr.Gürdal ALAEDDİNOĞLU  
Prof.Dr.Oktay GENCER  
Prof.Dr.Kazım ABAK  
Doç.Dr.Yaşar ÖZDEN**

**MART-1996  
ANKARA**

**KARBAMAT PESTİSİTLERİNİN (ALDİCARB'IN) KONTROLLU SALIMI VE  
MİKROBİYAL DEGRADASYONU (TBAG-DPT-27)**

*Projede çalışan üyelerin tam listesi:*

**•ODTÜ Kontrollü Salım Grubu**

PROF. DR. VASİF HASIRCI  
Y. DOÇ. DR. M. YAKUP ARICA  
AR. GÖR. FATMA N. KÖK  
AR. GÖR. RAMİN DARVARI

**ODTÜ Biyodegradasyon Grubu**

PROF. DR. N. GÜRDAL ALAEDDİNOĞLU  
DOÇ.DR.YAŞAR ÖZDEN  
DR. FADEL SHARİF  
AR. GÖR. CİHAN HALICIGİL  
NOSHİN ASGARI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ Arazi Uygulama Grubu**

PROF. DR. OKTAY GENCER  
PROF. DR. KAZIM ABAK  
AR. GÖR. RAMAZAN KILIÇ

## İÇİNDEKİLER

<u>Sayfa Numarası</u>	<u>İçerik</u>
5	• ÖZ
6	• ABSTRACT
7	• ÖNSÖZ
8	• Tablolar ve Şekiller Listesi
10	• <b>KONTROLLU SALIM ÇALIŞMALARI</b>
10	• Kimyasallar
10	• Mikrokürelerin Hazırlanışı
10	• Mikrokürelerin Şişme Değerleri
12	• Ortam pH'sının Şişmeye Etkisi
12	• NaCMC Konsantrasyonunun Şişmeye Etkisi
12	• Aldicarb Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması
15	• Aldicarb Salımı
15	• Sakıt Denemeleri
19	• Analiz Sonuçları
20	• Alan Uygulaması İçin Hazırlanan Örnekler
20	• Mikrokürelerin Ekstraksiyonu
20	• Tarla Deneyleri İçin H22, H24 ve L46 İçin in Situ Salım Çalışmaları
23	• Tarla Uygulamaları
24	• Tarla Uygulaması Sonuçları
27	• <b>MİKROBİYAL DETOKSİFİKASYON ÇALIŞMALARI</b>
27	• TEMİK Kullanılarak Zenginleştirme Yöntemiyle Bakteri İzolasyonu
27	• Aldicarbın ve Parçalanma Ürünlerinin Belirlenmesi
27	• İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
28	• TAS' un Saflaştırılması
28	• Aldicarb Parçalayan Bakterinin izolasyonu
28	• Ortam ve Üreme Koşulları
28	• Bakterinin Aldicarb'lı Minimal Besiyerinde Üreme Özellikleri
28	• Aldicarbın Parçalanmasında En Uygun Üreme Koşullarının Tespiti
28	• Aldicarbın Zengin Besi Ortamında Biyolojik Yıkımı
28	• Aldicarbı Parçalayan İzolatın Karakterizasyonu
29	• Ham Hücre Özütleleri ile Çalışmalar
29	• Aldicarbın Ham Hücre Özütleleri Varlığında Parçalanması
29	• Metilaminin Ham Hücre Özütlelerinde Saptanması
29	• Canlı Hücrelerde Oksijen Elektrodu Aracılığıyla Oksijen Tüketimi Ölçümü
30	• Aldicarbın Parçalanmasında Metabolik Yolların Belirlenmesi

32	• İncelenen enzimler;
	• 1. Seringlioksilat aminotransferaz (SGAT); 2. Hidroksi pirivat redüktaz (HPR); 3. Gliserat kinaz (GK); 4. Fosfoenolpirivat hidrataz (FEPH); 5. İzositrat liyaz (ISL); 6. Formaldehit dehidrogenaz (FDH);
34	• Biyolojik Yıkımın Toprakta İncelenmesi
34	• Biyodegradasyon Sonuçları
34	• TEMİK Kullanılarak Toprak Bakterilerinin Zenginleştirilmesi
34	• Aldicarbın ve Parçalanma Ürünlerinin HPLC Yoluyla Belirlenmesi
34	• TLC Sonuçları
34	• Aldicarbı Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu
38	• Bakterinin Üreme Özelliklerinin Belirlenmesi
38	• Aldicarbın PYE Ortamında Parçalanması
38	• Bakteri Karakterizasyonu
45	• Aldicarbın Parçalanma Ürünlerinin Karakterizasyonu
45	• Ham Hücre Özüleriyle Aldicarbın Parçalanması
45	• Enzimatik Parçalanma Sonrası Oluşan Metilaminin Gösterilmesi
45	• Canlı Hücrelerde Oksijen Elektrodu Aracılığıyla Oksijen Tüketimi Ölçümü
47	• Aldicarb Biyodegradasyonunda Metabolik Yolların Belirlenmesi
54	• Toprakta Aldicarbın Bakteriler Yardımıyla Parçalanması
56	• <b>BİYOREAKTÖR ÇALIŞMALARI</b>
56	• Mikrokürelerin Hazırlanması ve Aktive Edilmesi
56	• Mikroorganizmanın Tutuklanması
58	• Reaktör Koşulları
58	• Reaktör Sonuçları
60	• <b>ARAZİ ÇALIŞMALARI</b>
60	• Materyal
60	• Yöntem
61	• Verilerin Analizi
62	• Bulgular ve Tartışma
64	• Uygulama Planı
65	• Dozların Bitkilere Uygulama Planı
66	• Çizelge 1a ve 1b
67	• <b>REFERANSLAR</b>

## ÖZ

Türkiyede geniş çapta kullanım bulan ve karbamat pestisitlerinden biri olan aldicarb, çok toksik oluşu ve toprakta uzun süre kalabilmesinden kaynaklanan kirlenme özelliğinden dolayı, üzerinde durulması gereken bir maddedir.

Bu çalışmada pestisitlerden kaynaklanan çevre ve yeraltı suları kirliliği probleminde iki değişik bilimsel yaklaşımla çözüm önerilmiştir. İlk yaklaşım kullanılacak pestisit miktarını düşürebilmek için bir kontrollü salım sistemi geliştirmeyi amaçlamaktaydı. Böylelikle pestisit ortamına verilmesinin alçak düzeyde fakat uzun süreli olması böylelikle ilaç miktarı azaldığı halde etkin bir pestisit uygulaması sağlanmış aynı zamanda ortamda fazla pestisit varlığından kaynaklanan kirlilik te önlenmiş olacaktır. Çalışmalarımız laboratuvar, saksı ve tarla denemeleri olarak üç aşama da gerçekleştirilmiş ve elde edilen mikrokapsüller ilaç salım süresini saatler düzeyinden 8 hafta arasına kadar uzatabildi.

İkinci yaklaşımda ise ortamda kalması arzu edilmeyen (toksik ve kirlenici özelliği dolayısıyla) pestisit mikroorganizmalar tarafından parçalanması hedef alınmıştır. Kullanıma sokulacak mikroorganizmaların immobilizasyonu da mikroorganizmaların uygulama alanı dışına taşmamasını sağlaması için önerilmiştir. Pestisiti degrade edecek mikroorganizmalar aldicarb uygulanmış topraktan izole edildi ve degradatif özelliklerine yol açan metabolik yollar incelendi. *Methylophilus* türü olan mikroorganizmanın bir karbamat olan aldicarb'ı metilamin'e dönüştürdüğü gözlemlendi.

İmmobilize mikroorganizmanın yer aldığı biyoreaktörde aldicarb'ın degradasyonunu tek geçişli koşullarda %15 düzeyinde düşürebildiği gözlemlendi.

Arazi uygulamalarında özellikle L46 ve H24'ün ürün, bitki boyu, lif kalınlığı ve dayanıklılığı konularında kontrolden ve Temik uygulanmış örneklerden biraz daha olumlu katkı yaptığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Aldicarb, pestisit, kontrollü pestisit salımı, biyodegradasyon, biyoreaktör

## ABSTRACT

Aldicarb, a carbamate pesticide, is used in large quantities in Turkey and deserves special attention due to its pollutant effect arising from its being highly toxic and its long duration of bioavailability.

In this study two different scientific approaches were proposed for the environmental and ground water pollution caused by the pesticides. First approach aimed at decreasing the amount of the pesticide used by constructing a controlled release system. Since the amount of pesticide used would be low but it would be available for a long period an effective pesticide application would be achieved with a low amount of pesticide, decreasing the extent of pollution. Our studies were carried out at three stages (in the laboratory, in pots, and in the experimental field) and the mikrocapsules prepared could prolong the pesticide release duration from a couple of hours to 8 weeks.

With the second approach, removal of the undesired (due to its being toxic and its pollutant action) by degradation by microorganisms was aimed. In order to restrict the mobility of the microorganisms (to prevent their spread to other fields) their immobilization was proposed. Pesticide degrading microorganisms were isolated from the soil of fields where aldicarb had previously been applied and the metabolic basis of the degradation capability was investigated. It was observed that this *Methylophilus* strain converted aldicarb into methylamine.

In the bioreactor containing the immobilized microorganisms a 15% degradation was achieved when the bioreactor was operated in a single-pass manner.

In the field applications it was observed that samples L46 and H24 had more positive influence on the yield, plant height, fiber thickness and strength than the controls and the Temik applied ones.

**Keywords:** Aldicarb, pesticide, controlled pesticide release, biodegradation, bioreactor

## ÖNSÖZ

Bu, DPT kaynaklarından TÜBİTAK aracılığıyla desteklenen bir biyoteknoloji çalışmasıdır. Bu çalışma, 2 Y. Lisans çalışmasına veri sağlamış, iki yurt dışı yayına ve bir kaç bildiriye yol açmış ve bir British Council Research Link projesinin Newcastle Üniversitesi (İngiltere) ile ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Birimi (BAB) arasında yürütülmesine zemin oluşturmuş olması nedeniyle çok verimli sayılabilir. Ayrıca çalışmanın iki çok farklı disiplin üzerinde eğitim veren ve araştırma yapan (ODTÜ-BAB ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Pamuk Araştırma ve Uygulama Merkezi ) birimin bir ortak çalışması olması ayrıca ülkemiz açısından kıvanç vericidir.

Olası bir gelişme ise özellikle bu pestisiti üreten kurumların çalışmamız sonuçlarıyla ilgilenmesidir. Bu gerçekleşebilirse hem DPT'nin hem de TÜBİTAK'ın hedeflerine varılmış olacaktır.



## **Tablolar**

- Tablo 1. Mikrokürelerin şişme miktarları
- Tablo 2: Alüminyum klorür konsantrasyonunun pH ve şişmeye etkisi (2% NaCMC )
- Tablo 3: Salımda kullanılan bazı CMC-aldicarb mikrokürelerinin hazırlanma koşulları
- Tablo 4: Salımda kullanılan bazı CMC-aldicarb mikrokürelerinin hazırlanma koşulları
- Tablo 5: Salımda kullanılan bazı CMC-aldicarb mikrokürelerinin hazırlanma koşulları
- Tablo 6: Saksı uygulama planı
- Tablo 7: Saksı sulama zaman ve miktarları
- Tablo 8: L46 no'lu mikrokürelerin aldicarb içerikleri (saksılardan çıkarıldıktan sonra)
- Tablo 9: Mikrokapsüllerdeki aldicarb içerikleri
- Tablo 10: Enkapsülasyon verimleri
- Tablo 11: Tarla denemelerinde kullanılan, aldicarb içeren mikrokürelerin özellikleri
- Tablo 12. Karakterizasyon testlerinin sonuçları.
- Tablo 13. Aldicarb okzimin spektroskopik karakterizasyonu.
- Tablo 14. Aldicarb okzimin TLC'le karakterizasyonu.
- Tablo 15. Aldicarb okzimin HPLC'le karakterizasyonu.
- Tablo 16. Çeşitli bileşiklerin bakteriyel oksijen tüketim hızı üzerine etkisi

## **Sekiller**

- Şekil 1: pH'nın şişmeye etkisi
- Şekil 2: NaCMC konsantrasyonunun şişmeye Etkisi
- Şekil 3: L22, L24 ve L26'nın İn situ salımı
- Şekil 4: H22, H24 ve H26'nın İn situ salımı
- Şekil 5: L32, L34 ve L36'nın İn situ salımı
- Şekil 6: Saksı uygulama şeması
- Şekil 7: L46 no'lu örneğin saksı deney sonuçları
- Şekil 8: Tarla uygulaması için hazırlanan mikrokürelerden salım
- Şekil 9: Tarla uygulama planı
- Şekil 10: Tarla salım sonuçları
- Şekil 11. Serin Metabolik Yolu
- Şekil 12. Aldicarb ve parçalanma ürünlerinin HPLC kromatogramları
- Şekil 13. TAS saflaştırmasının HPLC'le incelenmesi.
- Şekil 14. Aldicarbı parçalayan beş bakteri izolatu.
- Şekil 15. Aldicarbın bakteriyel parçalanmasında aldicarb konsantrasyonu etkisi.
- Şekil 16. Aldicarbın bakteriyel parçalanmasında pH etkisi.
- Şekil 17. Aldicarbın bakteriyel parçalanmasında sıcaklık etkisi.
- Şekil 18. Minimal ortamda bakteriyel üreme ve aldicarb parçalanmasının karşılaştırılması.

- Şekil 19. PYE ortamında bakteriyal üreme ve aldicarb parçalanmasının karşılaştırılması.
- Şekil 20. Ham hücre özütlerinin yardımıyla aldicarbın enzimatik hidrolizi.
- Şekil 21. Formaldehit dehidrogenaz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 22. Gliserit kinaz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 23. Hidroksipirivat redüktaz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 24. İzositrat liyaz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 25. Fosfoenol pirivat hidrataz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 26. Serin-glioksilat amino transferaz enziminin zamana karşı aktivitesi.
- Şekil 27. Aldicarbın bakteriyal parçalanmasının toprakta incelenmesi.
- Şekil 28. Mikroorganizma tutuklanmış ve tutuklanmamış mikrokapsüllerin SEM'leri
- Şekil 29. Biyoreaktörde degradasyon çalışmaları

## KONTROLLÜ SALIM ÇALIŞMALARI

### Kimyasallar

Karboksimetil selüloz'un sodyum tuzu (NaCMC) (saflığı > 99,5%; viskozitesi (4% suda, 25°C): 90-200 mPa.s ; süstitüsyon derecesi 0.70-0.85) Fluka, AG 'den alındı. Alüminyum klorür (susuz) ve sodyum hidroksit , Merck AG, ürünüydü. Aldicarb, Temik'in (%15 aldicarb içeren Rhone-Poulenc formülasyonu) eter ekstraksiyonu ile saflaştırılmasından elde edildi.

### Mikrokürelerin Hazırlanışı

Mikroküreler NaCMC'yi temel destek maddesi olarak alarak yapıldı. Alüminyum klorür çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı . Alüminyum klorür çözeltileri (0.02-2.0 M) hazırlandı ve vakum altında süzüldü. Çapraz bağlayıcının pH'sı sodyum hidroksit (0.5M) ve hidroklorik asit (1M) kullanılarak ayarlandı.

Sulu NaCMC çözeltileri (%0.5-3.5 (w/v)) hazırlandı, santrifüj edildi (7000 rpm , 15 dk) ve süpernatant 4°C 'de saklandı.

Mikrokapsül hazırlanmasında, NaCMC çözeltisi (25 mL) degaz edildi ve peristaltik pompa (Scientific Industries Inc., ABD) aracılığıyla, sürekli olarak karıştırılmakta olan alüminyum klorür çözeltisine (150 mL) katıldı. Karıştırma 2 sa. daha sürdürüldükten sonra süzüldü, 5 kez yıkandı (200 mL distile suyla) ve oda sıcaklığında, hava akımıyla kurutuldu.

### Mikrokürelerin Şişme Değerleri

Ön çalışmalar için hazırlanan mikrokürelerin şişme derecelerini saptayabilmek için yeni hazırlanıp durulanmış mikroküreler 48 sa. süreyle distile suda bırakıldı, sudan çıkarıldıktan sonra kürecikler arasındaki su katmanı alındı, ve tartım yapıldı. Sonra bu kürecikler 50°C'de vakum altında, sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutuldu ve tekrar tartıldılar. Şişme, bir gram kuru madde başına absorplanan olan suyun ağırlığı olarak tanımlandı. Sonuçlar Tablo 1'de sunulmaktadır.

Tablo 1. AICMC Mikrokürelerinin Değişik Ortamlarda Şişme Miktarı

Örnek (NaCMC/AlCl <sub>3</sub> /pH)	Distile suda şişme	KP tamponda şişme (pH 7.4, 0.1 M)
2.0/0.06/3.8	37.64	123.56
2.0/0.2/3.2	23.34	42.58
2.0/0.6/2.85	18.99	42.43
2.0/2.0/1.3	22.42	44.77
2.0/0.2/4.0	26.66	58.26

(\*Örnekler düşük moleküler ağırlıklı NaCMC ile hazırlandı ve ilaç yüklenmedi)

#### AlCl<sub>3</sub> konsantrasyonunun AICMC mikrokürelerinin şişmesine etkisi

AlCl<sub>3</sub> konsantrasyonu ortam pH'sını doğrudan etkiler. Böylelikle AlCl<sub>3</sub> hem çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu hem de pH'yı kontrol eder. pH'nın değişimi ile hem makromolekülün konformasyonu hem de çapraz bağlanmanın yapılabileceği nokta sayısı değişir. Tablo 2'de AlCl<sub>3</sub> konsantrasyonu ile ortam pH'sı arasındaki ilişki verilmektedir. Bu sonuçlar çapraz bağlayıcı artmasının etkisinin şişme azalması olduğu yönünde ipuçları taşımaktadır.

Tablo 2: Alüminyum klorür konsantrasyonunun pH ve şişmeye etkisi\*

[AlCl <sub>3</sub> ], M	pH	Şişme
0.02	3.8	30.7
0.06	3.5	32.2
0.10	3.3	26.6
0.20	3.2	20.3
0.60	2.7	16.5
1.00	2.2	19.0
2.00	1.2	19.4

\*(%2 NaCMC )

### Ortam pH'sının şişmeye etkisi

Elde edilen verilere göre (Şekil 1) pH 4'e kadar şişmede belirgin bir değişiklik olmazken bu noktadan sonra çok somut değişim gözlemlendi. Bu büyük olasılıkla CMC'nin bünyesindeki karboksilik grupların disosyasyonu sonrası makromolekülün sulu ortam içindeki moleküler boyutlarında olan değişiklikten kaynaklanmaktadır. Yüksek düzeyde iyonize olan molekül açılmakta ve zincirin yoğunluğu düşmektedir.

### NaCMC Konsantrasyonunun Şişmeye Etkisi

Polimerik maddenin yoğunluğunu arttıran her parametre oluşan mikrokürenin özelliğini etkileyecektir. Burada CMC konsantrasyonu arttıkça viskozitenin artması, kalın bir CMC katmanının oluşması ve bunun çapraz bağlanmasıyla az geçirgen bir mikroküre yüzeyi oluşması beklenmektedir. Mikroküre yapılabilecek konsantrasyon sınırlarına çıkıldıkça şişmenin artık etkilenmeyip bir çeşit platoya ulaşıldığı gözlenmektedir (Şekil 2).

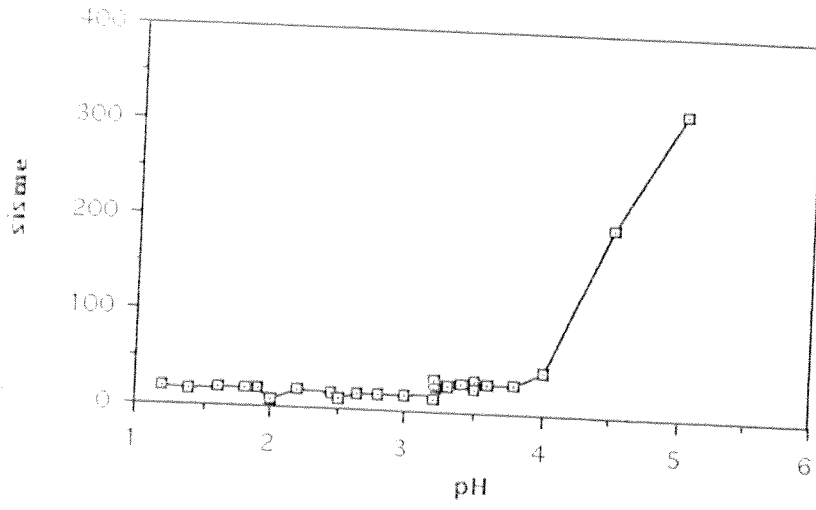
### Aldicarb Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması

İyice toz haline getirilip elekten geçirilen ( Millipore paslanmaz çelik filtre ; gözenek boyutu 0.25 mm) aldicarb, polimer çözeltisine hazırlık aşamasında katıldı ve pestisit yüklenmiş mikroküreler daha önce verildiği gibi hazırlandı. Tablo 3 deki mikroküreler ön çalışmalar için hazırlandı, esas çalışmalar bunların verdiği bilgiler ışığında Tablo 4 ve Tablo 5'teki ürünlere göre yapıldı.

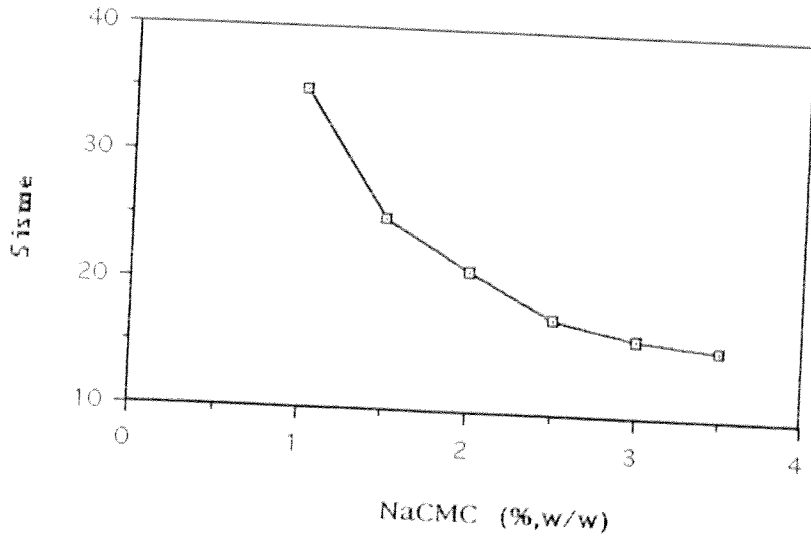
Tablo 3: Aldicarb Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanma Koşulları

Örnek *	[AlCl <sub>3</sub> ] (M)	pH	Aldicarb:NaCMC (w/w)
2.0/1.0/2.2	1.0	2.2	6:10
2.0/1.0/4.0	1.0	4.0	6:10
2.0/0.2/4.0	0.2	4.0	6:10
2.0/0.2/4.0	0.2	4.0	1.8:10

(\* Bütün örnekler düşük moleküler ağırlıklı NaCMC ile hazırlandı. Bekleme 2 sa, NaCMC konsantrasyonu %2.0 (w/w))



Şekil 1. pH'nın şişmeye etkisi



Şekil 2. NaCMC konsantrasyonunun şişmeye etkisi

Tablo 4. Salımda Kullanılan Bazı CMC Aldicarb Mikroküretinin Hazırlanma Koşulları

Örnek	CMC Mol. Ağırlık	[CMC] (%)	[AlCl <sub>3</sub> ] (M)	Aldicarb (g) / CMC (50 mL)
L22	DUŞUK	2	0.2	0.50
L24	DUŞUK	2	0.4	0.50
L26	DUŞUK	2	0.6	0.50
L32	DUŞUK	3	0.2	0.75
L34	DUŞUK	3	0.4	0.75
L36	DUŞUK	3	0.6	0.75
L44	DUŞUK	4	0.4	1.00
L46	DUŞUK	4	0.6	1.00
H22	YUKSEK	2	0.2	0.50
H24	YUKSEK	2	0.4	0.50
H26	YUKSEK	2	0.6	0.50
H32	YUKSEK	3	0.2	0.75
H34	YUKSEK	3	0.4	0.75

(Notasyon örneği L24: düşük mol ağırlıklı CMC, %2 CMC, 0.4 M AlCl<sub>3</sub>)

Tablo 5. Alan Uygulaması İçin Hazırlanan Örneklerin Özellikleri

Örnek	CMC (%)	AlCl <sub>3</sub> (M)	Aldicarb(g) / CMC çöz.(mL)
H22	2%(HI)	0.2	0.5/50
H24	2%(HI)	0.4	0.5/50
L46	4%(LO)	0.6	1.0/50

### **Aldicarb Salımı**

Aldicarb yüklenmiş NaCMC mikrokapsülleri (Tablo 4) (~100mg), diyaliz torbası (~7cm) içine yerleştirildi ve buna 2 mL salım ortamından katılarak 100 mL'lik mezür içinde bulunan 48 mL'lik salım ortamı içine yerleştirildi. Ortam sürekli manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı ve zaman zaman 100 µL örnek alıp spektrofotometrik olarak ortama çıkan aldicarb miktarı tayin edildi.

Salım verileri incelendiğinde çoğunluk örneklerde "burst effect" denilen, başlangıçta yüksek salım ve onu izleyen ve sabit olmayan bir salım mekanizması gözlenmektedir (Şekil 3-5). Ancak bazı örneklerde, örneğin L32, sıfır derece kinetiğe uygun sonuçlar verebilmektedir.

L22, L24, L26 ve H22, H24 ve H26 no'lu örneklerde özellikle çapraz bağın artışının salımdaki azalmaya neden oluşu gözlenmektedir (Şekil 3-4).

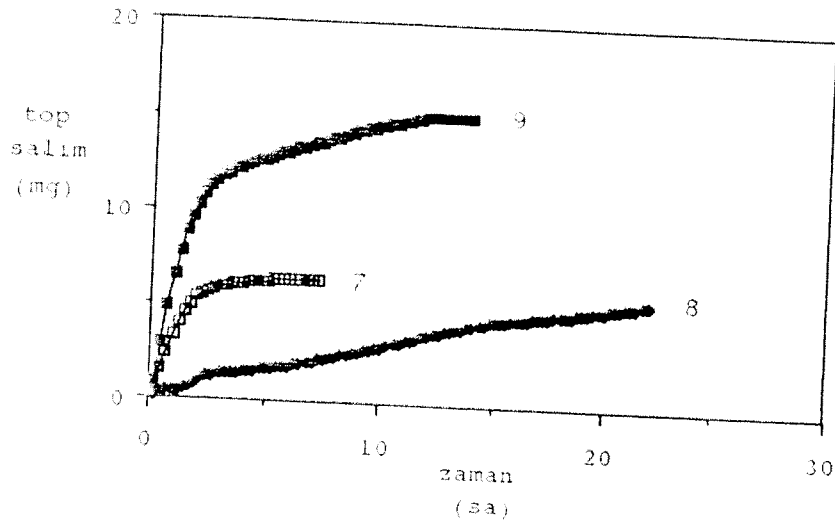
### **Saksı denemeleri**

Saksı denemelerinde Çukurova 1518 (*Gossypium hirsutum* L.) pamuk çeşidi materyal olarak kullanıldı. Ekim, çapı ve yüksekliği 40 cm olan ve eşit miktarda tarla toprağı ile doldurulup iki kez sulanmış saksılara, ocak yöntemi uyarınca, el ile her bir ocağı 3 tohum atılarak, aşağıdaki şekilde (Şekil 6) yapıldı.

Ocaklar, dolayısıyla bitkiler arasında 15 cm kadar aralık bırakıldı. Bu şekilde 11 saksı oluşturuldu. Çıkıştan sonra ocaklardaki bitkiler önce 2, sonra 1'e seyreltilerek, her bir saksıda 7 bitki oluşturuldu.

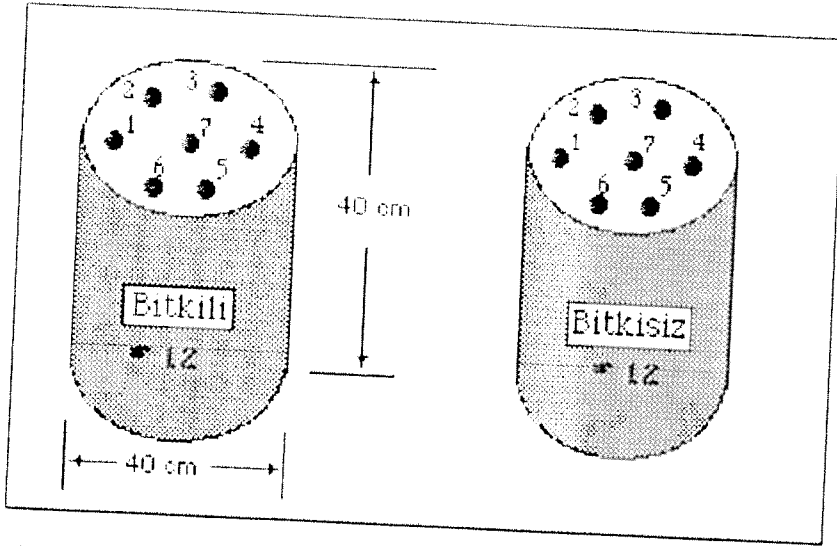
Aynı boyuttaki saksılara, her bir saksıya tohum ekilen saksılardakine eşit miktarda toprak konularak bitkisiz saksılar hazırlandı. Bu şekilde 10 saksı oluşturuldu (yeterli şelat olmadığı için 9'u denemede kullanıldı). Bitkilerin ilaçlanması dışında, bitkili saksılarda yapılan her işlem, bitkisiz saksılarda da yapıldı. Saksılar, dekara 12 kg saf azot (N), 6 kg saf fosfor (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) gelecek şekilde gübrelendi.



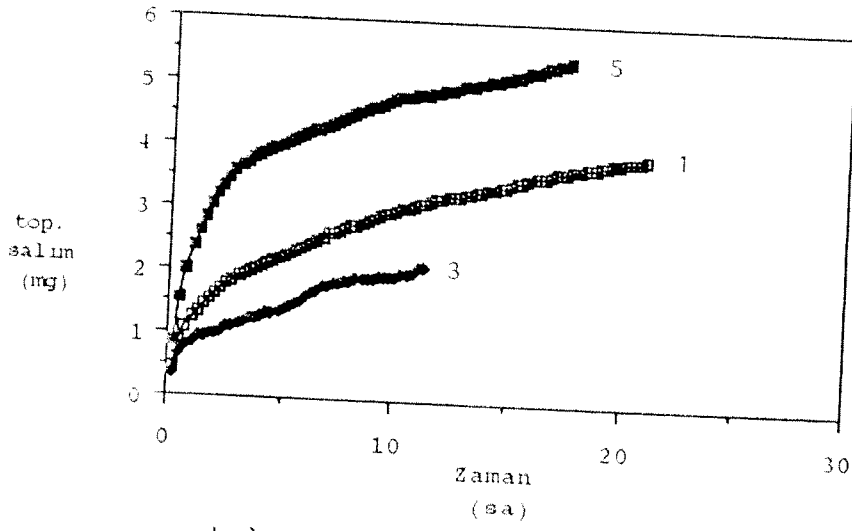


7, 8, ve 9 numaralı örneklerden salım

Şekil 5. #7 (L.42), #8 (L.32), #9 (L.34) örneklerinin in situ salım davranışı

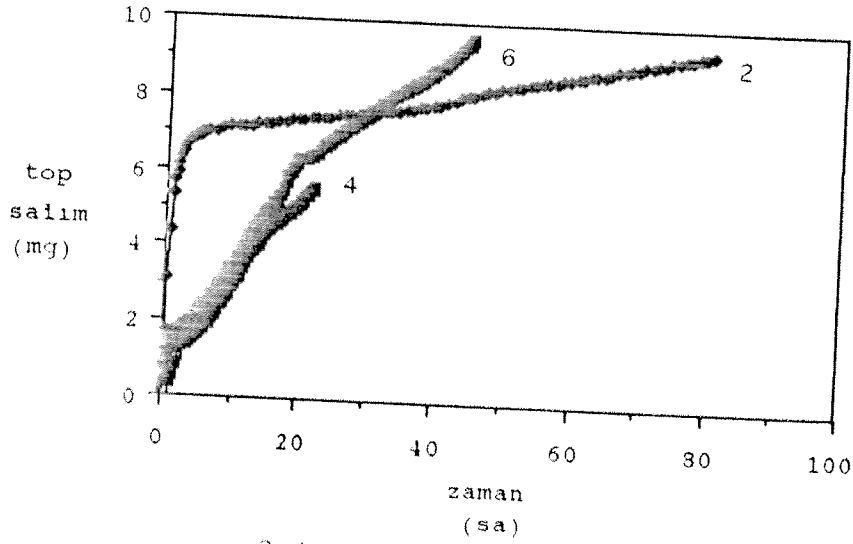


Şekil 6. Şematik olarak sakı uygulaması gösterimi



1, 3, ve 5 numaralı mikrokapsüllerden salım

Şekil 3/#1 (L22), #3 (L26), #5 (L24) örneklerinin in situ salım davranışı



2, 4 ve 6 numaralı örneklerden salım

Şekil 4/#2 (H22), #4 (H26), #6 (H24) örneklerinden in situ salım davranışı

5 Ağustos 1994 tarihinde , her birinde 7 adet bitki bulunan saksılara, her biri bir bitkinin yanyana gelecek şekilde eşit derinlikte ( 5 cm) açılan çukurların dibine birer adet 70 mg'lık mikrokapsül poşeti yerleştirilerek üstü toprakla örtüldü. (Burada 1000m<sup>2</sup>'ye 1800 g Temik ya da 270 g Aldicarb şeklinde olan genel uygulama ile paralellik istendiği için bu miktarlar seçildi).

Bu işlem, bitkili ve bitkisiz saksılarda, aşağıdaki gibi oluşturuldu:

Tablo 6: Saksı Uygulama Planı

Uygulamalar	Parsel No	Tekrarlama
<b>1) Kontrol</b> (Hiç bir uygulama yok)		
1.1. Bitkili	1 ve 6	2
1.2. Bitkisiz	1 ve 6	2
<b>2) H22 no'lu örnek</b>		
2.1. Bitkili	2 ve 7	2
2.2. Bitkisiz	2 ve 7	2
<b>3) H24 no'lu örnek</b>		
3.1. Bitkili	3 ve 8	2
3.2. Bitkisiz	3	1
<b>4) L46 no'lu örnek</b>		
4.1. Bitkili	4,9 ve 11	3
4.2. Bitkisiz	4 ve 9	2
<b>5) Temik (normal)</b> (Dekara 1800 g olacak şekilde)		
5.1. Bitkili	5 ve 10	2
5.2. Bitkisiz	5 ve 10	2

Tablo 7: Saksı sulama zaman ve miktarları

12 Ağustos 1994	5L
19 Ağustos 1994	5L
26 Ağustos 1994	7L
2 Eylül 1994	7L
9 Eylül 1994	7L
16 Eylül 1994	7L
23 Eylül 1994	7L

Böylece deneme 2 tekrarlamalı olarak oluşturuldu ve her bir saksıya eşit miktarda su verildi (Tablo 7). Su verme işlemi, her örnek alınımından sonra, 7 hafta süreyle tekrarlandı. Her hafta her saksıdan bir poşet ve çevresinden 4-5g toprakla alınarak ayrı ayrı pakelendi ve saklandı. Bu 7 hafta süreyle, yani tüm Aldicarb poşetleri çıkarılıncaya kadar sürdü.

#### Analiz Sonuçları

Poşetlerdeki mikrokapsül kalıntıları tartıldı ve mikrokapsül ağırlıklarının %40 düzeyine kadar azaldığı bulundu.

Mikrokapsüller hızla 2mL distile su ile topraktan arındırıldı, 2mL distile su eklendi ve homojenize edildi. Yüksek Aldicarb içeren örnekler 30 mL toplam hacme getirildi, bir gece boyu manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Az Aldicarb içerdiği düşünülen sonraki hafta örnekleri toplam 3 mL içinde hazırlandı, vortekslendi, ve bir gece bekletildi. Örnekler Eppendorf tüplerine alındı ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant içindeki Aldicarb UV spektrofotometresiyle tayin edildi.

Toprak örneklerinden ise 500 mg alındı ve bu 5mL distile su içinde homojenize edildi. Hacim 30 mL'ye getirilip bir gece boyu manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Örnekler önce 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, sonra süpernatantı 0.1µm gözenek boyutlu Millipore filtre ile süzülde. Elde edilen sıvı HPLC ile (Shimpak ODS C-18 kolonu, 6mm i.d. X 15cm) 1:1 metanol : distile su taşıyıcı fazıyla 247 nm'de incelendi.

Bu analizlerin sonucunda yalnız L46 numaralı örnekleri içeren örneklerin bulunduğu poşetlerden Aldicarb elde edilebildi (Tablo 8). H22 ve H24 no'lu örnekleri içeren mikrokürelerde hiç Aldicarb bulunmadı. Toprak örneklerinde de hiç Aldicarb bulunamadı.

Tablo 8: L46 No'lu Mikrokürelerin Aldicarb İçerikleri (Saksılardan çıkarıldıktan sonra)

PARSEL 4			PARSEL 9			PARSEL II	
Zaman (hafta)	Miktar (mg) Bitkisiz	Miktar (mg) Bitkili	Zaman (hafta)	Miktar (mg) Bitkisiz	Miktar (mg) Bitkili	Zaman (hafta)	Miktar (mg) Bitkili
1	2.98	2.88	1	1.27	--	1	4.49
2	--	0.98	2	1.15	1.70	2	2.05
3	--	0.23	3	0.27	1.06	3	0.93
4	--	--	4	--	--	4	0.20
5	--	0.15	5	--	0.93	5	--
6	--	--	6	--	--	6	--
7	--	--	7	--	--	7	--

Buna göre üç hafta süreyle ilaç salımının saksıdaki yüksek sulamalı koşulda sürebildiği gözlenmektedir (Şekil 7). Ticari olarak satılan Temikin hemen çözündüğü ve suya karıştığı göz önüne alınacak olursa bunun belirgin bir iyileşme olduğu anlaşılır.

#### Alan Uygulaması İçin Hazırlanan Örnekler

1995 yılı alan uygulaması için H22, H24 ve L46 no'lu mikrokapsül tiplerinden yenileri üretildi (Tablo 5).

#### Mikrokürelerin Ekstraksiyonu

İki ekstraksiyon yöntemi denendi. Birinci yöntemde 75 mg mikroküre 5 mL distile su içinde homojenize edildikten sonra bir gece bekletildi. Daha sonra santrifüjle (4000rpm, 15 dk) ayrılan süpernatant bir tübe transfer edildi ve 'pellet' lerin üzerine 5 mL distile su eklendi. Tüp 1 saat süreyle birçok defa vortekslendi ve yeniden santrifüjlenerek ayrılan süpernatant diğerinin üzerine eklendi.

İkinci yöntemde 75 mg mikroküre 2 mL distile su içinde homojenize edildikten sonra 100 mL'lik bir erlen içinde 30 mL toplam hacme getirildi ve bir gece magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Her iki metod sonunda örnekler Eppendorf tüplerine alındı ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant içindeki Aldicarb UV spektrofotometrisiyle ölçüldü.

#### Tarla Deneyleri İçin H22, H24 ve L46 İçin İn Situ Salım Çalışmaları

Her salım çalışması için 200mg mikrokapsül kullanıldı ve deney 25<sup>o</sup> C'de su banyosu içinde, peristaltik pompa aracılığıyla, sürekli olarak tsze çözeltisiyle (distile su) beslenerek 3 kez tekrarlandı (Tablo 9).

Tablo 9: Mikrokapsüllerdeki Aldicarb İçerikleri (Salım Sonuçları)

Örnek	Kümülatif salım (mg) (1. çalışma)	Kümülatif salım (mg) (2. çalışma)	Kümülatif salım (mg) (3. çalışma)
H22	10.59	7.82	9.68
H24	13.50	17.36	14.93
L46	23.06	--	22.25

Kullanılan akış hızı 80 mL/sa düzeyinde tutuldu. Toplanan örnekler UV spektrofotometresinde 247 nm de incelendi (Şekil 8).

Bu sonuçlardan, temel salım kinetikleri birbirine çok benzemekle beraber L46 no'lu mikrokürelerin çok daha yüksek düzeyde aldicarb içermekte ve salmakta olduğu görüldü.

Ekstraksiyon ve salım çalışmaları sonunda, enkapsülasyon verimi her örnek için hesaplandı (Tablo 10).

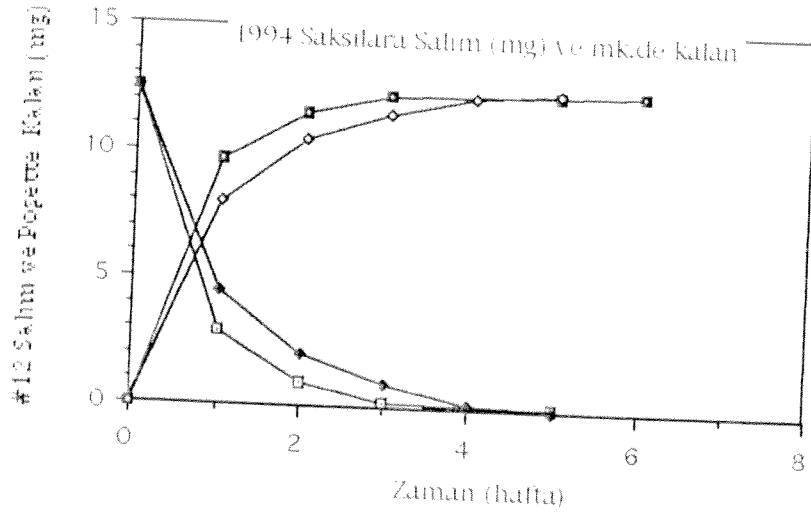
Tablo 10. Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Enkapsülasyon Verimleri

Örnek	Salım Verileri	Ekstraksiyon 1	Ekstraksiyon 2
H22	9.81	12.10	11.39
H24	16.36	19.95	17.53
L46	25.03	23.02	21.70

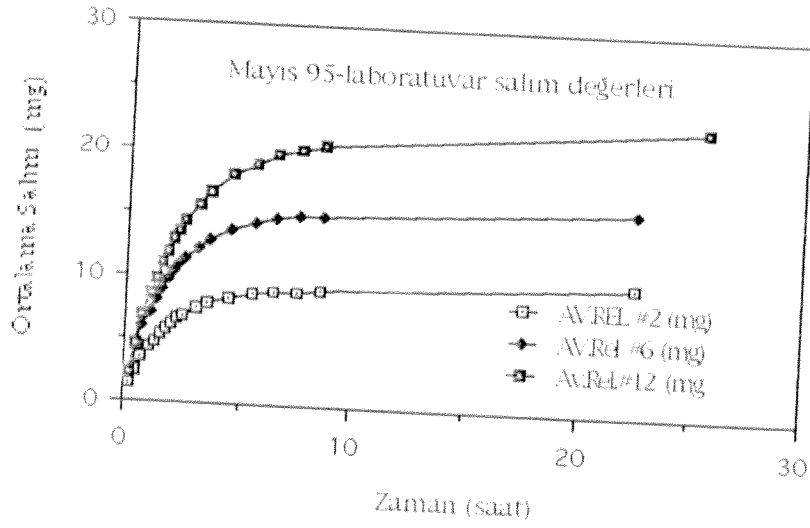
Bu sonuçlardan ilk ekstraksiyon metodunun ikinciye oranla daha etkin olduğu saptandı ve sonraki çalışmalarda bu yöntemin kullanılmasına karar verildi. Tarla uygulamasında kullanılacak mikrokürelerin enkapsülasyon verimleri ve aldicarb içerikleri birinci yöntem esas alınarak hesaplandı (Tablo 11).

Tablo 11: Tarla Denemelerinde Kullanılan, Aldicarb içeren Mikrokürelerin Özellikleri

H22 Enkap. Verimi (%)	H24 Enkap. Verimi (%)	L46 Enkap. Verimi (%)	H22 AS Yükleme (mg/100mg)	H24 AS Yükleme (mg/100mg)	L46 AS Yükleme (mg/100mg)
12.10	19.96	23.02	5.70	9.07	10.32



Şekil 7. 12 No'lu ( L46) örneğin saksı deney sonuçları



Şekil 8. Tarla uygulamasına giren örneklerin in situ uygulaması (#2: H22, #6: H24, #12: L46)

Tablo 11'de verildiği üzere aldicarb'ın enkapsülasyon verimi ortama konulan miktarın %12,10 ile 23.02'lik bir kısmını oluşturmakta olup ilaç enkapsülasyon verisi olarak düşük bulunmuştur. Ancak aldicarb'ın sudaki göreceli olarak yüksek çözünürlüğü hatırlanınca bunu doğal karşılamak gerekir. Ancak yine de bu düzeyde bir kullanılmamış pestisitü oluşturmamak için enkapsülasyon ortamını aldicarb'la doyurmak ve aliminyum klorür konsantrasyonunda da bir optimumda karar kılarak verimi çok artırmak mümkündür. Konsantrasyon gradyanını düşürmek amacıyla yapılan bu doyurma işlemi ön çalışmalarımızda verimin belirgin bir biçimde artabileceğinin sinyallerini verdi.

Çapraz bağlayıcı miktarına ve CMC konsantrasyonuna bağlı olarak enkapsülasyon miktar ve veriminin arttığı gözlenmesi bu parametrelerin ilaç yüklemede yararlanılabilecek parametreler olduğunu tekrar gösterdi.

### **Tarla Uygulamaları**

Projenin arazi çalışmalarına ilişkin bölüm Adana'da Çukurova Üniversitesi Pamuk Araştırma ve Uygulama Merkezinde yürütüldü.

Üç mikrokapsül tipinden (H22, H24 ve L46) her biri için plotlar hazırlandı. Her bir plotta 30'ar bitkili, 75 cm aralıklı 3'er sıra oluşturuldu. Boyu 6m, alanı  $2.25 \times 6 = 13.5 \text{ m}^2$  olan her bir plotta toplam 90 bitki vardı.  $1000 \text{ m}^2$ 'ye 270g Aldicarb hesabıyla 3.24g Aldicarb/plot ve 36mg Aldicarb/bitki olacak şekilde uygulama yapılmasına karar verildi. Bu dozları içerecek mikrokapsüller  $4 \text{ mm}^2$  gözenekli tüller içine paketlenerek ve bitki diplerine 5 cm derinliğe gömülerek, 7 hafta süreyle toprak ve poşet kalıntısı topraktan alındı. Ağustos 1994'te başlanan uygulama 5 örnekle yürütülmüştür.

#### **Örnek 1. Kontrol**

3 bitkili ve 3 bitkisiz saksıdan diğerleriyle aynı sıklıkla örnek alındı.

#### **Örnek 2. H22 No'lu Mikrokapsül**

2 adet bitkili 2 adet bitkisiz saksıda gerçekleştirildi. Dozu sağlayacak mikroküreler toplam 7 naylon poşete bölünmüş, poşetler toprağın 5 cm altına gömülmüş ve her hafta sonunda bir poşet topraktan çıkarıldı. Poşetin en yakın çevresinden kabaca 5 g. , saksının 20-25 cm derinliğinden yine 5 g. toprak alındı. Bu işlem 7 hafta sürmüştür.

**Örnek 3. H24 no'lu örneğe aynı işlem uygulandı.**

**Örnek 4. L46 no'lu örneğe aynı işlem uygulandı.**

**Örnek 5. Aynı işlem Temik kullanılarak uygulandı.**



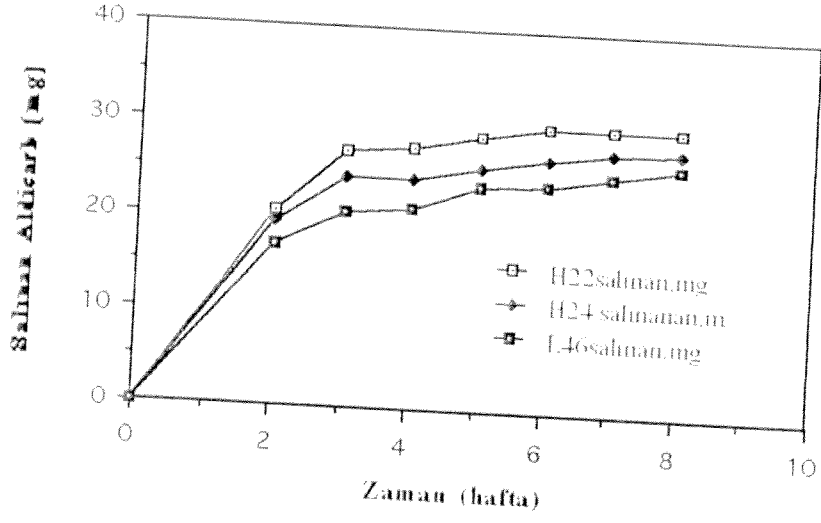
Şekil 9 .1995 ekim döneminde (Mayıs-Ağustos) uygulanan pamuk dikim ve aldicarb uygulama planını göstermektedir. Buna göre her bir parsel farklı bir mikrokapsül tipi ya da kontrol uygulanmış ve bu uygulama bloklar arası ve tüm alan içinde yer değiştirmeler gösterdi ve böylece çevre / komşu parsel etkisi en aza indirildi. Her bir bitki dibine 30 mg aldicarb içeren birer mikroküre poşeti (3, 4, 5 no' lu parseller için) uygulandı.

### **Tarla Uygulaması Sonuçları**

Mikrokapsüllerin aldicarb içerikleri yukarıda bahsedilen birinci ekstraksiyon metoduyla belirlendi ve salım sonuçları elde edildi (Şekil 10).

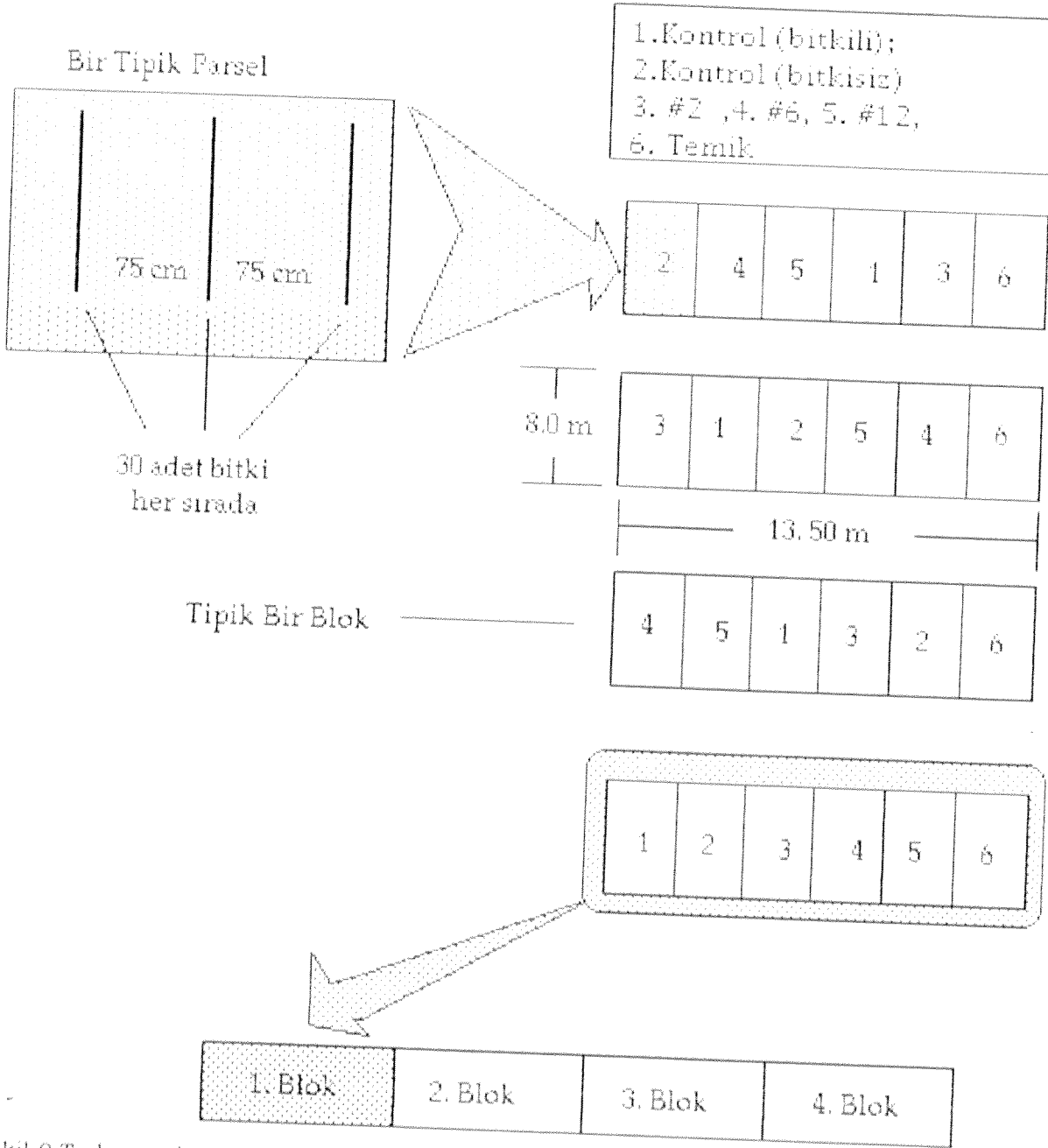
Sonuçlardan gözlemlendiği üzere 8 hafta süreyle salım yapılabilmekte ve özellikle 2. haftadan sonra salım sıfırıncı derece kinetiğe çok yaklaşmaktadır. Böylelikle kontrollü salımın bu zirai amaçla kullanımı olası konuma gelmektedir. Bir önemli nokta ise aldicarb içeriği en yüksek olan L46'nın saldığı pestisit miktarının H22 ve H24'ten daha az olmasıdır. Bu mikrokapsüllerde hala büyük miktarda pestisit kaldığını gösterir ki uygulamanın ömrünün 8 haftadan belirgin bir biçimde daha uzun olduğu anlaşılır. Buna neden olan parametrenin de büyük olasılıkla CMC'nin moleküler ağırlığının düşük olmasına karşın hazırlama ortamına diğerlerine oranla iki kat yüksek konsantrasyonla konması olduğunu gösterir. Bunu destekleyen bir gözlem zaten Şekil 2'de sunulmuştur.

Sonuç olarak 8 haftadan fazla bir süreyle toprakta doğal koşullar altında pestisit salabilecek yapının elde edildiğini belirtmek çok yerinde olacaktır.



Tarla Salım Sonuçları

Şekil 10. Tarla salım sonuçları



Şekil 9-Tarla uygulama planı (#2: H22, #6: H24, #12: L46)

## MİKROBİYAL DETOKSİFİKASYON

Karbamat pestisitlerin nötral pH'ya sahip ortamlarda kendiliğinden hidrolize uğradığı ve bu işlemin alkali ortamlarda daha da hızlı olduğu bilinmektedir. Ülkemizde karbamat pestisitler içinde en yaygın olarak kullanılanı Temik olup, bu maddenin aktif maddesini oluşturan Aldicarb'ın da hidroliz yoluyla daha az toksik ürünlere dönüşebildiği gösterildi. Bu tip bir işlemde mikroorganizmalar yer aldığına işlemin çabuklaştığı ve hidrolizin esteraz ve amidaz gibi belli enzimler tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir.

### TEMİK Kullanılarak Zenginleştirme Yöntemiyle Bakteri İzolasyonu

Adana yöresinden, pamuk hasatı öncesi, Temik (TAS) uygulanmış topraklardan, yüzeyin hemen altından (~5cm) alınan toprak örnekleri bakteri izolasyon işlemlerinde kullanıldı. 20 g elenmiş toprak örneği 500 mL'lik bir erlende 100 mL minimal ortam (MM) içinde süspansiyon haline getirildi, besiyeri ortamında tek enerji ve karbon kaynağı olarak % 2.0 (w/v) TAS kullanıldı. Süspansiyon 200 rpm/dk sallanarak oda sıcaklığında 10 gün süreyle inkübe edildi, örnekler alınıp uygun bir şekilde seyreltildi ve TAS-MM agar plaklarına ekildi.

### Aldicarbın ve Parçalanma Ürünlerinin Belirlenmesi

UV detektörlü, isokratik, "tersinir-faz" HPLC ayırma yöntemi kullanılarak Aldicarb ve parçalanma ürünlerinin (aldicarb sülfon ve aldicarb sülfoksit) miktarları ölçüldü. Aldicarbın UV de absorpladığı dalga boyu maksimumunun 247 nm olmasına rağmen, parçalanma ürünleri ile eş zamanlı olarak gözlenebilmesi açısından HPLC incelemesi 214 nm'de yapıldı. Mobil faz olarak metanol ve su (40:60) (v/v) ve akış hızı 1mL/dak olarak kullanıldı. Aldicarbı ve parçalanma ürünlerini ayırtmada siyanopropil-silika kolon kullanıldı.

### İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

TAS ve toplam toksik kalıntıları tanımlayabilmek için TLC kullanıldı. TLC için bilinen miktarlardaki test örnekleri kloroformda çözüldü (kültür ortamında yapıldığında kültür sıvısı kloroformla ekstre edildi.), analizde hem organik hem de sulu faz kullanıldı. Örnekler TLC plakalarına uygulandı (silica-60 F254, Merck) ve plakalar 10:0.1 kloroform-metanol karışımında banyoedildi. Plakalardaki noktalar UV altında ve iyot işlemiyle görünür hale getirildi, noktaların tanımlanması analitik saflıktaki referans örneklere ait Rf (relative front) değerlerinin karşılaştırılmasıyla yapıldı.

### **TAS' un Saflaştırılması**

Bakterilerin, TAS katılmış, sıvı ve katı besiyerlerinde iyi üremelerine karşın, HPLC ve TLC analizlerinde AS miktarında bir değişiklik saptanamamış olması nedeniyle TAS'nin Aldicarb dışında kullanılabilen (ticari formunda katkı maddesi olabilecek) bir başka karbon kaynağını içerebileceği düşünüldü, bu nedenle TAS saflaştırılmasına geçildi. Bu işlem, kloroformla ekstraksiyon ve onu izleyen silika kolon kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirildi.

### **Aldicarb Parçalayan Bakterinin İzolasyonu**

#### **Ortam ve Üreme Koşulları**

Analitik saflıkta kullanılan; Aldicarb sülfon (AS), Aldicarb sülfoksit (ASO), ve Aldicarb sülfür dioksit (ASO<sub>2</sub>) Riedel de Haen AG (Almanya)'dan sağlandı. Temik (TAS) Rhone-Poulenc (İstanbul) tarafından hediye edilmiştir. Organik çözücülerin tümü HPLC'nin gerektirdiği saflıkta kullanılmış olup, Merck AG'den sağlandı.

Bakteriyel izolasyon aşamasında Evans minimal besiyeri (sıvı-katı) kullanıldı, ortama filtrasyonla sterilize edilmiş % 0.02'lik saflaştırılmış TAS veya analitik saflıkta AS, tek karbon ve enerji kaynağı olarak ilave edildi. Kültürler, sallamalı su banyosunda ( 200 rpm) ve uygun sıcaklıklarda inkübe edilerek daha sonra katı ortama alındı. Bu yöntemle elde edilen 5 farklı izolatan Aldicarbı parçalama özellikleri HPLC ile zamana karşı incelendi.

#### **Bakterinin Aldicarbı Minimal Besiyerinde Üreme Özellikleri**

Aldicarbı en hızlı parçaladığı tesbit edilen bir izolatan 200 ppm aldicarb içeren minimal besiyerinde (0.01% maya özütü içermekte idi), 30°C ve 200 rpm çalkalama hızında üreme ve aldicarbı parçalama hızı HPLC, UV spektrofotometrisi ve hücre sayımı yapılarak belirlendi.

#### **Aldicarbın Parçalanmasında En Uygun Üreme Koşullarının Belirlenmesi**

Değişik aldicarb konsantrasyon, pH ve sıcaklık etkileri HPLC ile incelendi. Bundan sonraki bütün çalışmalarda buradan elde edilen sonuçlar uygulandı.

#### **Aldicarbın Zengin Besi Ortamında Biyolojik Yıkımı**

Aldicarb parçalanması minimal besiyerinden sonra, pepton (%0.3) ve maya özütü (%0.3) (PYE) içeren besi ortamında da incelendi. Bakteri çalkalamalı inkübatör içinde (30°C ve 200 rpm çalkalama hızında) 4 gün boyunca üretilip, örnekler 24 saat aralıklarla toplandı. HPLC analizleri için istenmeyen ara ürünler dietil eter yardımı ile üreme ortamından uzaklaştırıldı.

#### **Aldicarbı Parçalayan İzolatanın Karakterizasyonu**

Bakteri karakterizasyonu Bergey El Kitabı'ndaki (1994) testlere bağlı kalınarak ve karşılaştırmalı olarak gerçekleştirildi.

### **Ham Hücre Özütleri ile Çalışmalar**

Bakteriler 400 ppm aldicarb içeren PYE ortamında logaritmik faza kadar üretildikten sonra santrifügasyonla (3000 g, 15 dk.) besiyerinden ayrılıp izotonik tuz çözeltisinde 2 kere yıkanan, hücre özütleri Derbyshire'in (1987) belirttiği şekilde hazırlandı. 42g Bakteri hüresine 420mL Triton-X 100, 42mL 2-merkaptoetanol ve 10.5 mL gliserol eklenmek suretiyle süspansiyon hızla karıştırılıp 30 dk sonunda 170 mM NaCl, 16mM MgCl<sub>2</sub>, 11.5 x10<sup>3</sup> ünite/mL lizozim, 0.77 kunitz ünite/mL ribonükleaz ve 27 kunitz ünite/mL deoksiribonükleaz içeren 50 mM (pH 7.2) Tris-HCl tamponu eklendi. 20 dk. karıştırma ve 84 g soğutulmuş alumina ilavesinden sonra süspansiyon 10 dk daha karıştırılarak 27000 g'de 30 dk. sentrifüj edildi ve ham hücre özütleri elde edildi.

### **Aldicarbın Ham Hücre Özütleri Varlığında Parçalanması**

2 mL ham hücre özütü 8 mL 500 ppm aldicarb içeren Tris-HCl (pH 8.0) tamponu içerisinde 37°C de inkübe edildi, 10 dk. aralıklarla 1 mL örnek alınarak dietileterle ekstraksiyonlarından sonra HPLC yardımıyla analiz edildi.

### **Metilaminin Ham Hücre Özütlerinde Saptanması**

Aldicarbın enzimatik parçalanması sonucunda ortaya çıkan metilamin, Convey adı verilen üniteler yardımıyla tespit edildi. Convey ünitesinin dış haznesine yukarıda belirtilen enzimatik reaksiyon solüsyonu yerleştirildi, iç haznesine ise 0.1M HCl konuldu. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan metilaminin, iç hazmede bulunan HCl varlığında, metilamin.HCl'ye dönüşümü 2,4-dinitroflorobenzen yardımıyla spektrofotometrik olarak gösterildi. Kontrol grubu olarak aldicarb içermeyen ham hücre özütü ve kaynatılmış ham hücre özütleri paralel olarak kullanıldı.

### **Canlı Hücrelerde Oksijen Elektrodu Aracılığıyla Oksijen Tüketimi Ölçümü**

Çalışmanın birinci bölümünde Aldicarb ve benzeri karbamat pestisitlerin (karbaril ve karbofuran) canlı bakteri hücreleri üzerindeki etkileri araştırıldı, ikinci bölümde ise metilaminin metabolizması esnasında olası iki biyokimyasal metabolik yol ve bu yola ait ara ürünleri incelendi.

Her iki çalışmada da bileşiklerin canlı hücreler üzerindeki etkileri oksijen elektrodu yardımıyla incelendi.

Aldicarbın parçalanması ve oluşan metilaminin kullanılması açısından bakteri hücreleri iki farklı gruba ayrıldı, birinci grup bakteri hücreleri glikoz içeren, ikinci grup ise metilamin içeren minimal besiyerinde üretildi. Her iki grup bakteri hücreleri de gecikmiş logaritmik faza kadar üretildikten sonra fosfat tamponu (50mM, pH 7) ile iki kez yıkandı, santrifügasyon (5000 rpm 10 dk) sonunda, aynı tampon içine alınarak çalışmaya kadar buz içinde bekletildi.

Oksijen elektrodunun kapalı sistem hacmi 3mL'e, inkübasyon sıcaklığı ise 25°C'ye ayarlandı. Kapalı sisteme uygulanan bakteri hücrelerinin hacmi 3mL ve OD'si seyreltme yolu ile 1.00 olarak ayarlandı (kayıt cihazı hızı: 1cm /dk). Kapalı sistem içine bileşikler Hamilton şırınga yardımıyla 20mL olarak uygulandı.

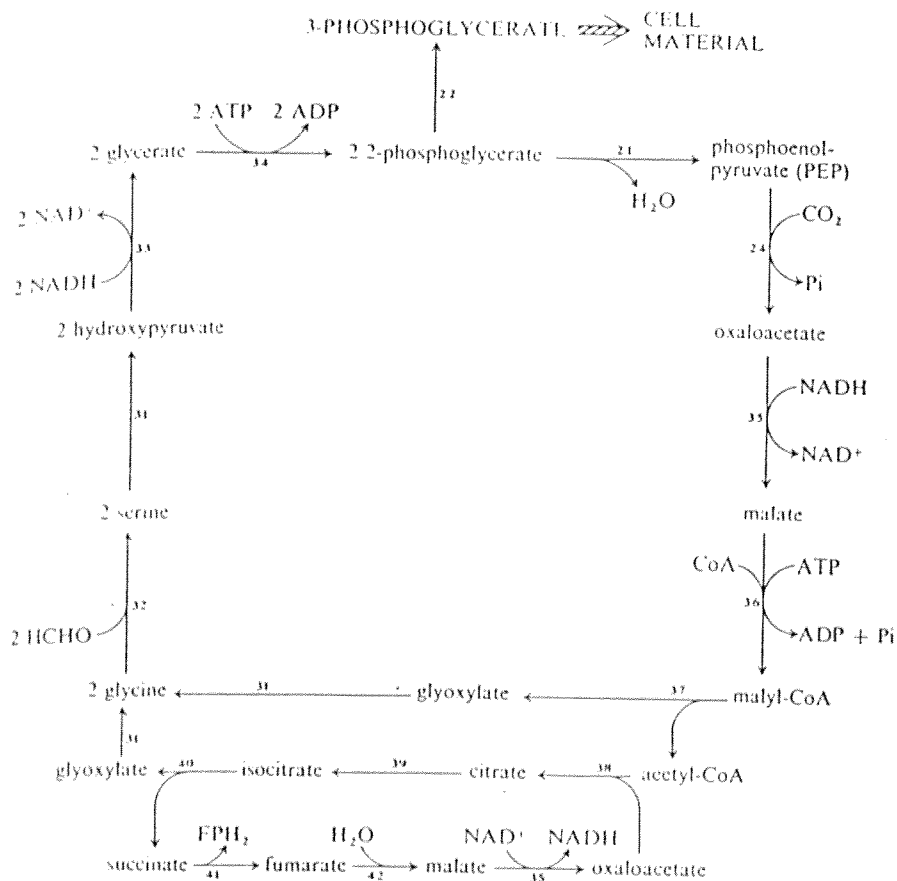
Birinci bölümde glikoz ve metilamin içeren ortamlarda üretilen hücrelerde, aldicarb, karbofuran ve karbanil (20mL, 100mM) ilavesiyle, ikinci bölümde ise her iki grup hücreye metilamin, aldicarb okzim, formaldehit, hidroksipiruvat ve formik asit (20mL, 100mM) ilavesiyle oksijen tüketim hızlarının artışı incelendi.

### **Aldicarbın Parçalanmasında Metabolik Yolların Belirlenmesi**

Degradasyonla ilgili yapılan son çalışmalarda Serin metabolik yolu (Şekil 11) üzerindeki diğer anahtar enzimlerin de varlığının gösterilmesi ve bu metabolik yolun metilamin (MA) ve dolayısıyla aldicarb (AS) varlığında indüklendiğinin gösterilmesi üzerine yoğunlaşıldı.

Bakteri hücreleri indüksiyonunun incelenebilmesi açısından iki farklı besiyerinde denenmiş olup, birinci grup bakteri hücresi süksinat içeren, ikinci grup ise metilamin içeren minimal besiyerinde üretildi.

Her iki grup bakteri hücresi de gecikmiş logaritmik faza kadar üretildikten sonra, çalışılacak enzim sistemine bağlı olarak, fosfat (50 mM pH 7) veya Tris-HCl (50 mM pH 7.5 ) ile iki kez yıkanıp, santrifügasyon (5000 g 10 dak.) sonunda aynı tamponda çözüldü. Örnekler buz içinde 15 dak. bekletildikten sonra, 2 dakika boyunca, 0.5 saniye aralıklarla sonikasyona tabi tutuldu, sonikasyon sonucunda parçalanan hücreler 27000 gX'de 30 dak. santrifüj edilerek kalan canlı hücreler ve yüksek moleküler ağırlığı olan fraksiyon (pelet) uzaklaştırıldı. Kalan sıvı fraksiyon (süpernatant) ham bakteri özütü olarak kullanıldı. Bütün deneyler taze ham hücre özütü hazırlanarak ve özütler bekletilmeden yapıldı.



The serine pathway of formaldehyde assimilation (*icl<sup>+</sup>* variant). The *icl<sup>-</sup>* variant differs from this in lacking a measurable malate thiokinase and in having an alternative route for oxidation of acetyl-CoA to glyoxylate not involving isocitrate lyase. Precursors can be removed from the cycle at the level of oxaloacetate or of succinate (see Fig. 15). The enzyme numbers refer to those in the text: (21) enolase; (22) phosphoglycerate mutase; (24) PEP carboxylase; (31) serine-glyoxylate aminotransferase; (32) serine transhydroxymethylase; (33) hydroxypyruvate reductase; (34) glycerate kinase; (35) malate dehydrogenase; (36) malate thiokinase; (37) malyl-CoA lyase; (38) citrate synthase; (39) aconitase; (40) isocitrate lyase; (41) succinate dehydrogenase; (42) fumarase.

Şekil 11. Serin Metabolik Yolu



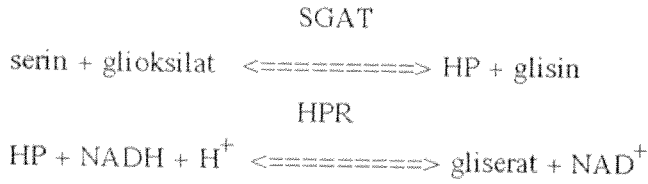
### İncelenen enzimler;

1. Serin glioksilat amino transferaz
2. Hidroksipürivat redüktaz
3. Gliserat kinaz
4. Fosfoenolpürivat hidrataz
5. İzositrat liyaz
6. Formaldehit DH

Enzim aktiviteleri aşağıda belirtilen şekilde ölçülmüş olup, tüm aktiviteler oda sıcaklığında takip edildi.

#### 1. Serin glioksilat amino transferaz (SGAT);

SGAT enzimin aktivitesi reaksiyon sonucunda oluşan hidroksipürivatın (HP) HPR enzimi yardımıyla NADH'in NAD' ye oksitlenmesi 340 nm'de spektrofotometrik yöntemler kullanılarak izlenmiştir (Harder ve Quayle 1971).



#### 2. Hidroksipürivat redüktaz (HPR);

Bu enzimin varlığı, yukarıda belirtildiği şekilde, NADH oksidasyonunun 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesine bağlandı (fosfat tampon çözeltisi; 50mM., pH 7.0).



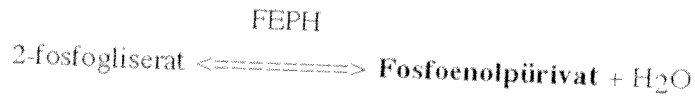
#### 3. Gliserat kinaz (GK);

GK enzimi, gliseratın, HP'den yüksek NADH konsantrasyonunda ortaya çıkması (HP+NADH/EGl<sub>1</sub>+ NAD<sup>+</sup>) ve sonradan oluşan gliseratın, bu enzim yardımıyla, standart pürivat kinaz ve laktat dehidrogenaz ile eşlenmesi esasına bağlı olarak ölçüldü. Gliserat kinaz enziminin aktivitesi ile oluşan ADP'in, pürivat kinaz (PK) enzimi eşliğinde ve fosfoenol pürivat eklenmesiyle pürivatı oluşturduğu bilinmektedir. Oluşan ADP ve pürivat 1:1 oranında olup, laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin varlığında NADH'in NAD<sup>+</sup> 'ye oksitlenmesi 340 nm de takip edilebilmektedir (fosfat tampon çözeltisi; 50 mM., pH 7.0).



#### 4. Fosfoenolpürivat hidrataz (FEPH);

FEPH enzim aktivitesi, reaksiyon sonucunda oluşan fosfoenolpürivatın, pürivat kinaz ve laktat dehidrogenaz enzimlerinin eşlenmesi yardımıyla takip edilebilmektedir. Enzimin kendi substratına spesifik olduğu, 3-fosfogliseratın analog sübstrat olarak denenmesi yoluyla gösterildi (tampon çözelti Tris-HCl ;50mM., pH 7.5)



#### 5. İzositrat liyaz (İSL);

Dion ve Komberk'in (1959) metodlarında ufak değişiklikler yapılarak, glioksilattan, glioksilat fenilhidrozonun kimyasal oluşumu 324 nm'de takip edildi (Tampon çözelti Tris (50mM) pH 7.5).



#### 6. Formaldehit dehidrogenaz (FDH);

Bu enzim, serin metabolik yolunda yer almamakla beraber, MA' dan formaldehit oluşumunda yer almaktadır. Enzimin takibi, Jacoby'in (1957) glikolaldehid dehidrogenaz enzimini takip

yönteminin modifikasyonu ile gerçekleştirildi. FDH enziminin varlığında NADH ın NAD<sup>+</sup> ye oksidasyonu 340 nm de takip edildi (tampon çözelti Tris-HCl; 50mM, pH 7.5). Formaldehit solüsyonu %1 oranında metanol (MeOH) içerdiği için, olası bir metanol dehidrogenaz enziminin aktivitesi açısından da incelendi.

### **Biyolojik Yıkımın Toprakta İncelenmesi**

Aldicarbın toprakta ve bakteri varlığında parçalanması 1L hacimli saksılarda incelendi. Tamamen kurutulmuş ve sterilize edilmiş 1 kg'lık toprak örnekleri saksılara yerleştirildi, her saksıya 0.36 g TAS uygulaması yapıldıktan sonra, saksılar bakterili ve bakterisiz olarak iki gruba ayrıldı, ilk grup saksılara 25 mL (logaritmik faza kadar üretilip izotonik çözeltisi hazırlanan) bakteri uygulandı. İki grup saksı 12 gün boyunca 20 mL şehir suyu ile sulandı, her gün saksılann dibinden birer gram örnek alındı. Örnekler, yukarıda belirtilen şekilde, dieteleter ekstraksiyonu yardımıyla topraktan gelebilecek istenmeyen kısımlardan ayrıldıktan sonra HPLC yardımıyla incelendi.

### **TEMİK Kullanılarak Toprak Bakterilerinin Zenginleştirilmesi Sonuçları**

TAS'da gözlenen ve katkı maddelerinden kaynaklanan kontaminasyon zenginleştirmeyi olumsuz etkilediği için, TAS yerine PTAS (saflaştırılmış TAS ) kullanılmış olup, bakteriyel degradasyonun kullanılan PTAS konsantrasyonuna bağlı olarak, 48 ile 114 saat arasında değiştiği bulunmuştur.

### **Aldicarbın ve Parçalanma Ürünlerinin HPLC Yoluyla Belirlenmesi**

Aldicarbın nitelik ve nicelik açısından ölçümü bu sistemde 6.3 dakikada gelen tepenin değeri yardımı ile yapıldı. Diğer olası ürünler, aldicarb sülfon ve aldicarb sülfoksitin, tepe değerleri sırasıyla 4.55 dk ve 4.1 dk olarak elde edilmişlerdir (Şekil 12).

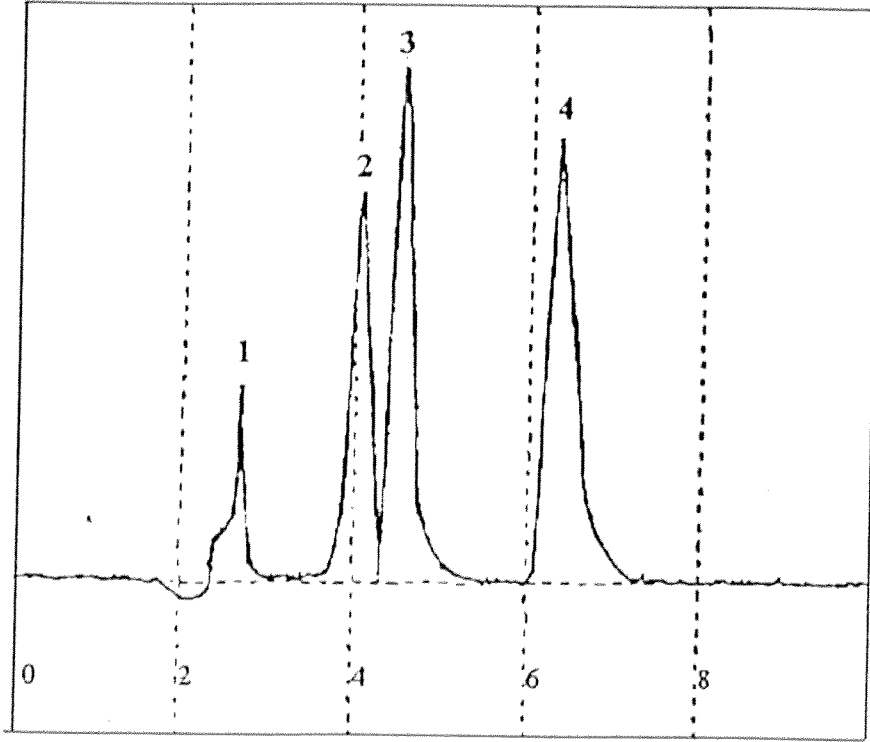
### **TLC sonuçları**

TAS'ın içinde bulunan ve analitik saflıktaki aldicarbın Rf değerlerinin aynı olduğunu (Rf = 0.79) ve TAS'ın saflaştırılması sonucunda diğer istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırıldığını gösterdi. Bu sonuçlar HPLC yardımıyla da doğrulandı (Şekil 13.)

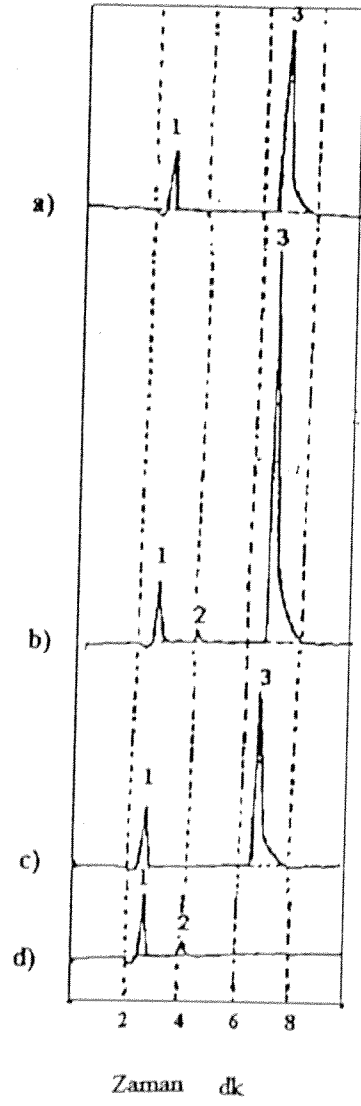
### **Aldicarbı Parçalayan Bakterilerin İzolasyonu**

Zenginleştirme sonucunda aldicarbı parçalama özelliğine sahip 5 farklı bakteri izolatu elde edildi. Bu bakterilerin aktiviteleri 200 ppm aldicarb konsantrasyonunda zamana karşı izlendi (Şekil 14). HPLC sonuçları, bu bakterilerin aldicarbı farklı sürelerde aynı parçalanma ürününe dönüştürdüklerine işaret etmektedir.

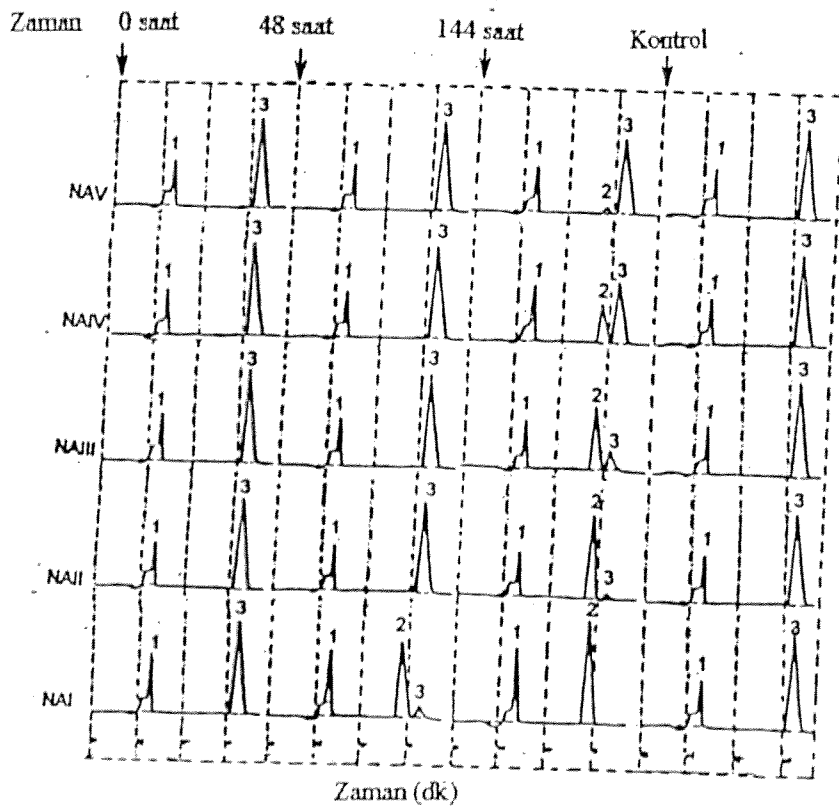
Bu bakteriler arasından en yüksek aldicarb parçalama aktivitesi gösteren izolat daha sonraki çalışmalar için seçildi.



Şekil 12. Aldicarb, aldicarb sulfon ve aldicarb sulfoksid'in HPLC Kromatogramları. 1: Minimal ortam (2.5 dak.), 2: Aldicarb sulfoksid (4.1 dak.), 3: Aldicarb sulfon (4.55 dak.) ve 4: Aldicarb (6.1 dak.).



şekil 13. TAS saflaştırmasının HPLC'le incelenmesi. (a) Analitik saflıkta aldıcarbın , (b) dorofomla ayrıştırılmış TAS'ın. (c) Silika kolon kromatografisi ile ayrıştırılmış TAS'ın ilk 10 mL'lik fraksiyonun ve . Silika kolon kromatografisi ile ayrıştırılmış TAS 'ın 40-50 mL'lik fraksiyonunun HPLC kromatogramları.



Sekil 14. Aldicarbı parçalayan beş bakteri izolatu.

### **Bakterinin Üreme Özelliklerinin Belirlenmesi**

Aldicarbın biyolojik yıkımında, aldicarb konsantrasyonu, pH ve sıcaklık etkisi sırasıyla Şekil 15-17 de verildi. Bu sonuçlar, 200 ppm aldicarbın 30°C de ve pH 8' de en hızlı şekilde biyolojik yıkıma uğradığını gösterdi. Aldicarbın parçalanmasıyla bakteriyel üreme arasındaki ilişki bu değerler ışığında incelendi (Şekil 18).

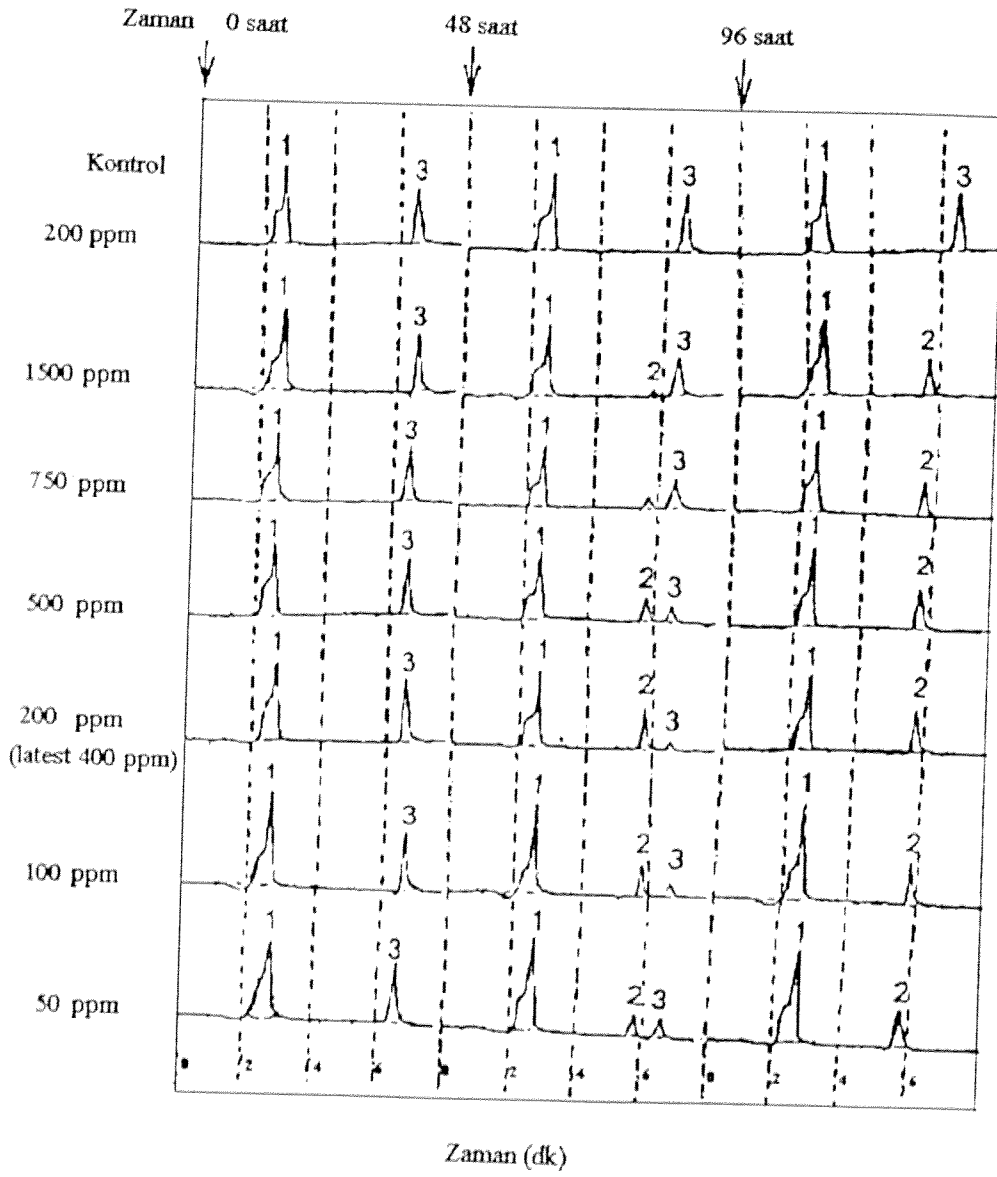
Bakterinin devamlı olarak Aldicarb ile inkübasyonu sonucunda, daha yüksek Aldicarb miktarlarının daha kısa zamanda parçalandığı gözlenmiş, bu da Aldicarb yıkımından sorumlu enzimin indüksiyona tabi olduğu fikrini doğurmuştur.

### **Aldicarbın PYE Ortamında Parçalanması**

Bakterinin aldicarbı PYE ortamında parçalaması ve bakteriyel üreme arasındaki ilişki araştırıldı ve en yüksek parçalama hızının 30° C sıcaklıkta, 400 ppm aldicarb konsantrasyonunda ve pH 7 de olduğu gözlemlendi (Şekil 19).

### **Bakteri Karakterizasyonu**

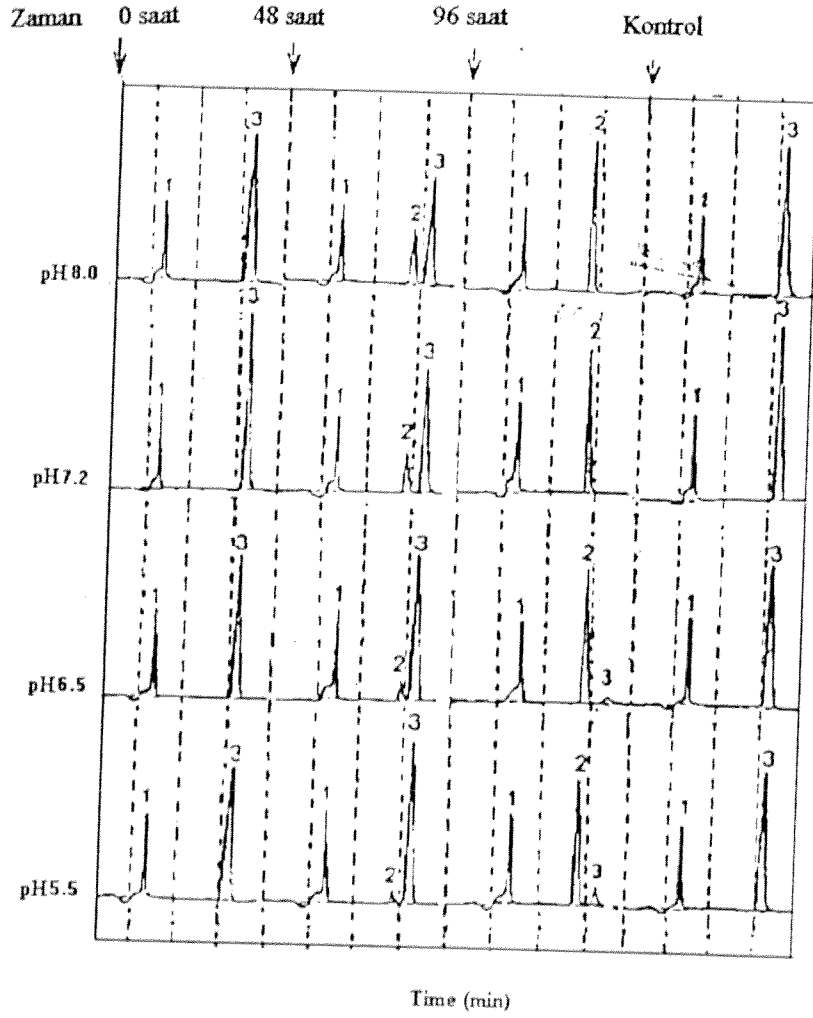
Bu testlerin sonuçları, Aldicarbın biyolojik yıkımını sağlayan bakterinin *Methilophilus* cinsine ait olduğunu gösterdi. Ancak, tür özelliklerinin bilinen bir tür ile tamamen uyum göstermemesi, bakterinin yeni bir tür olabileceğine işaret etmektedir (Tablo 12).



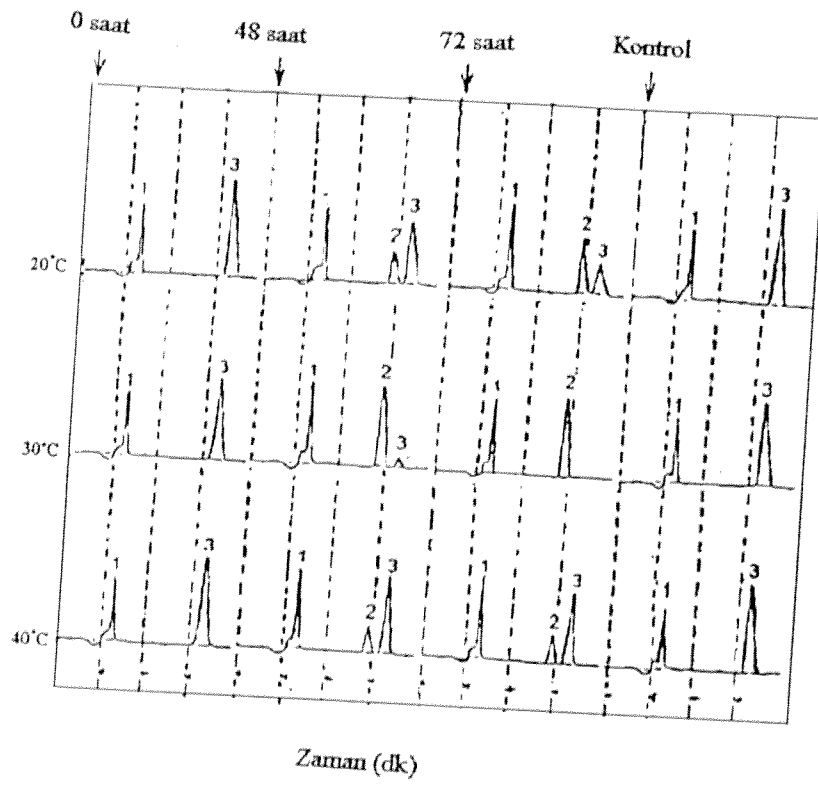
Şekil 15. Aldikarbın bakteriyel parçalanmasında aldicarb konsantrasyonu etkisi.

30  
15.15

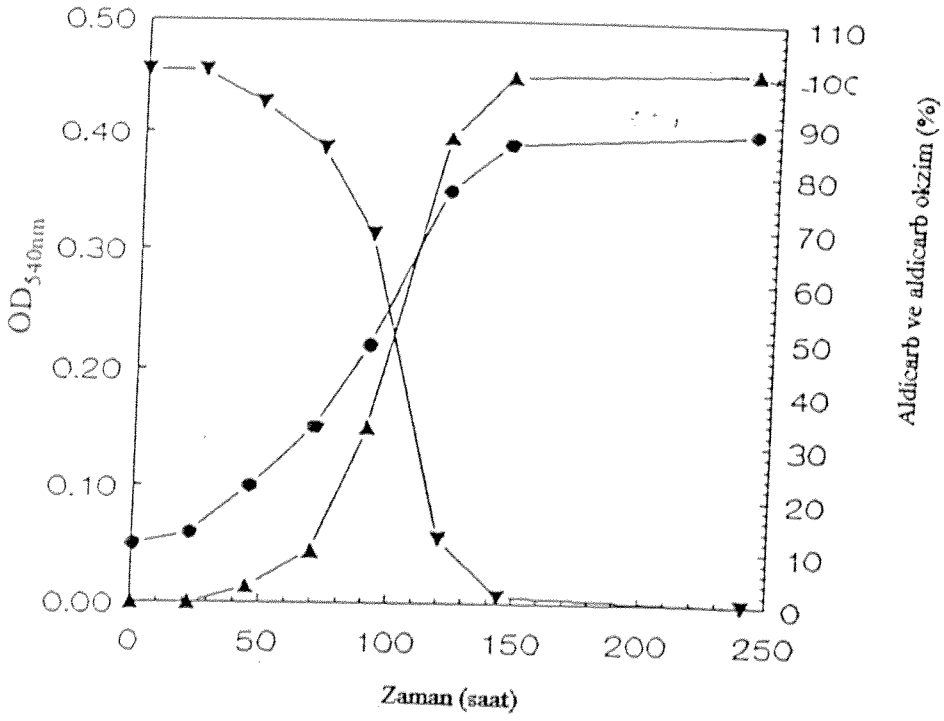




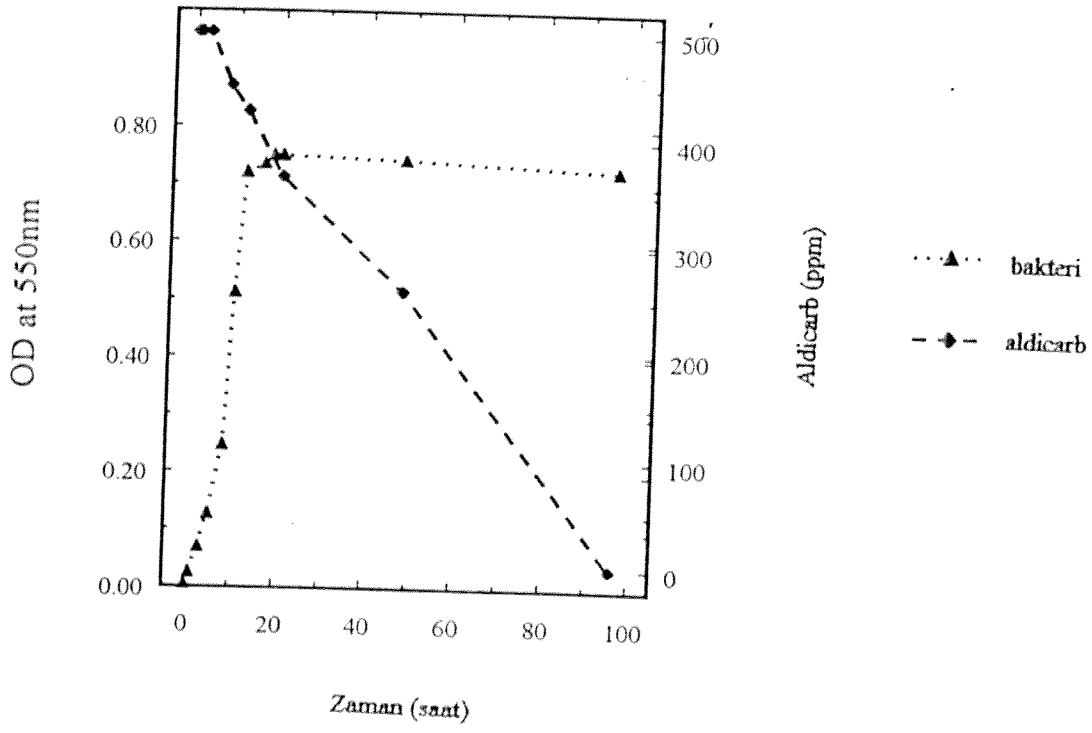
Şekil 16. Aldikarbın bakteriyel parçalanmasında pH etkisi.



Şekil 17. Aldikarbim bakteriyel parçalanmasında sıcaklık etkisi.



Şekil 18. Minimal ortamda bakteriyel üreme ve aldicarb parçalanmasının karşılaştırılması



Şekil 19. FYE ortamında bakteriyal üreme ve aldicarb parçalanmasının karşılaştırılması

Tablo 12. Karakterizasyon testlerinin sonuçları

Gram boyama	-	Motilite testi	+	Sükroz	-
Katalaz üretimi	+	Üreaz üretimi	+	Mannoz tüketimi	-
Oksidaz üretimi	+	Lizin tüketimi	+	Fruktoz tüketimi	+
Nişasta hidrolizi	+	Arjinin tüketimi	-	Galaktoz tüketimi	-
Tween 80 hidrolizi	-	Ornitin tüketimi	-	Arabinoz tüketimi	-
Tween 60 hidrolizi	+	Indol üretimi	-	Mannitol tüketimi	-
Tween 40 hidrolizi	+	H <sub>2</sub> S üretimi	-	Sitrat tüketimi	-
Tween 20 hidrolizi	+	Gaz üretimi	-	Alkol tüketimi	+
Jelatin hidrolizi	-	Glukoz tüketimi	+	Metilamin tüketimi	+
Nitrat indirgenmesi	+	Laktöz tüketimi	-	Metanol tüketimi	+

Tablo 13. Aldicarb okzimin spektroskopik karakterizasyonu.

Bileşik	Birinci $\lambda_{max}$ (nm)	İkinci $\lambda_{max}$ (nm)
Aldicarb	193	247
Aldicarb sülfoksit	195	245
Aldicarb sülfon	201	-
Aldicarb okzim	197	238
Bakteriyel yan ürün	197	238

Tablo 14. Aldicarb okzimin TLC karakterizasyonu.

Bileşik	TLC Rf değerleri (Sistem A)	TLC Rf değerleri (Sistem B)
Aldicarb okzim	0.88	0.85
Aldicarb sülfoksit	0.14	0.39
Aldicarb sülfon	0.44	0.29
Bakteriyel yan ürün	0.88	0.85

Sistem A: benzen : diokzan (1:1 v/v)

Sistem B: kloroform: n-hekzan: etil asetat: diokzan (5:1:1:1 v/v)

Tablo 15. Aldicarb okzimin HPLC'le karakterizasyonu.

Bileşik	Tepe zamanı (dk)
Aldicarb	6.3
Aldicarb okzim	5.6
Aldicarb sülfoksit	4.1
Aldicarb sülfon	4.55
Bakteriyel yan ürün	5.6

### **Aldicarbın Parçalanma Ürünlerinin Karakterizasyonu**

Aldicarb'ın NaOH (1M) içinde Aldicarb okzime dönüştüğü bilinmektedir. Bu uygulamaya çalışmada da yer verildi ve elde edilen ürünle bakteriyel degradasyon sonucu ortaya çıkan ürün spektrofotometrik, TLC ve HPLC aracılığıyla karşılaştırıldı, bunların aynı madde (aldicarb okzim) oldukları gözlemlendi (Tablo 14, Tablo 15).

### **Ham Hücre Özütleriyle Aldicarbın Parçalanması**

Aldicarbın parçalanması sonucunda ortaya çıkan aldicarb okzimin bu oluşum üzerinde inhibitör etkisi gösterildi. Enzimin 37°C ve Tris tamponunda (pH 8) 500 ppm Aldicarbı 110 dk içinde yarı yarıya aldicarb okzime parçaladıktan sonra aktivitesini kaybettiği gözlemlendi. 110 dakikalık reaksiyon karışımının, üzerine eklenen enzim preparatı veya aldicarb, reaksiyonun devamında hiç bir rol oynamadı (Şekil 20).

Canlı hücreden arındırılmış ham hücre özütlerinde yapılan biyokimyasal araştırmalar, aldicarb'ın bir esteraz enzimi yardımıyla aldicarb okzim ve metil amine dönüştürüldüğüne işaret etmektedir. Burada oluşan metilamin'in dinitroflorobenzen'le reaksiyonu bu molekülün bulunmasında kriter olarak kullanıldı.

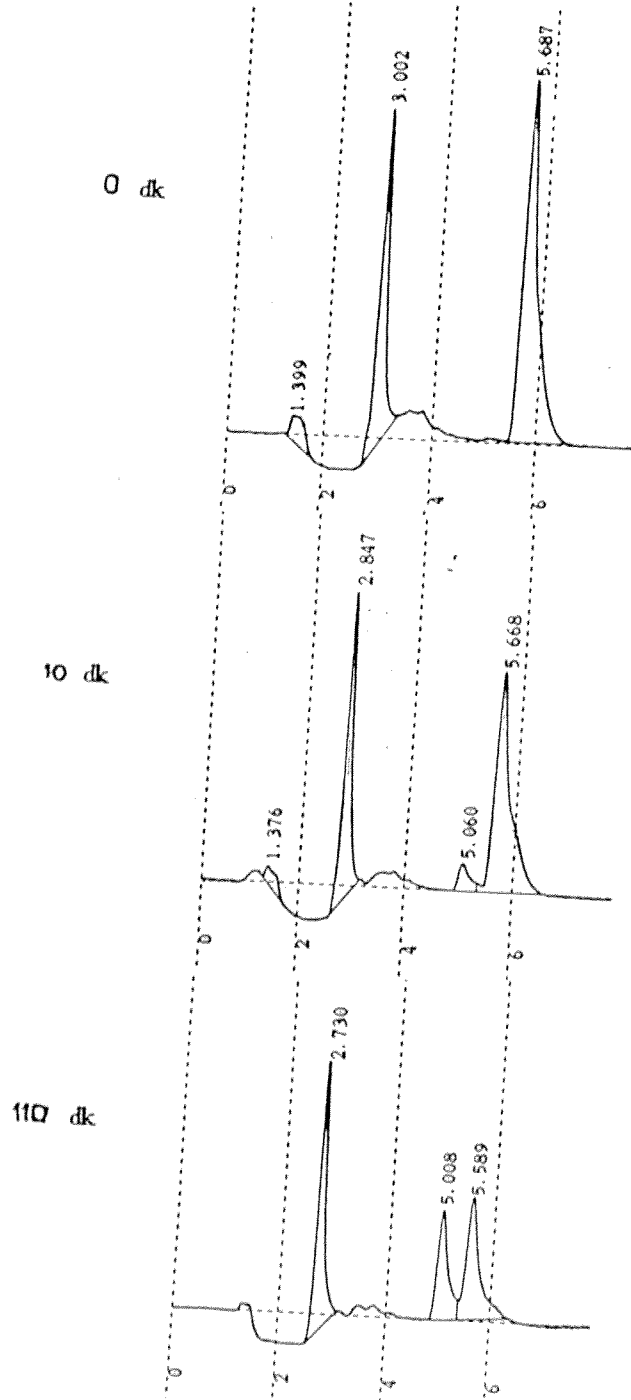
Ham hücre özütlerinde aldicarb yıkımı, aldicarb konsantrasyonu, sıcaklık ve üreme ortamının pH'sı açısından optimize edildi. En yüksek yıkım değerleri 400 ppm aldicarb konsantrasyonunda, 37°C ve pH 8 'de elde edildi.

### **Enzimatik Parçalanma Sonrası Oluşan Metilaminin Gösterilmesi**

Ham hücre özütleriyle aldicarbın inkübasyonu sonucunda, 260 ng metilaminin varlığına raslandı. Bu, yaklaşık bulunması gereken miktardan 100 kat daha az bir miktar olarak hesaplandı. Bu fark aslında ham hücre özütlerinde bulunması beklenen metilaminin asimilasyonunun varlığı ile açıklanabilir.

### **Canlı Hücrelerde Oksijen Elektrodu Aracılığıyla Oksijen Tüketimi Ölçümü**

İki farklı ortamda (glikoz ve metilamin içeren minimal ortamlar) üretilen bakteri hücreleri iki bölüm halinde incelendi. Araştırmanın birinci bölümünde aldicarb ve benzeri karbamat pestisitlerin oksidasyon yolları hakkında bilgi edinilmek istendi. Kullanılan her iki ortamda da aynı etkinin görülmesi, bakterinin indüksiyondan bağımsız olarak devamlı üretilen bir esteraz/hidrolaz enziminin varlığına işaret etmektedir. Araştırmanın ikinci bölümünde ise metilaminin hangi metabolik yolla parçalandığı öncelikli olarak araştırıldı. Buradaki sonuçlar metilamin içeren minimal ortamda üretilen hücrelerin *Serine Metabolik Yolu* üzerindeki hidroksi pirivat bileşiğine duyarlı olduğuna işaret etdi. Sonuçlar Tablo 16'de özetlendi.



Şekil 20. Ham hücre özütlerinin yardımıyla aldikarbın enzimatik hidrolizi.

46/20

Tablo 16. Çeşitli bileşiklerin bakteriyel oksijen tüketim hızı üzerine etkileri

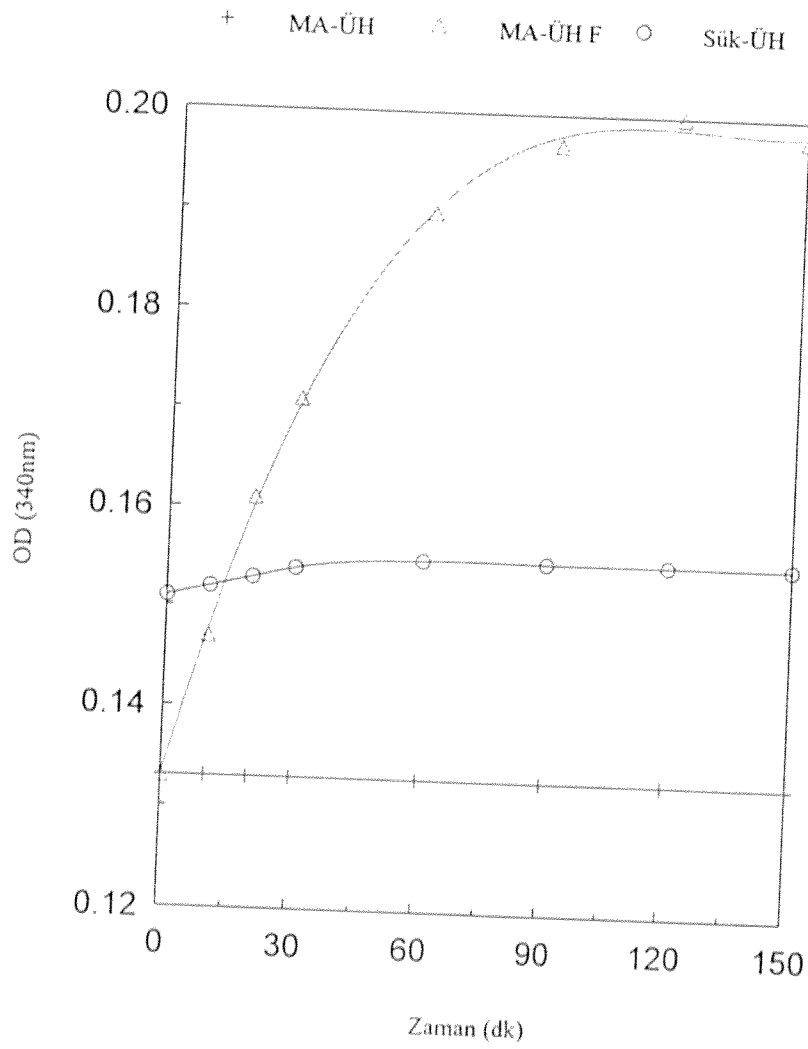
Bileşik	Bakteriyel oksijen tüketim hızındaki değişim (nmol/dk)	
	Metilamin+MMde üretilen bakteri	Glikoz+MMde üretilen bakteri
Aldicarb	11.4	21.3
Karbofuran	19.0	17.5
Karbaril	11.4	11.4
Aldicarb okzim	< 0	0
Metilamin	151.8	3.8
Formaldehit	110.1	0
HP	3.8	0
Formik asit	0	0
Metanol	0	0
Glikoz	0	30.4

Aldicarb okzim uygulamasında bakteriyel oksijen tüketiminin metilamin minimal ortamda üretilen bakteri hücrelerinde eksi değerlere düşmesi bir kere daha bu bileşiğin bakteri için toksik olduğuna işaret etmektedir. Bu aktivitenin glikoz varlığında üretilen hücrelerde görülmemesi aldicarb okzimin metilamin metabolizmasına özel bir inhibe edici etkisi olduğuna işaret etmektedir.

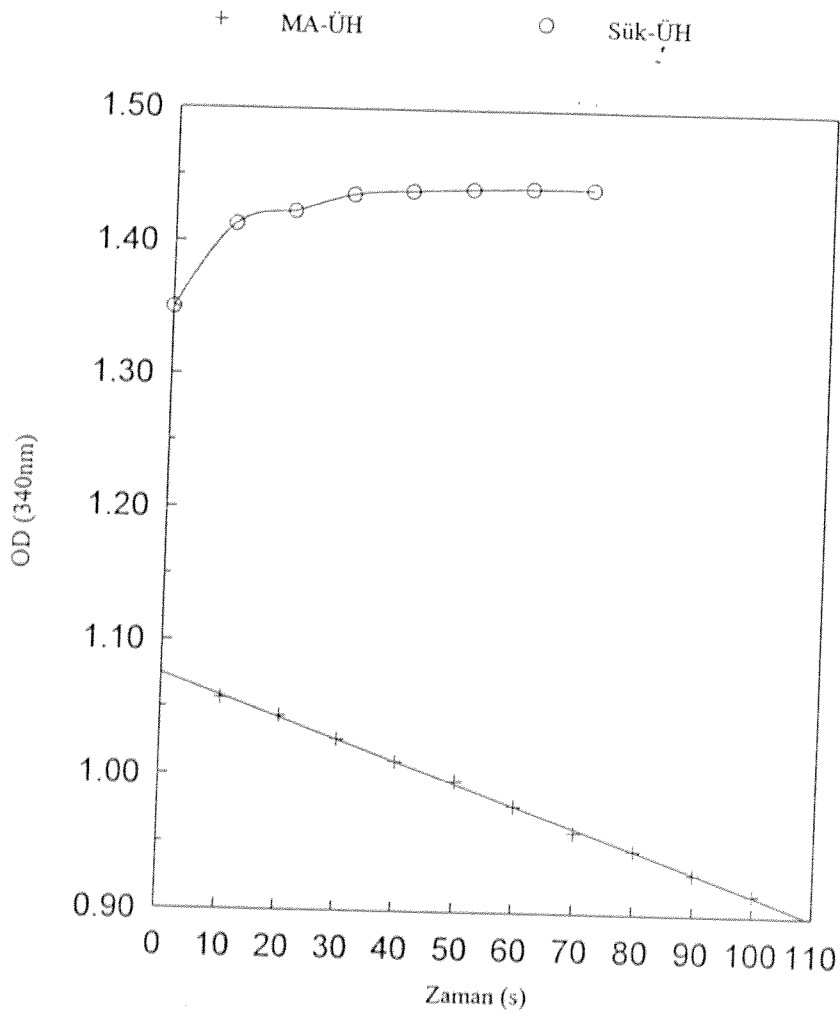
#### **Aldicarb Biyodegradasyonunda Metabolik Yolların Belirlenmesi**

Bu araştırmalar sonucunda aktivitelerini gözlenen serin glioksilat, amino transferaz, hidroksi pürivat redüktaz, gliserat kinaz, fosfoenolpürivat hidrataz, izositrat liyaz, formaldehit dehidrogenaz gibi enzim aktivitelerinin varlığı, aldicarbın parçalanması sonucunda oluşan metilaminin serin metabolik yolu içinde, karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını ortaya koymaktadır (Şekil 21 - 26).



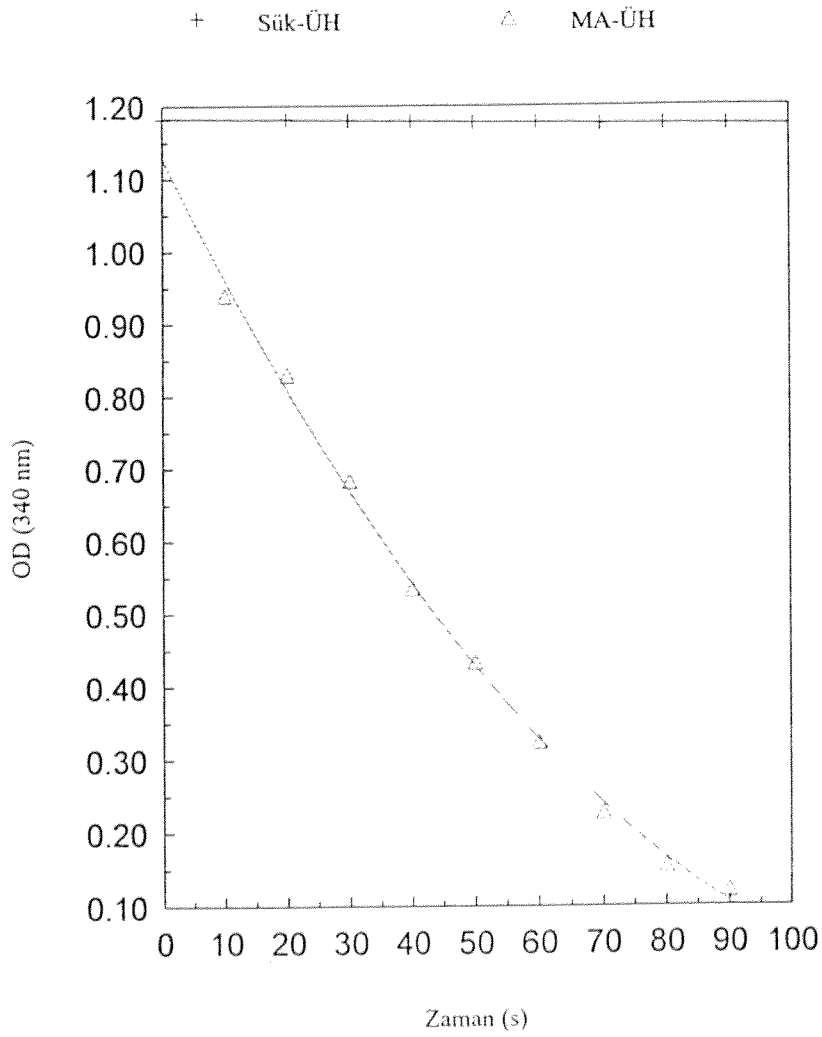


Şekil 21. Formaldehidhidrogenaz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya süksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımıyla incelendi. Tampon çözelti Tris-HCl(50mM) pH 7.5.

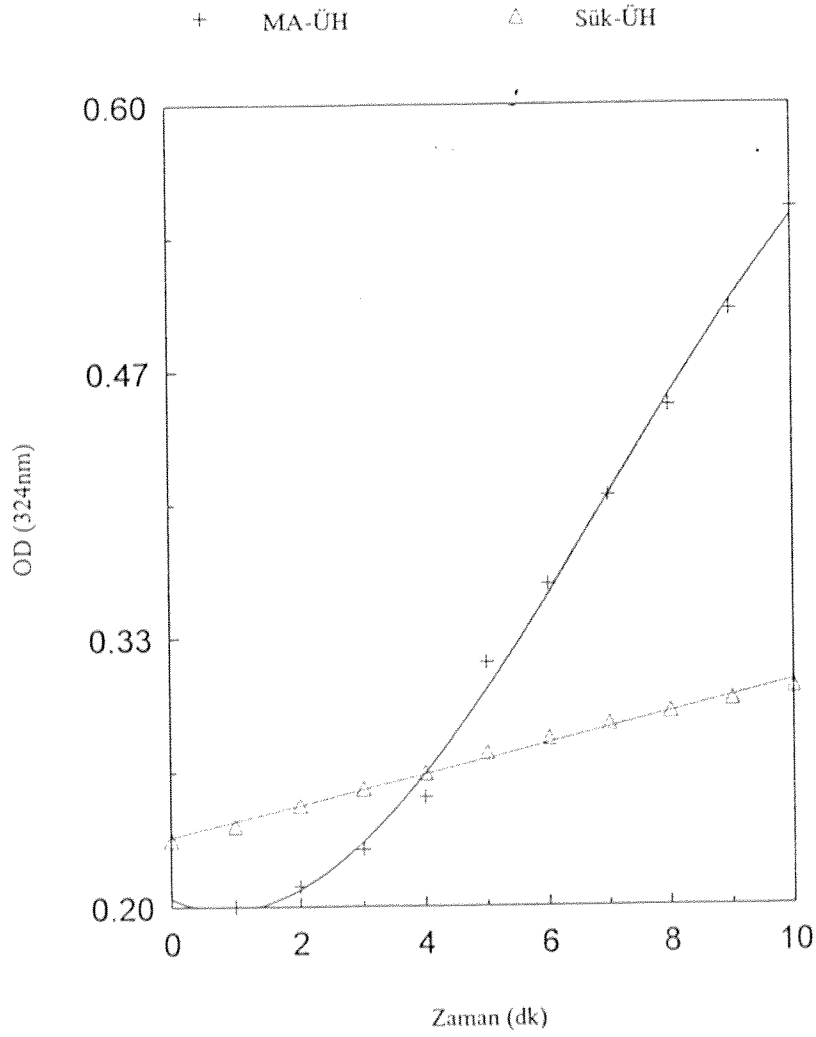


Şekil 22. Gliserat kinaz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya süksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımıyla incelendi. Tampon çözelti fosfat (50mM) pH 7.0.

59  
80/5.22

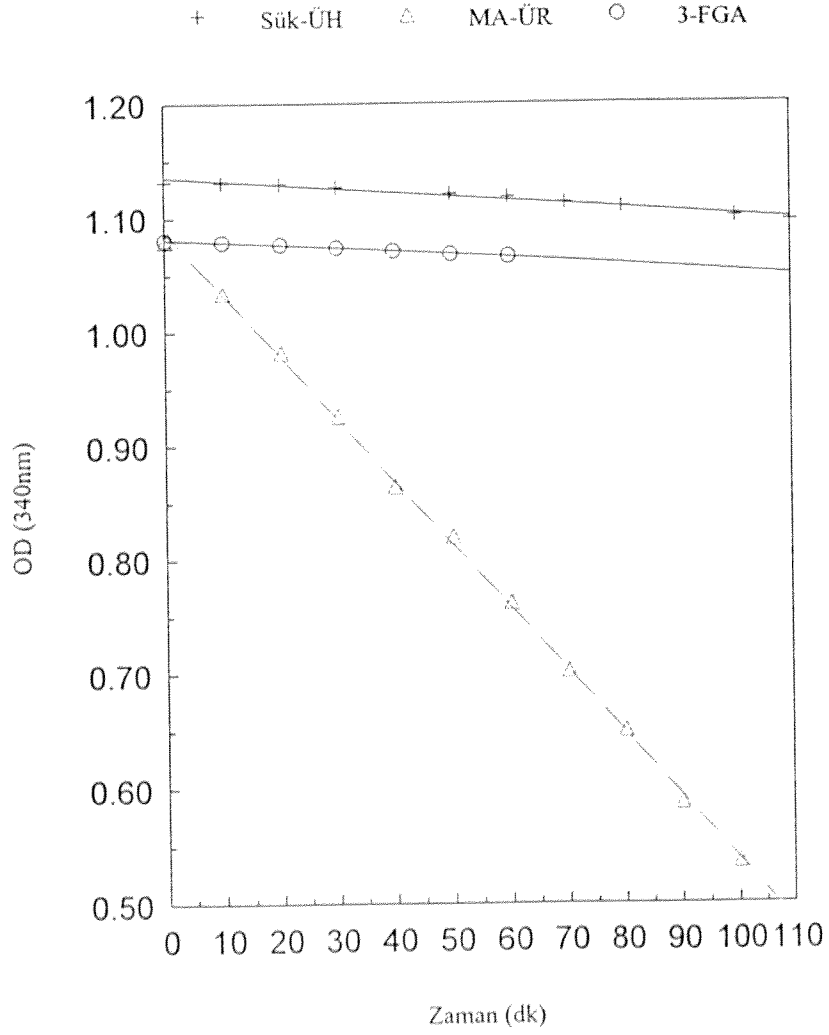


Şekil 23. Hidroksipürivat redüktaz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya süksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımı ile incelendi. Tampon çözelti fosfat (50mM) pH 7.0.

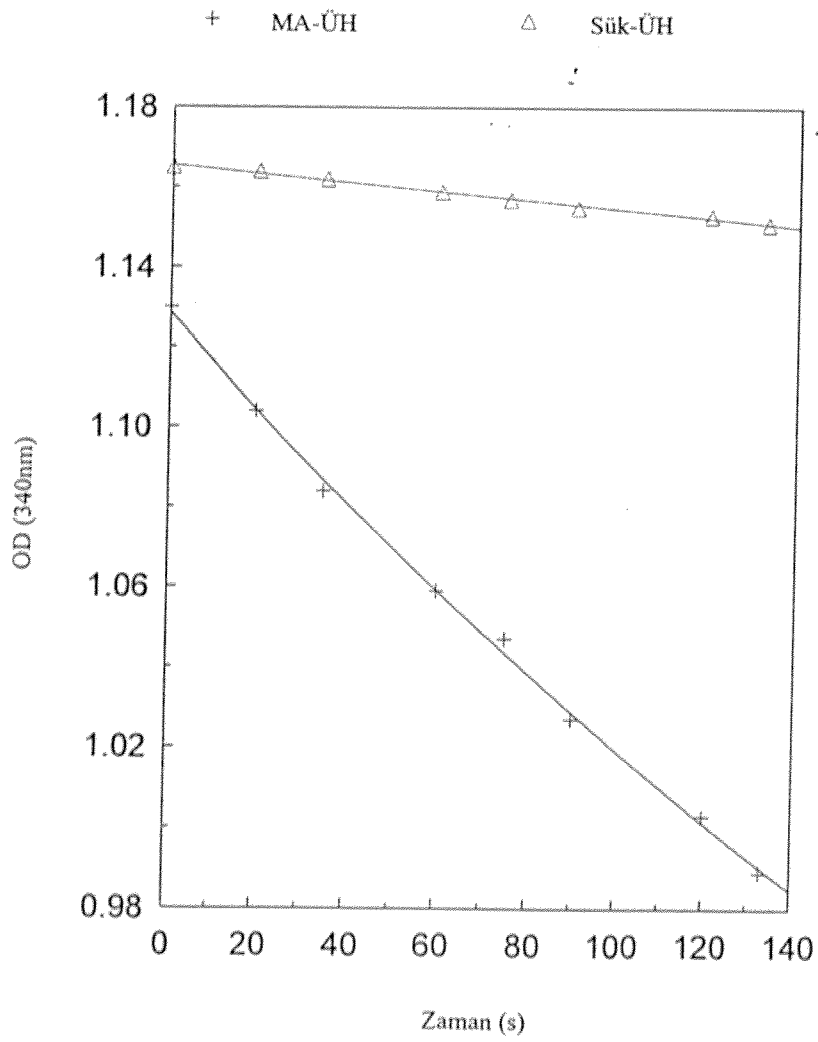


Şekil 24. İzositrat liyaz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya süksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımı ile incelendi. Tampon çözelti Tris-HCl(50mM) pH 7.5.

5/15.24



Şekil 25. Fosfoenolpürivat hidrataz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya suksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımı ile incelendi. Tampon çözelti Tris-HCl(50mM) pH 7.5.



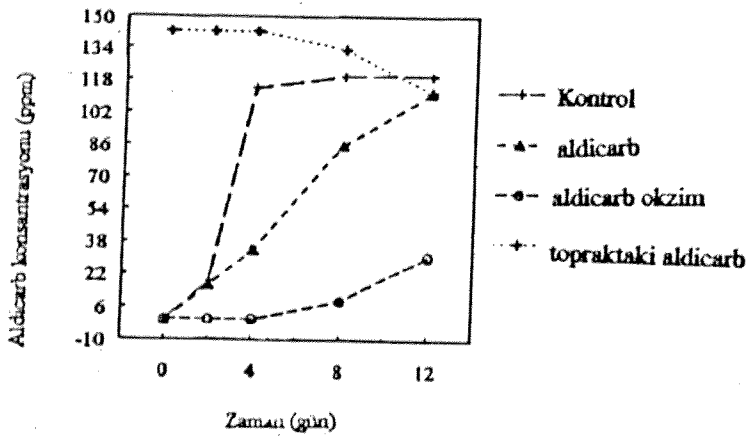
Şekil 26. Serin gliksilat amino transferaz aktivitesi tek karbon kaynağının metilamin veya oksinat olduğu minimal ortamlarda üretilen hücrelerden hazırlanan ham hücre özütleri yardımıyla incelendi. Tampon çözelti fosfat (50mM) pH 7.0.

### **Toprakta Aldicarbın Bakteriler Yardımıyla Parçalanması**

Canlı bakteri hücreleriyle saksılarda yürütülen toprak deneylerinde, aldicarb yıkımının sıvı ortama göre daha yavaş olduğu gözlemlendi. Toprağın düzenli olarak sulanması sonucunda sakı dibinden toplanan toprak örneklerinin HPLC analizi, yüzeye uygulanan aldicarbın %56.5'inin 12 gün içinde difüzyon yolu ile toprağın aşağı katmanlarına doğru hareket ettiğine ve ancak % 20'sinin biyolojik yıkıma uğradığına işaret etmektedir. Geriye kalan %23.5 lik kısmın toprakta adsorplandığı veya diğer oksidasyon ürünlerine dönüştüğü düşünülmektedir.

Daha önceki çalışmalarımızda, aldicarbın canlı bakteri hücreleri ve ham hücre özütleri yardımıyla parçalanması spektrofotometrik yöntemler, TLC ve HPLC yardımıyla gösterilmişti. Toprak deneylerinden elde edilen bulgular, aldicarbın kendisinden daha az toksik olan aldicarb okzim ve metilamine dönüştüğüne ve oluşan metilaminin bakteri hücreleri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığına işaret etmektedir. Toprak uygulamalarında aldicarbın biyolojik yıkım hızının sıvı ortamdaki biyolojik yıkım hızından daha yavaş (%20 verim) gerçekleştiği saptandı (Şekil 27).

Sonuç olarak bakteriyel esteraz aktivitesi aldicarbi, aldicarb okzim ve metil karbamata parçalamakta ve oluşan aldicarb okzim üreme ortamında kalmaktadır. Metil karbamatin ise kararsız yapısından dolayı metilamin ve karbondioksit parçalandığı ve metilaminin formaldehite dönüşümünden sonra serin metabolik yolu ile bakteri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı tespit edildi. Oluşan aldicarb okzimin hem aldicarb ortamda üretilen canlı hücrelerde, hem de canlı hücrelerden ayrıştırılmış ham hücre özütlerinde aldicarb yıkımı üzerinde inhibitör etkisi olduğu gösterildi. Biyolojik yıkımın sürekliliğinin sağlanması için aldicarb okzimin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Aldicarbın, esterazla hidrolizi sonucunda aldicarb okzim ve metil karbamata parçalandığı ve oluşan aldicarb okzimin üreme ortamında kaldığı bilinmektedir.



Şekil 27. Aldicarbın bakteriyel parçalanmasının topraktaki incelenmesi.



## BİYOREAKTÖR ÇALIŞMALARI

### Mikrokürelerin Hazırlanması ve Aktive Edilmesi

İmmobilizasyonda kullanılan destek maddenin ve yöntemin seçimi büyük önem taşımaktadır. Biyobozunur (biodegradable) olan karboksimetil selüloz destek malzemesi olarak seçilmiş ve hücre zarına ek olarak başka bir difüzyon engeli koymamak için immobilizasyonun destek malzemesinin üzerine yapılması kararlaştırılmıştır.

Reaktörde destek malzemesi olarak kullanılan mikroküreler, yukarıda anlatılan biçimde %4'lük (w/v) karboksimetil selüloz çözeltisi ve 0.6 M AlCl<sub>3</sub> ile hazırlandı. Hazırlanan mikroküreler 2 gün oda sıcaklığında ve 24 sa. 50°C'de vakum altında kurutuldu. Kurutulan mikroküreler 1:10 su:mikroküre oranında olmak üzere nemlendirildi ve aktive edilmek üzere epiklorohidrin (1 g mikroküre / 2 mL epiklorohidrin) ile 8 sa. karıştırıldı. Daha sonra mikroküreler iki kere asetonla yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

### Mikroorganizmanın Tutuklanması

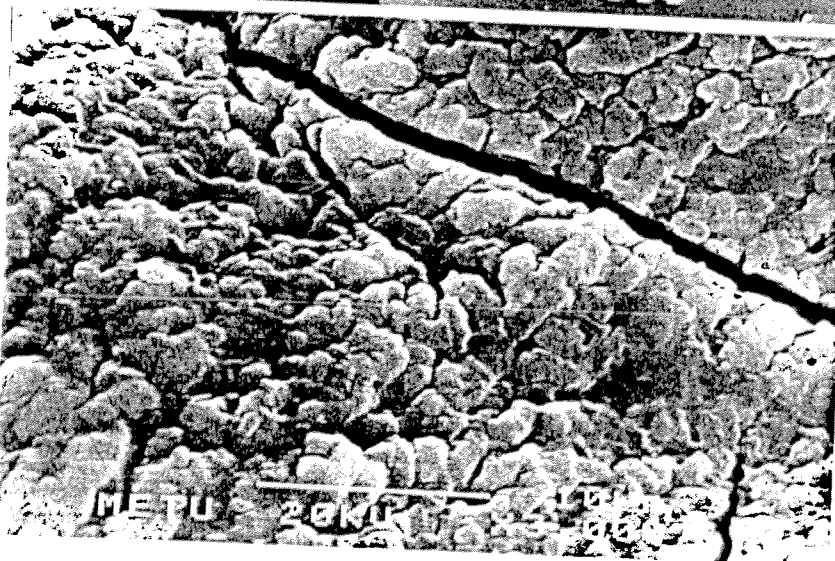
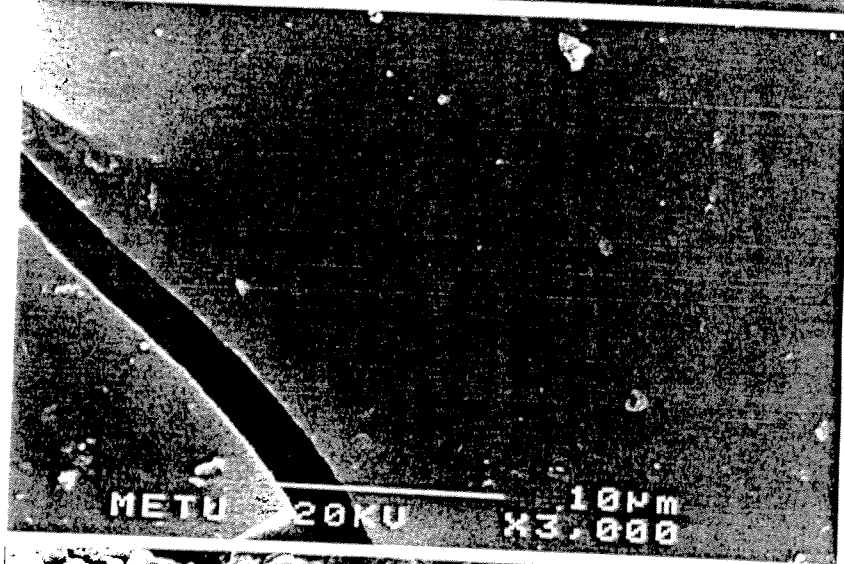
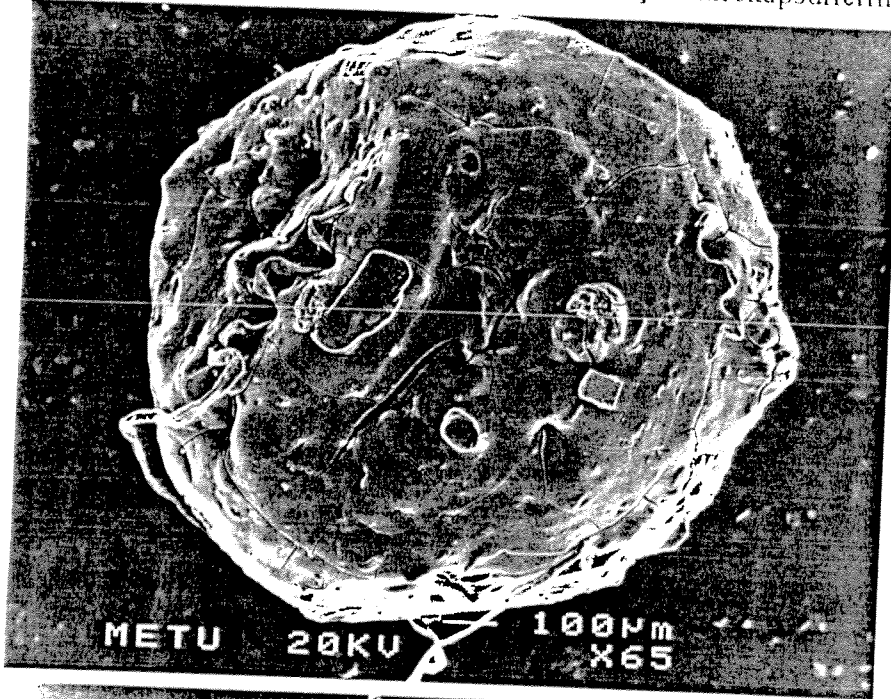
PYE-agar (PYE : 0.3 g pepton, 0.3 g maya ekstresi / 100 mL su , pH:7.1) plaklarından alınan 4 günlük metilofilus, 10 mL PYE besiyeri yerine ekildi ve 30°C'de 36 sa. inkübe edildi. 500 mL PYE besiyeri bu kültür ile ekildi ve aynı şartlarda inkübe edildi. 36 sa. sonra bakteriler santrifügasyonla (5000 rpm , 15 dak.) toplandı ve 200 mL fizyolojik sodyum klorür çözeltisi (0.85 NaCl / 100 mL su) ile yıkandı. Bakteriler santrifügasyonla yeniden toplanarak (5000rpm, 15 dak) 200 mL nitrogen ihtiva etmeyen minimal besiyerinde süspansiyon edildi ve immobilizasyon için hazır duruma getirildi.

Reaktöre 10 g aktive edilmiş mikroküre yerleştirildi ve içinden hazırlanan bakteri süspansiyonu 20 mL/sa hız ile geçirildi. Bu işlem 12 sa devam ettirildikten sonra tutuklanmamış bakteriler 300 mL minimal besiyeri (MM) ile yıkandı. Mikroorganizma tutuklanmış ve tutuklanmamış mikrokürelerin SEM'leri Şekil 28'de verilmektedir.

Hücrelerin tutuklanmasında kullanılan reaktör içinde aldicarbin bozunması çalışmasına geçildi.

Şekil 28

Mikroorganizma tutuklanmamış (a ve b) ve tutuklanmış mikrokapsüllerin (c) SEMleri

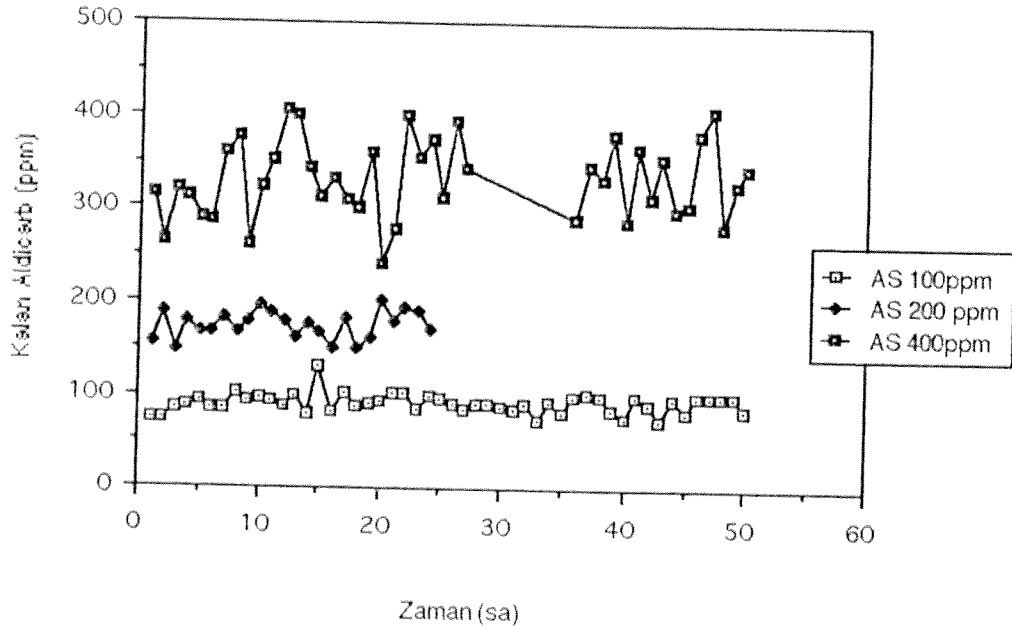


### **Reaktör Koşulları**

Reaktör içinden 20 mL/ h hız ile içinde aldicarb çözülmüş MM, 50 sa. süreyle geçirildi ve reaktör çıkışından her saat başı örnek alınarak HPLC de 214 nm.de incelendi. Reaktör su ceketini yardımıyla 30°C'de tutuldu. Bu deney 100, 200 ve 400 ppm olmak üzere üç değişik aldicarb konsantrasyonu ile tekrarlandı.

### **Reaktör Sonuçları**

Biyoreaktöre 100-400 ppm arasında verilen aldicarb'ın degradasyon çalışmalarının sürdürüldüğü 50 sa. süre içinde degradatif aktivitenin %20 dolaylarında kaldığı ve bu aktivitenin zaman içinde belirgin bir azalma göstermediği saptanmıştır (Şekil 29). Tek geçişli olarak uygulanan sürecin çift ya da çok geçişliye dönüştürülmesi durumunda parçalanmış miktarın yükseleceği de verilerden ortaya çıkmaktadır. Çalışma ortamına sunulan aldicarb konsantrasyonunun aktivitede bir yetersizlik belirtisi gözleninceye kadar artırılması ve bunun kinetiğinin ortaya konması biçiminde proje bitiminden sonra da sürdürülecektir.



Şekil 29 Biyoreaktörde değişik konsantrasyonlarda verilen aldicarb'ın parçalanma davranışı

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü araştırma alanında yapılan bu çalışmada, Çukurova 1518 pamuk çeşidi (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisel, Temik 15G ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında hazırlanan Şelat 2, Şelat 6 ve Şelat 12 kimyasal materyal olarak kullanılmıştır.

### Yöntem

Proje ile ilgili bu deneme, tesadüf blokları deneme deseninde, 3 tekrarlamalı olarak kurulmuştur.

Deneme yerinin toprak hazırlığı, toprağın önce derin, daha sonra yüzlek sürülmesi ile yapılmıştır. İki kez diskaro çekilen deneme yeri, üç kez çekilen tapanla ekime hazırlanmıştır.

Deneme kullanılan bitkisel materyalin ekimi, Nisan ayında sıra aralığı 75 cm, sıra uzunluğu 8 m, olacak şekilde, 3 sıralı parsellere pamuk mibzeri ile dekara 5 kg tohum gelecek şekilde yapılmıştır. Ekimde kullanılan tohumlar, ekimden 6 saat önce su ile ıslatılmış, pamuk toprak zararlılarına ve hastalıklarına karşı ilaçlanmış ve toprağın 4-5 cm derinliğine gelecek şekilde ekilmiştir.

Düzgün bir çıkış sağlamış olan deneme, sıra üzeri 18-20 cm olacak şekilde seyreltilmiştir. 23 Haziran 1995 tarihinde, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde hazırlanarak gönderilmiş olan şelatlar, normal temikten ise her bitkiye 0.22 gr olacak şekilde bitkilerin 8 cm güneyine ve 8 cm derinliğine gömülerek uygulanmıştır. Her bir şelat ve normal temik için bir de bitkisiz uygulama yapılmıştır (Çalışmaya ilişkin plan ekte sunulmuştur).

Şelatların ve Temik'in toprağa gömülmesinden bir hafta sonra, toplam temğin 1/7'si tapraktan çıkarılarak ayrı bir poşete, şelatların çıkarıldığı yerin etrafından da yaklaşık 10 gr toprak örneği alınıp etiketleriyle birlikte diğer bir poşete konularak paketlenmiştir. Bu işlem, 7 hafta süre ile yapılmıştır. Daha sonra bu örnekler, analiz için Ankara'ya gönderilmiştir.

### - İncelenen Özellikler ve Yöntemleri

Çalışmada incelenen özellikler ve yöntemleri aşağıda belirtilmiştir.

- **Kütlü Pamuk Verimi** : Parsel başlarından 1'er metre atıldıktan sonra geriye kalan 13.5 m<sup>2</sup>'lik alan içindeki bitkilerden uygulama yapılmış olanlar ayrı ayrı el ile 2 kez hasat edilmiş; toplam, dekara kütlü pamuk verimine çevrilmiştir.

Aşağıdaki özelliklere ilişkin veriler, her parselden hasattan önce rastgele seçilen 10 bitki üzerinde çalışılarak elde edilmiştir.

- **Bitki Boyu** : Bitkinin kotiledon yapraklarından, büyüme konisine kadar olan uzunluk cm olarak ölçülmüş, ortalaması alınmıştır.

- **Odun Dalı Sayısı** : Bitkideki odun dallarının sayılması ile elde edilmiştir.
- **Meyve Dalı Sayısı** : Bitkideki meyve dallarının sayılması ile elde edilmiştir.
- **Koza Sayısı** : Bitkiler üzerinde oluşan kozalar sayılmış, ortalaması alınmıştır.

Aşağıdaki özelliklere ilişkin veriler, her parselden hasattan önce alınan 30 koza üzerinde çalışılarak elde edilmiştir.

- **Koza Ağırlığı** : Kozalar, 0.01 gr'lık duyarlı terazide tartılmış, ortalamaları alınmıştır.

- **Koza Çenet Sayısı** : Aşağıdaki formül uyarınca hesaplanmıştır.

$$\text{Çenet Sayısı} = \frac{(4'lü \text{ Çenet Sayısı} \times \text{Koza Sayısı}) + (5'li \text{ Çenet Sayısı} \times \text{Koza Sayısı})}{\text{Toplam Koza Sayısı}}$$

- **Koza Kütlü Pamuk Ağırlığı** : Kozalardan alınan kütlüler, 0.01 gr. duyarlı terazide tartılmış, ortalaması alınmıştır.

- **Çırçır Randımanı** : Kozalardan alınan kütlü pamuk, küçük laboratuvar rollergin çırçır makinasından geçirilerek lif ve çiğit (tohum) olmak üzere ikiye ayrılarak tartılmış, aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Çırçır Randımanı (\%)} = \frac{\text{Pamuk (lif)}}{\text{Pamuk (lif) + Çiğit}} \times 100$$

- **Lif uzunluğu** : Fibrograf aleti ile saptanmıştır.
- **Lif İnceliği** : Micronaire aleti ile saptanmıştır.
- **Lif Kopma Dayanıklılığı** : Pressley aleti ile saptanmıştır.

#### **Verilerin Analizi**

Bu denemeden elde edilen verilerin analizleri Statitca paket programı kullanılarak yapılmış F testine göre irdelenmiş ve LSD değerlerine göre gruplandırılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Denemeden, incelenen tarımsal ve teknolojik özellikler yönünden saptanan veri ortalamaları, denemenin C.V değerleri ve LSD değerine göre oluşan farklı gruplar sırasıyla Çizelge 1a ve 1b'de verilmiştir.

Çalışmada, incelenen özellikler ayrı başlıklar altında incelenmiştir.

**Kütlü Pamuk Verimi (kg/da):** Çalışmada, uygulamalara göre kütlü pamuk veriminin, ortalama 346.27 kg/da (Şelat 2) ile 406.07 kg/da (Şelat 6) arasında değişim gösterdiği; en yüksek kütlü pamuk veriminin, Şelat 6 (406.07 kg/da), Temik (394.27) ve Şelat 12 (379.13 kg/da) uygulamalarından elde edildiği; Şelat 6 ve Temik uygulamalarının, kütlü pamuk verimini, Kontrol ve Şelat 2 uygulamasına oranla önemli düzeyde arttırdığı dikkati çekmektedir.

**Bitki Boyu (cm) :** Çalışmada, uygulamalara göre bitki boyunun, ortalama 104.33 cm (Şelat 2) ile 111.67 cm (Şelat 12) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, bitki boyunu Kontrolden ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.

**Odun Dalı Sayısı (adet/bitki) :** Çizelge 1a'dan uygulamalara göre odun dalı sayısının ortalama 1.68 (Temik) ile 2.68 arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, odun dalı sayısı Kontrolden ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği görülmektedir.

**Meyve Dalı Sayısı (adet/bitki) :** Çalışmada, uygulamalara göre bitkideki meyve dalı sayısının, 11.33 (Kontrol) ile 14.00 (Şelat 12) arasında değişim gösterdiği; bitkideki meyve dalı sayısının Şelat 12 uygulamasında en yüksek düzeyde oluştuğu; bunu istatistiksel yönden önemsiz farklarla Şelat 2 ve Şelat 6 uygulamalarının izlediği; ancak Şelat 2 ve Şelat 6 uygulamalarının, anılan özellik yönünden kontrolden farksız bir durum oluşturduğu dikkati çekmektedir.

**Bitkideki Koza Sayısı (adet/bitki) :** Çizelge 1a'dan uygulamalara göre saptanan bitkideki koza sayısının ortalama 15.67 (Şelat 12) ile 11.67 (Şelat 6) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, bitkideki koza sayısını Kontrolden ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.

**Koza Ağırlığı (gr) :** Çalışmada, uygulamalara göre koza ağırlığının ortalama 8.47 (Temik) ile 7.68 (Şelat 12) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, koza ağırlığını yine Kontrolden ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği görülmektedir.

**Koza Çenet Sayısı (adet/koza) :** Çalışmada, uygulamalara göre koza çenet sayısının ortalama 4.76 (Kontrol) ile 4.65 (Şelat 6) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, koza çenet sayısını Kontrolden ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.

**Koza Kütlü Ağırlığı (gr) :** Çalışmada, uygulamalara göre koza kütlü ağırlığının ortalama 6.39 (Kontrol) ile 6.00 (Şelat 12) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, koza kütlü ağırlığını Kontrolde ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği dikkati çekmektedir.

**Çırcır Randımanı (%) :** Çalışmada, uygulamalara göre çırcır randımanının ortalama 41.67 (Kontrol) ile 40.53 (Şelat 6) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, çırcır randımanı yine Kontrolde ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.

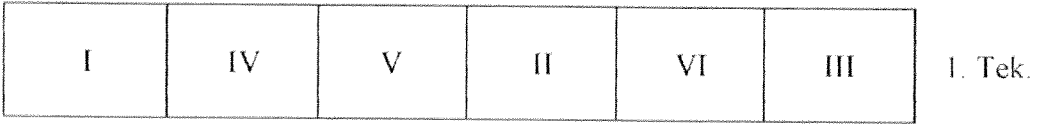
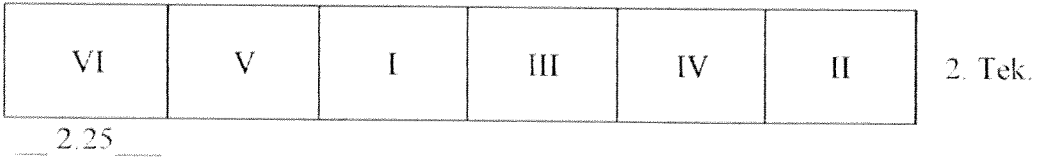
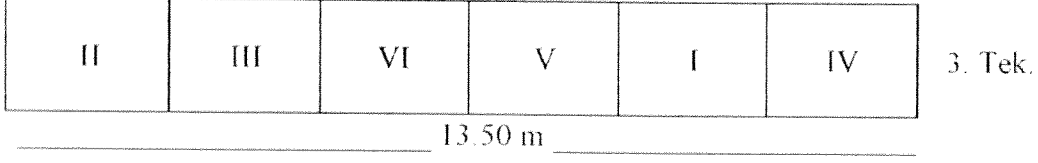
**Lif Uzunluğu (mm):** Çizelge 1b'den, çalışmada saptanan lif uzunluğu değerlerinin, uygulamalara göre 28.77 mm (Kontrol) ile 29.87 mm (Şelat 6) arasında değişim gösterdiği; Şelat 6 uygulamasının istatistiksel yönden, öteki uygulamalardan farksız, ancak Kontrolde önemli düzeyde farklı lif uzunluğu oluşturduğu; diğer uygulamaların ise lif uzunluğuna Kontrolde ve Şelat 6 uygulamasından farksız etkide bulunduğu dikkati çekmektedir.

**Lif İnceliği (mic.) :** Çalışmada, uygulamalara göre lif inceliğinin 4.57 (Şelat 6) ile 4.37 (Kontrol) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, lif inceliğini Kontrolde ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.

**Lif Kopma Dayanıklılığı (perss.) :** Çalışmada, uygulamalara göre lif kopma dayanıklılığının ortalama 89.33 (Şelat 6) ile 82.33 (Kontrol) arasında değişim gösterdiği; Şelat ve Temik uygulamalarının, lif kopma dayanıklılığını yine Kontrolde ve birbirlerinden farksız biçimde etkilediği izlenebilmektedir.



Ek 1. Biyoteknoloji Araştırma Projesi Uygulama Planı



Uygulamalar

I. Kontrol (Bitkili)

II. Kontrol (Bitkisiz)

III. Şelat 2#

IV. Şelat 6#

V. Şelat 12#

VI. Temik

Ek 2. Dozların Bitkilere Uygulama Planı

Dozlar	I. Tekerrür	II. Tek.	III. Tek.	I. Tek.
Şelat 2	Bitkili	Bitkili	Bitkili	Bitkisiz
	24 8+8+8 (3 sıra)	24 8+8+8 (3 sıra)	24	20
Şelat 6	60 20+20+20 (3 sıra)	60 20+20+20 (3 sıra)	60 20+20+20 (3 sıra)	24 (Tek sıra)
Şelat 12	75 25+25+25 (3 sıra)	75 25+25+25	75 25+25+25	23 (Tek sıra)
Şelat 2	60 20+20+20	60 20+20+20	60 20+20+20	40 20+20

Çizelge 1a. İncelenen Tarımsal Özelliklere İlişkin Ortalamalar, LSD Testine Göre Oluşan Gruplar ve CV Değerleri

Uygulamalar	Kutlu Pamuk Verimi (kg/da)	Bitki Boyu (cm)	Odun Dalı Sayısı (adet/bitki)	Meyve Dalı Sayısı (adet/bitki)	Koza Sayısı (adet/bitki)	Koza Ağırlığı (gr)	Koza Çenet Sayısı (adet/koza)	Koza Kütü Ağırlığı (gr)	Çürür Randımanı (%)
I. Kontrol	353.40 B	109.33 A	2.68 A	11.33 B	13.00 A	8.47 A	4.76 A	6.39 A	41.67 A
II. Şelat 2#	346.27 B	104.33 A	2.33 A	12.00 AB	12.33 A	7.72 A	4.67 A	6.02 A	40.80 A
III. Şelat 6#	406.07 A	110.33 A	2.68 A	12.00 AB	11.67 A	7.97 A	4.65 A	6.24 A	40.53 A
IV. Şelat 12#	379.13 AB	111.67 A	2.33 A	14.00 A	15.67 A	7.68 A	4.72 A	6.00 A	41.40 A
V. Temik	394.27 A	109.33 A	1.68 A	12.68	14.67 A	7.95 A	4.73 A	6.27 A	41.33 A
LSD(% 5)	5.57	6.57	27.10	10.25	-	5.41	1.96	6.52	2.48
CV (%)	39.47	13.49	1.19	2.39	11.1	0.81	0.17	0.75	1.92

Çizelge 1b. İncelenen Teknolojik Özelliklere İlişkin Ortalamalar, LSD Testine Göre Oluşan Gruplar ve CV Değerleri

Uygulamalar	Laf Uzunluğu (mm)	Laf İnceliği (mic.)	Laf Kopma Dayamlılığı (pressley)
I. Kontrol	28.73 B	4.37 A	82.33 A
II. Şelat 2#	29.27 AB	4.43 A	87.67 A
III. Şelat 6#	29.87 A	4.57 A	89.33 A
IV. Şelat 12#	29.57 AB	4.40 A	87.67 A
V. Temik	29.53 AB	4.43 A	87.67 A
LSD(% 5)	0.99	-	-
CV (%)	1.2	5.4	3.5

## REFERENCES

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1994
- Derbyshire, M.K., et al. 1987. J.Agric. and Food Chem. ,35,871-877
- Harder, W.J., Quayle, J.R., 1971. Biochem. J.,121,753.
- Dion, R., Komberg, G., 1959. Hist-Vigne-Vin-France
- Jacoby, W. 1957. J. Biol. Chem.,207, 657.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TBAG-DPT-27	2- Rapor Tarihi: KESİM-HAZ. 1996
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1993-1996	
4- Projenin Adı: Karbamat Pestisitlerinin (Aldicarb'ın) Kontrollü Salımı ve Mikrobiyal Degradasyonu	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Vasıf Hasırcı, Prof. Gürdal Alaeddinoğlu, Prof. Oktay Gencer, Prof. Kazım Abak, Doç. Yaşar Özden	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyolojik Bilimler Böl. Biyotek.Ar.Bir. ve Çukurova Üniversitesi Pamuk Araştırma ve Uygulama Merkezi	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: ODTÜ ve Çukurova Üniversitesi	
8- Öz (Abstract): Türkiyede geniş çapta kullanımı bulan ve karbamat pestisitlerinden biri olan aldicarb, çok toksik oluşu ve toprakta uzun süre kalabilmesinden kaynaklanan kirlenme özelliğinden dolayı, üzerinde durulması gereken bir maddedir. Bu çalışmada pestisitlerden kaynaklanan çevre ve yeraltı suları kirliliği probleminde iki değişik bilimsel yaklaşımla çözüm önerilmiştir. İlk yaklaşım kullanılacak pestisit miktarını düşürebilmek için bir kontrollü salım sistemi geliştirmeyi amaçlamaktaydı. Böylelikle pestisit ortamına verilisinin alçak düzeyde fakat uzun süreli olması böylelikle ilaç miktarı azaldığı halde etkin bir pestisit uygulaması sağlanmış aynı zamanda ortamda fazla pestisit varlığından kaynaklanan kirlilik te önlenmiş olacaktı. Çalışmalarımız laboratuvar, saksı ve tarla denemeleri olarak üç aşama da gerçekleştirilmiş ve elde edilen mikrokapsüller ilaç salım süresini saatler düzeyinden 8 hafta arasına kadar uzatabildi. İkinci yaklaşımda ise ortamda kalması arzu edilmeyen (toksik ve kirlenici özelliği dolayısıyla) pestisit mikroorganizmalar tarafından parçalanması hedef alınmıştı. Kullanıma sokulacak mikroorganizmaların immobilizasyonu da mikroorganizmaların uygulama alanı dışına taşmamasını sağlaması için önerilmişti. Pestisit degrade edecek mikroorganizmalar aldicarb uygulanmış topraktan izole edildi ve degradatif özelliklerine yol açan metabolik yollar incelendi. Methylophilus türü olan mikroorganizmanın bir karbamat olan aldicarb'ı metilamin'e dönüştürdüğü gözlemlendi. Immobilize mikroorganizmanın yer aldığı biyoreaktörde aldicarb'ın degradasyonunu tek geçişli koşullarda %15 düzeyinde düşürebildiği gözlemlendi. Arazi uygulamalarında özellikle L46 ve H24'ün ürün, bitki boyu, lif kalınlığı ve dayanıklılığı konularında kontrolden ve Temik uygulanmış örneklerden biraz daha olumlu katkı yaptığı gözlemlenmiştir. <b>Anahtar kelimeler:</b> Aldicarb, pestisit, kontrollü pestisit salımı, biyodegradasyon, biyoreaktör	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler	
10- Bilim Dalı: Doçentlik B. Dalı Kodu: 614.02.07 Uzmanlık Alanı Kodu: 612.01.01 ISIC Kodu:	
11- Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı <input type="checkbox"/> Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu: <input type="checkbox"/> Gizli <input type="checkbox"/> Gizli Değil	

) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz