

## 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) uygulanmış topraktan izole edilen bakterilerin 2,4-d biyokimyasal yıkım kabiliyetlerinin incelenmesi

### Investigation of 2,4-d biochemical degradation capabilities of bacteria isolated from 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-d) applied soil

Cemal KURTOĞLU<sup>1</sup> Faik CEYLAN<sup>2</sup> Sabahattin CÖMERTPAY<sup>1</sup> İsmail AKYOL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 46050, Kahramanmaraş

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, 46050, Kahramanmaraş

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 06110, Ankara

#### Eser Bilgisi / Article Info

Araştırma makalesi / Research article

DOI: 10.17474/artvinofd.737394

Sorumlu yazar / Corresponding author

Cemal KURTOĞLU

e-mail: cemalkurtoglu93@hotmail.com

Geliş tarihi / Received

14.05.2020

Düzeltilme tarihi / Received in revised form

04.06.2020

Kabul Tarihi / Accepted

06.06.2020

Elektronik erişim / Online available

15.09.2020

#### Anahtar kelimeler:

2,4-D

Toprak bakterileri

Mikrobiyal yıkım

#### Keywords:

2,4-D

Soil bacteria

Microbial degradation

#### Özet

2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), fenoksi asitler grubuna dahil olan, seçici bir herbisittir. Topraktaki 2,4-D kalıntılarının çevre ve insan sağlığına zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu sorunlar ile baş etmedeki en önemli faktörlerden birisi herbisitleri besin olarak kullanıp yıkımını sağlayan toprak bakterileridir. Bu çalışmada, Balıkesir bölgesinde, 2,4-D ile muamele edilmiş tarım arazisinden izole edilen bakterilerin, bu herbisiti yıkım potansiyellerinin spektrofotometrik testler ve HPLC yardımıyla belirlenmesi hedeflenmiştir. Öncelikle, bu bakterilerin protein analizi yöntemiyle moleküler düzeyde tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; seri seçimlerle elde edilen bakteri kolonilerinin, karbon kaynağı olarak yalnızca iki farklı derişimde (0.1g/L, 0.5g/L) 2,4-D içeren besiyerinde yetiştirmeleri sağlanmıştır. Yetiştirilen bakterilerin büyüme hızları 14. günde takip edilmiş ve bakterilerin yıkım yeteneklerinin anlaşılması için besi ortamında kalan 2,4-D miktarları aynı süre sonunda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada 2,4-D'yi yıkabilen bir bakteri bulunamamış, ancak *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Stenotrophomonas sp.* bakterilerinin 2,4-D'li ortamda büyüebildikleri tespit edilmiştir.

#### Abstract

2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) is a selective herbicide from the phenoxyacids group. 2,4-D residues in soil are known to have harmful effects on environment and human health. One of the most important factors in dealing with these problems is soil bacteria that provide herbicides as a nutrient and break down. In this study, it was aimed to determine the degradation potential of this herbicide by the bacteria isolated from an agricultural field treated with 2,4-D in Balıkesir region through spectrophotometric tests and HPLC. It was initially aimed to identify these bacteria at the molecular level by protein analysis. In order to achieve these goals; bacterial colonies obtained by serial selection were grown in the media containing three different concentrations (0.1 g/L, 0.5 g/L) of 2,4-D as the only carbon source. Growth rates of the bacteria were monitored on the 14th day, and the amount of 2,4-D remaining in the medium was measured at the same time in order to understand the degradation ability of the bacteria. According to the results obtained; no bacteria capable of degrading 2,4-D were found, however, it was observed that *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Stenotrophomonas sp.* bacteria were able to grow in the medium containing 2,4-D.

## GİRİŞ

Pestisitler, tarımsal ürünlerin üretimi ve depolanmaları sırasında ürünlere zarar veren, ürün kaybına ve hastalıklara neden olan mikroorganizma, böcek, kemirgen, yabancı ot ve mantar gibi zararlıları uzaklaştırmak, yok etmek ve bitki büyümesini düzenlemek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ürünlerdir (Kaya 2016). Ülkemizde yetiştirilen tarım ürünlerinde ekonomik olarak zarara neden olan yaklaşık 500 hastalık etmeni, zararlı ve yabancı ot bulunmakla

birlikte bunlarla gerekli mücadele çalışmaları yapılmadığında, ürün kaybı ortalama %35 dolaylarında olduğu belirtilmektedir (Yakar 2014). İnsan nüfusunun sürekli artması göz önüne alındığında bunun çok büyük bir ürün kaybına denk geldiği söylenebilir. Bunun yanında artan pestisit kullanımı nedeniyle, pestisitlerin çevreye olan olumsuz etkilerinin belirlenmesi, eliminasyonu ve daha bilinçli kullanımları önem taşımaktadır (Oliveira ve ark. 2018).

Pestisitlerin bir alt grubu olan herbisitler; tarım arazilerinde istenmeyen yabancı otları öldürmek veya kontrol altına almak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Kullanılan herbisitlerin yıkımı, bitki tarafından kullanılma, buharlaşma, taşınma, ışıktaki yıkım, toprakta tutunma, yıkanma, mikrobiyal yıkım ve kimyasal yıkım yollarından herhangi birisi ile gerçekleşir (Başaran ve Serim 2010). Herbisitlerin mikrobiyal yıkımında toprak özellikleri (nemi, hava kapasitesi, sıcaklık, pH ve organik madde miktarı) rol almaktadır (Başaran ve Serim 2010).

Kullanılabilir tarım alanlarının azalmasına neden olan bir bileşik olan 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), yabancı ot mücadelelerinde 1940'lı yıllardan beri yaygın olarak kullanılan bir herbisittir (Xia ve ark. 2017). Yabancı otlara karşı etkili bir mücadele sunan 2,4-D'nin kontrolsüz kullanımı, biyolojik denge bozulumu ve çevre ve gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır (Özdaş 2006).

2,4-D kalıntılarının toprakta, uygulamadan 7-10 gün sonrasında ortalama % 40-50 kadarının, 60 gün sonrasında ise yaklaşık % 50-60 kadarının mineralize olduğu rapor edilmiştir (Boivin ve ark. 2005). Kısa sürede mineralize olmaya başlamasına rağmen, 2,4-D kimyasalının hem kendisinin hem de ara ürünlerinin toprakta uzun yıllar kalma potansiyelinin olduğu bilinmekte ve çeşitli bakteri türlerinin kullanımı ile 2,4-D'nin yıkımı, bu bileşiğin neden olduğu biyolojik kirliliğin eliminasyonunda izlenen temel yol olarak belirtilmektedir (Kumar ve ark. 2016). *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*, *Flavobacterium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* ve *Streptomyces* cinsi bakterilerin ve *Serratia marcescens*, *Stenothrophomonas maltophilia* bakteri türlerinin söz konusu yıkım yeteneğine sahip oldukları literatürde yer almaktadır (Don ve Pemberton 1981, Fulthorpe ve ark. 1995, Zwieter ve ark. 1995, In-Hyun ve Jonk-Ok. 2003, Silva ve ark. 2007).

Bu çalışmanın amacı; herbisit olarak kullanılan ve çevresel kirliliğe sebep olan 2,4-D kimyasalının, Balıkesir İli Altıeylül İlçesi sınırlarında bulunan ve 2,4-D ile muamele edilmiş bir tarım arazisinden izole edilen bakterilerce yıkılıp yıkılmadığının belirlenmesidir.

## MATERYAL VE METOD

### Biyolojik Materyal

Bakteri izolasyonu için toprak örnekleri, ilkbaharda (nisan ayı içinde) buğday bitkisinin olduğu ve hava sıcaklığının yaklaşık 20 °C olduğu dönemde uzun yıllardır dimetil amin tuzu şeklinde yaklaşık olarak hektarının 0,5 g/L konsantrasyonda 20 L 2,4-D ile muamele edildiği bilinen Balıkesir'in Altıeylül ilçesinde bulunan (39°37'05.6"N 27°45'48.0"E) killi toprağa sahip bir tarım arazisinden, toprak yüzeyi yaklaşık 5 cm temizlenerek tarlaya dışarıdan herhangi bir kontaminasyon oluşturmamak adına kaynatılıp etanol ile steril edilmiş kavanoz ve kaşıklar kullanılarak alınmıştır. Örnek alma işlemi tarlaya 2,4-D uygulamasından 5-7 gün sonra yapılmıştır.

### Mineral Tuz Besi Ortamı (MTB) ve Luria bertani (LB) Besiyeri Ortamlarının Hazırlanması

MTB hazırlamak için 2 g/L amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0.625 g/L potasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0.6 g/L sodyum dihidrojen fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O), 0.2 g/L magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O), 0.15 g/L kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O) tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH'sı 7.0 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan besi ortamı 0.22 µm por çapında steril filtre kullanılarak sterilize edilmiştir.

Bakterilerin canlılıklarını belirlemek amacıyla kullanılan LB besiyerinin hazırlanması için ise 10 g/L triptofan, 5 g/L NaCl, 5 g/L maya özütü tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve 10 mL'lik tüplere paylaştırılmıştır. Agarlı besiyeri için MTB'ye % 1.5 oranında agar ilave edilmiş ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon yapılmıştır.

### Toprakta Bakteri İzolasyonu

Herbisit uygulandığı bilinen arazinin farklı yerlerinden toplamda 10 g kadar toprak örneği alınmıştır. 250 mL'lik şişe içerisine 5 g toprak örneği ve 50 mL sterilize edilmiş MTB konulup 37 °C'de inkübe edilmiştir. Karbon kaynağı olarak 2,4-D bulunduran besiyeri içerisinde 37 °C'de 14 gün inkübe edilen bakteriler CEM serisi olarak, aynı karbon kaynağı kullanılarak 14 gün boyunca 30 °C'de inkübe edilen bakteriler ise B serisi olarak kodlanmıştır. İnkübasyonu takiben 2,4-D içeren MTB agar petripleri

üzerine yayma yöntemi ile bakterilerin ekimi yapılmış, yoğun şekilde petride gelişen koloniler koloni morfolojileri ve renkleri dikkate alınarak seçilmiş ve bu kez çizme yöntemi yapılarak saf koloniler elde edilmiştir. Koloni saflaştırma işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.

### **Bakterilerin Tanımlanması**

Bakteri örneklerinden elde edilen taze koloniler, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) ile tanımlama yapılmak üzere Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne gönderilmiştir. Bu merkezde MALDI-TOF analizi ile mikroorganizma tanımlaması Uysal ve ark. (2019)'ndaki prosedür kullanılarak uygulanmıştır. Bunun için saf bakteri kültürlerinden ön protein izolasyonları yapılmış ve bu proteinlerin analizi sonucunda cihazdan elde edilen spektrumlar aracılığıyla cins ve tür teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### **2,4-D Kimyasalının Hazırlanması ve 2,4-D'li Ortamda Bakterilerin Yetiştirilmesi**

2,4-D (Duchefa Biochemistry; Haarlem, Hollanda)'den 0.5 g tartılarak 10 mL %96'lık etanolde çözülmüş ve por çapı 0.22 µm olan steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

10 mL MTB'ye stoktan 100 µL (~3.8x10<sup>7</sup>tane) bakteri örneği ve 2,4-D kimyasalından 0.1 g/L, 0.5 g/L derişiminde olacak şekilde ilave edilerek, kapaklar sıkıca kapatılmış ve vorteks ile karıştırılmıştır. 2,4-D kimyasalının uygulama derişimleri Santacruz ve ark. (2005)'nin kullandığı derişimlerin en düşük ve en yüksek yoğunluklu olanları seçilerek belirlenmiştir. 14 gün boyunca inkübasyona bırakılan bakterilerin süre sonundaki canlılıklarına LB besiyerine ekim yapılarak bakılmıştır (Zhao ve ark. 2015). 14 günlük inkübasyon süresine, Xia ve ark. (2017)'nin izole ettikleri bakterilerde 2,4-D yıkım çalışmalarını 36 saatte sonlandırması ve öncül çalışmalarımızda bakterilerin 14. günden itibaren büyüme doygunluğuna eriştiğinin gözlemlenmesi sebebiyle karar verilmiştir. Bakterilerin yetiştirilmesi spektrofotometrik ölçümler için 3 tekrarlı, HPLC analizi için ise tek tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **2,4-D'li Ortamda Bakterilerin Büyüme Miktarının Spektrofotometre ile Belirlenmesi**

İnkübasyon sonunda elde edilen örneklerden 1 mL alınarak spektrofotometre küvetine koyulmuş ve optik yoğunluk (OD) 600 nm'de absorbans değeri ölçülerek ölçümler kaydedilmiştir. Kör olarak MTB kullanılmıştır.

### **Spektrofotometre Kullanılarak 2,4-D Miktar Tayininin Yapılması**

Örneklerden 1mL alınarak 5000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra kuartz küvetlere konularak optik yoğunluk (OD) 283 nm'de absorbans değeri ölçülerek ölçümler kaydedilmiştir. Kör olarak MTB kullanılmıştır (Güngör 2007).

### **HPLC Kullanılarak 2,4-D Miktar Tayininin Yapılması**

HPLC (High Performance Liquid Chromatography: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizi için örneklerden 1 mL alınarak 5000 rpm'de santrifüj yapılmış ve süpernatant alınarak 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. HPLC analizi C18 kromatografi kolonu (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) ile yapılmıştır. Kromatografik koşullar; kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanarak ve pH'ı fosforik asit ile 3.2'ye ayarlanan mobil fazın, metanol ve ultra saf suyun hacimce 6:4 oranında karıştırılması ile oluşturulmuştur. Cihaz üzerinde Akış hızı 1.0 mL/dk, dalga boyu 248 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır (Zhou ve ark. 2018).

### **İstatistiksel Analiz**

Her bir grup için elde edilen tekrarlı değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının bilinmesi için GraphPad Prism programı (CA, ABD) içerisinde yer alan Unpaired t testi kullanılmıştır. Karşılaştırma yapılan gruplar için hesaplanan P değerinin 0.05'e eşit ya da ondan küçük olması durumunda, fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **BULGULAR**

#### **MALDI-TOF ile bakterilerin tanımlanması**

Balıkesir bölgesinde bulunan tarım arazisinden 2,4-D kimyasalına maruz kaldığı bilinen topraktan izole edilerek

MALDI-TOF ile tanımlanan bakteriler Çizelge 1'de verilmiştir. Tür tanımlama sonucu; 37 °C'de inkübe edilen ve CEM serisi olarak adlandırılan bakterilerin tamamının *Acinetobacter baumannii*, B serisi olarak adlandırılan ve

30 °C'de inkübe edilen bakterilerden B5 ve B9'un *Acinetobacter calcoaceticus*, B8'in ise *Stenotrophomonas sp.* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. MALDI-TOF ile tanımlanan bakteriler

Kullanılan kimyasal	Bakterinin kodu	Bakterinin türü
2,4-D	CEM6, CEM3, CEM4, CEM9, CEM14, CEM20	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	B5, B9	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	B8	<i>Stenotrophomonas sp.</i>

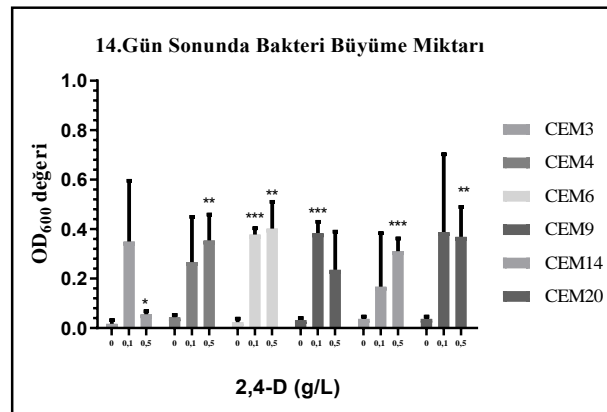
## 2,4-D'nin Mikrobiyal Yıkımı

### 2,4-D'li Ortamda Bakterilerin Büyüme Miktarlarının Spektrofotometre Kullanılarak Belirlenmesi

MTB ortamında 0.1 ve 0.5 g/L 2,4-D içeren tüplere ekim yapılan bakterilerin 14. gün sonunda, büyüme miktarları spektrofotometre cihazı ile 600 nm dalga boyundaki absorbansları aracılığıyla ölçülmüş ve kolonların kendi kontrol grubu (0 g/L) ile istatistiksel karşılaştırmaları yapılmıştır. Şekil 1 ve 2 kolonlarında anlamlı çıkan karşılaştırma verileri \* (P<0.05), \*\* (P<0.01) ve \*\*\* (P<0.001) şeklinde sunulmuştur.

CEM serisi bakterilerinden CEM3'de 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarının hiç 2,4-D

içermeyen (kontrol) besiyerindeki bakteri büyüme miktarına göre anlamlı bir artış gösterdiği (P<0.05), 0.1 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyümesinin ise kontrole göre önemli bir değişim göstermediği görülmüştür (Şekil 1). CEM4'deki anlamlı değişim (P<0.01) kontrole göre 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarında tespit edilmiştir. CEM6'da 0.1 ve 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarları kontrole göre sırasıyla istatistiksel olarak P<0.001 ve P<0.01 anlam düzeyinde artış göstermiştir. CEM9'da kontrole göre sadece 0.1 g/L ve CEM14'de kontrole göre sadece 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarlarında istatistiksel olarak P<0.001 anlam düzeyinde bir artış görülmüştür. CEM20'de ise kontrole göre artış (P<0.01) 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarında tespit edilmiştir



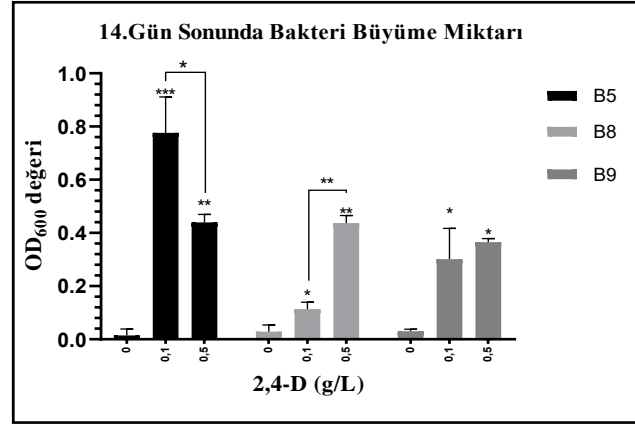
Şekil 1. CEM serisi 14. gün sonunda toplam bakteri büyüme miktarları. Her bir bakteri suşu için 0,1 ve 0,5 g/L için elde edilen değerler kendi kontrol grubu (0 g/L) ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar \*(p<0.05), \*\* (P<0.01) ve \*\*\* (P<0.001) şeklinde gösterilmiştir.

B serisi bakterilerinden *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanan B5'de hiç 2,4-D içermeyen besiyerindeki bakteri büyüme miktarına göre 0.1 g/L içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarında P<0.001

anlam düzeyinde, 0.5 g/L içeren besiyerinde ise P<0.01 anlam düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bir diğer *Acinetobacter calcoaceticus* olan B9'daki artışın kontrole göre 0.1 g/L ve 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki

bakteri büyüme miktarı istatistiksel olarak  $P < 0.05$  anlam düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Son olarak, *Stenotrophomonas sp.* olduğu tespit edilen B8'de kontrole göre 0.1 g/L 2,4-D içeren besiyerindeki bakteri

büyüme miktarının istatistiksel olarak  $P < 0.05$  anlam düzeyinde, 0.5 g/L 2,4-D içeren besiyerinde ise  $P < 0.01$  anlam düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir.



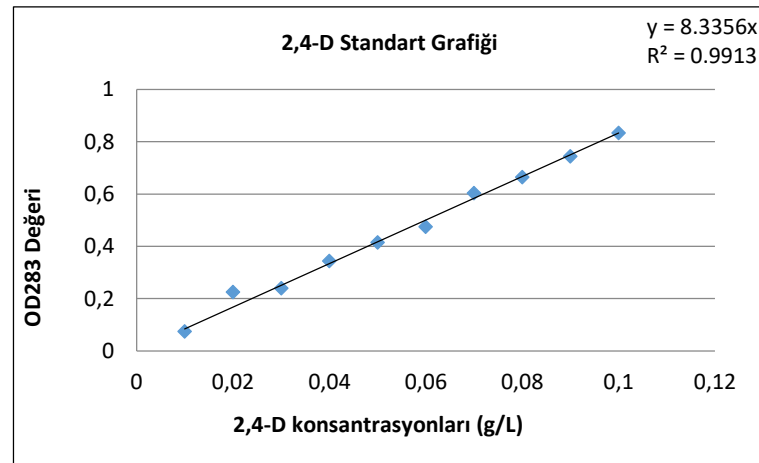
Şekil 2. B serisi 14. gün sonunda toplam bakteri büyüme miktarları. Her bir bakteri suşu için 0,1 ve 0,5 g/L için elde edilen değerler kendi kontrol grubu (0 g/L) ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) ve \*\*\* ( $P < 0.001$ ) şeklinde gösterilmiştir.

### 2,4-D'nin Değişim Miktarının Spektrofotometre Kullanılarak Belirlenmesi

2,4-D kimyasalının spektrofotometre cihazı ile oluşturulan standart grafiği Şekil 3'de verilmiştir.

MTB ortamında 0.5 g/L 2,4-D içeren tüplere ekim yapılan bakteriler 14. gün sonunda uzaklaştırılarak, 2,4-D'nin

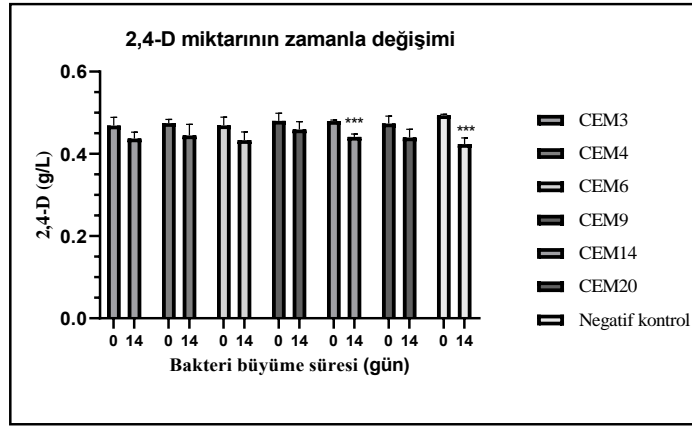
kalan miktarı besi ortamının 283 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek standart grafik formülü ( $y = 8.3356x$ ) aracılığıyla hesaplanmış ve istatistiksel karşılaştırmaları yapılmıştır. Şekil 4 ve 5 kolonlarında anlamlı çıkan karşılaştırma verileri \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) ve \*\*\* ( $P < 0.001$ ) şeklinde sunulmuştur.



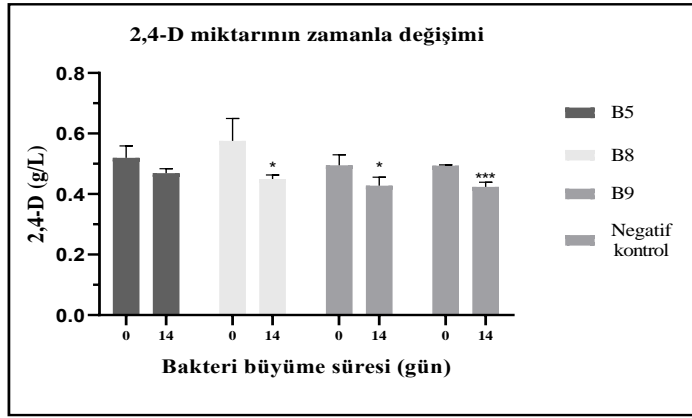
Şekil 3. 2,4-D Standart grafiği

CEM serisinden sadece CEM14'de 14. gün sonunda 2,4-D miktarında anlamlı bir azalma ( $P < 0.001$ ) görülürken B serisinden B8 ve B9'da anlamlı bir azalma ( $P < 0.05$ ) tespit edilmiştir. Diğer taraftan her iki serinin de negatif

kontrollerinde 14. gün sonunda 2,4-D miktarlarında anlamlı bir azalma ( $P < 0.001$ ) gözlemlenmiştir (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4. CEM serisinde 0.5 g/L 2,4-D içeren besi ortamında 2,4-D miktarının 14. gün sonunda spektrofotometre ile ölçülen değişimi. Her bir bakteri suşu için elde edilen 14. gün sonu kimyasal miktarı kendi kontrol grubu (0.gün) ile karşılaştırılmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar \* ( $p<0.05$ ), \*\*( $P<0.01$ ) ve \*\*\* ( $P<0.001$ ) şeklinde gösterilmiştir. Negatif kontrol: Bakteri içermeyen ortam

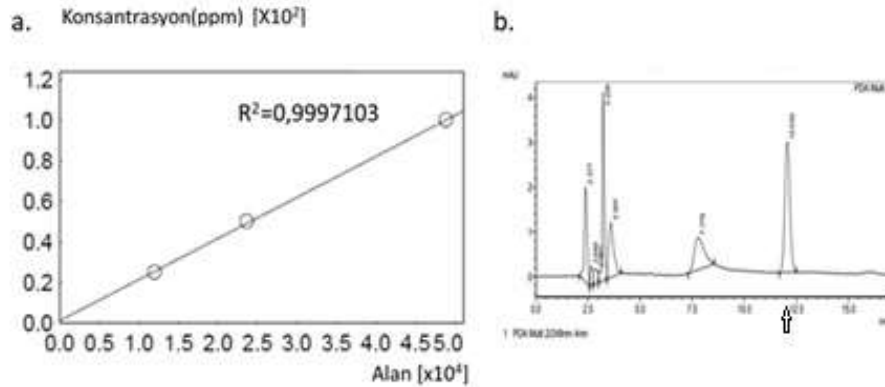


Şekil 5. B serisinde 0.5 g/L 2,4-D içeren besi ortamında 2,4-D miktarının 14. gün sonunda spektrofotometre ile ölçülen değişimi. Her bir bakteri suşu için elde edilen 14. gün sonu kimyasal miktarı kendi kontrol grubu (0.gün) ile karşılaştırılmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar \* ( $p<0.05$ ), \*\*( $P<0.01$ ) ve \*\*\* ( $P<0.001$ ) şeklinde gösterilmiştir. Negatif kontrol: Bakteri içermeyen ortam

#### 2,4-D'nin HPLC ile mikrobiyal yıkım miktarının belirlenmesi

HPLC cihazı ile üç farklı 2,4-D derişimi ölçülmüş ve  $f(x)=0.00202609*x+1.18181$  formülü elde edilerek Şekil 6a'da verilen standart grafik oluşturulmuştur. Yukarıda

verilen formülde fx 2,4-D'nin X100 ppm cinsinden miktarını, x ise ilgili derişim için cihazın verdiği  $X10^4$  alan değerini temsil etmektedir. Ölçülen örnekler bu formül ile hesaplanmıştır. Standart grafiğin oluşturulmasında kullanılan 2,4-D kimyasal kromatografi görüntüsü Şekil 6b'de verilmiştir.

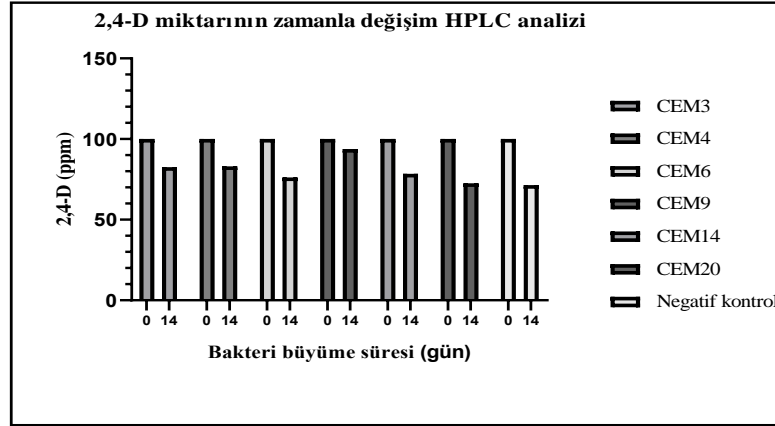


Şekil 6. a. HPLC 2,4-D standart grafiği. b. HPLC 2,4-D (100 ppm) standart kimyasal kromatografi görüntüsü. Pik çıkış zamanı 12. dakika olarak belirlenmiş ve ok ile gösterilmiştir.

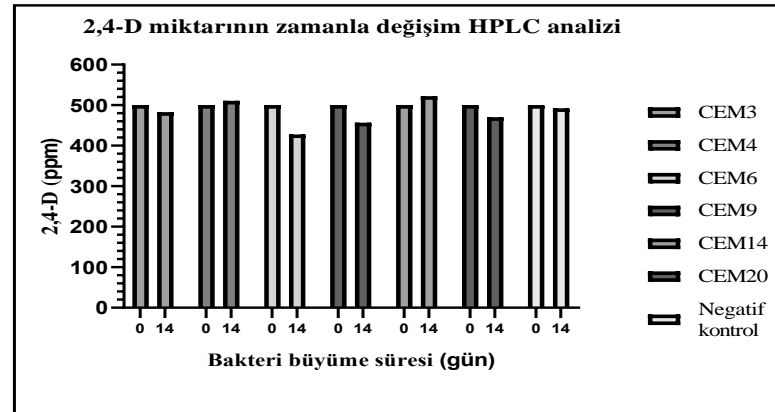
MTB ortamında 100 ve 500 ppm 2,4-D içeren tüplere ekim yapılan bakteriler uzaklaştırılarak 14. gün sonunda, 2,4-D kimyasalının HPLC cihazı ile 248 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür.

Ölçümler sonucunda, CEM serisi bakterilerinde 100 ppm ve 500 ppm 2,4-D içeren besiyerlerinde 14. gün sonunda

2,4-D kimyasalının miktarlarındaki değişimin negatif kontroldeki değişime benzer şekilde olduğu görülmüştür (Şekil 7 ve 8). CEM serisinde HPLC analizi ve spektrofotometrik ölçümler sonucunda 2,4-D kimyasalının miktarlarındaki değişimin benzer olması sebebiyle B serisi için bu kapsamda bir deney tasarlanmamıştır.



Şekil 7. CEM serisinde 100 ppm 2,4-D içeren besi ortamının 14. gün sonunda HPLC ile 2,4-D miktar tayini. Negatif kontrol: Bakteri içermeyen ortam



Şekil 8. CEM serisinde 500 ppm 2,4-D içeren besi ortamının 14. gün sonunda HPLC ile 2,4-D miktar tayini. Negatif kontrol: Bakteri içermeyen ortam

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tanımlanan bakteriler, tek karbon kaynağı olarak 2,4-D kimyasalını barındıran besiyerinde tutulmuş ve büyüme oranları ölçüldüğünde ilgili kimyasalı kullanabiliyor olabilecekleri düşünülmüştür. Ancak, işlem sonunda 2,4-D miktarının spektrofotometre ile ölçülmesi sonucunda 2,4-D'nin hiç kullanılmamış olabileceği ortaya çıkmıştır.

Ancak böyle bir durumda bakterilerin karbon kaynağı olarak neyi kullanıyor olabileceği bir belirsizlik olarak kalmıştır. Öncelikle gözlemi netleştirmek için HPLC

ölçümleri de gerçekleştirilmiş ve akla gelen bazı olası durumlar değerlendirilmiştir.

Bunlardan ilki bakterilerin havadaki serbest CO<sub>2</sub>'yi kullanarak ototrof bir yaşam sergilemeleri olasılığıdır. Ancak literatüre bakıldığında tanımladığımız bakterilerin hiçbirinin ototrof olmadığı tespit edilmiştir (Percival ve Williams 2014).

İkinci olasılık ise; kullanılan 2,4-D miktarının, yani 2,4-D toplam miktarındaki azalmanın, ölçülemeyecek kadar düşük olmasıdır. Bunu değerlendirmek için 10 mL besi



ortamına 0.005 g 2,4-D karbon kaynağı ve başlangıç bakteri sayısı olarak ortalama  $4.51 \times 10^7$  bakteri konulmuş, 14. gün sonunda bakteri kütlelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Güven ve Demirel Zorba (2013)'ya göre bir bakterinin ortalama kütlesi  $0.2 \times 10^{-12}$ g'dır. Buna göre; 0.005 g, yaklaşık  $2.5 \times 10^{10}$  adet bakteriye karşılık gelmektedir. Deneylerimizde son durumda ölçülen bakteri absorbansı yaklaşık 0.400'dir ve bu ortalama 1 mL'de  $4.51 \times 10^8$  yani 10 mL'de  $4.51 \times 10^9$  tane hücreye denk gelmektedir. Yapılan bu hesaplamalara göre bakterilerin çok az karbon kaynağı ile bu sayılara ulaşabildikleri düşünülmüştür. Dolayısıyla kullanılan 2,4-D miktarının HPLC ve spektrofotometre cihazı ile ölçümlerde fark edilemeyecek denli düşük olabileceği akla uygun görünmektedir.

Üçüncü olasılık; 2,4-D'nin kullanılmasına rağmen üretilen bir metabolit veya atığın 2,4-D'ye çok benzer özellikler göstermesidir. Bunun sebebi olarak literatürde bulunan spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilen ölçümlerde, bakterilerin ürettikleri atıkların ve metabolitlerin ölçümleri etkilediği görüşü düşünülebilir (Güngör 2007). Bu düşüncenin doğruluğunu test etmek için aynı koşullar altında sadece bakteri sayısını arttırarak yeni bir deney tasarlanmıştır. Bu deney ile bakterilerin ürettikleri metabolit miktarı artmasından dolayı spektrofotometre ölçümlerinde kayda değer bir artış gözlemlenmiştir. Yapılan bu deney sonucunda 2,4-D kimyasalı ile bakterilerin ürettikleri maddelerin aynı dalga boyunda olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen bakteriler türler bağlamında değerlendirildiğinde *Acinetobacter baumannii* ve *A. calcoaceticus* Gram-negatif basil, kokobasil veya diplokok şeklinde görülen, hareketsiz, dünyadaki toprak ve su kaynaklarında bulunan bir mikroorganizma türüdür (Dal ve ark. 2012). *Stenotrophomonas sp* ise gram negatif, aerofilik ve hareketli bir basildir (Doyuran 2012).

*A. baumannii* bakterisi ile yapılmış olan birçok çalışmada, bu bakterinin enerji kaynağı olarak karbon ve çeşitli maddeleri kullanabildiği gösterilmiştir. Örneğin; yapılan bir çalışmada bu bakteri türünün dizel yağını % 99 oranında kullandığı bulunmuştur (Palanisamy ve ark. 2014). Buna ilaveten *A. baumannii* bakterisinin klorlu

aromatik aminlerden biri olan 4-Kloroanilin kimyasalını karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı (Vangnai ve Petchkroh 2007), bir diğer çalışmada ise, diklofop-metil herbisitini karbon kaynağı olarak kullandığı belirtilmiştir (Smith-Grenier ve Adkins 1996).

İzole ettiğimiz *Acinetobacter calcoaceticus*'in S30 suşunun ham petrolü yıkabildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Lal ve ark. 1996). *Acinetobacter baumannii*'nin tek başına 2,4-D kimyasalını yıkamadığı fakat bir 2,4-D yıkım plazmidi olan pJP4 ile konjugantının bu kimyasalı dramatik şekilde yıktığı gösterilmiştir (Zwieten ve ark. 1995). Bizim çalışmamızda izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşunun da daha önceki çalışmalarda görüldüğü gibi pJP4 plazmidi içermeyen *A. baumannii* bakterisi suşlarıyla benzer şekilde 2,4-D kimyasalını yıkım potansiyelinin olmadığı tespit edilmiştir. *Stenotrophomonas sp.* bakterilerinin ise 2,4-D ve Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate kimyasallarını karbon kaynağı olarak kullandığına dair raporlar bulunmaktadır (Sayyed ve ark. 2019, Han ve ark. 2014). Ayrıca, yapılan bir çalışmada, aynı cins içerisinde yer alan *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisinin 2,4-D kimyasalını yıkım kabiliyeti olduğu belirtilmiştir (Silva ve ark. 2007). *Stenotrophomonas maltophilia*'nın 2,4-D yıkım potansiyelinin daha önce belirlenmesi dolayısıyla bu çalışmada izole edilen *Stenotrophomonas sp.* türünün aynı olmadığı veya en azından farklı suşlar olması gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; 2,4-D uygulanmış Balıkesir tarım arazi toprağından izole edilen bakteriler *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Stenotrophomonas sp.* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bakterilerin, bu kimyasalı kullanabilme yeteneğinin olmadığı, ancak ilgili bakterilerin 2,4-D'li ortamda büyüyebildikleri gözlemlenmiştir. Öte yandan, bakterilerin 14 günlük inkübasyon süresinin kısa gibi görünmesine rağmen 36 saatte sonlandırılan çalışmalar bulunmaktadır (Xia ve ark. 2017). Son olarak, bakteriler dışında farklı mikroorganizmaların (örneğin *Ascomycota* ve *Basidiomycota* şubelerine ait funguslar) 2,4-D kimyasalı yıkım kabiliyetlerinin olduğu rapor edilmiştir (Serbent ve ark. 2019). İlerleyen çalışmalarda 2,4-D kimyasalı yıkım kabiliyetlerinin belirlenmesi için



bakterilerin yanında fungus veya tek hücreli ökaryotik canlılar da eklenebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2018/5-6 YLS Nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Başaran, MS, Serim, AT (2010) Herbisitlerin Toprakta Parçalanması. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi 24 (2): 54-61
- Boivin A, Amellal S, Schiavon M, Genuchten MT (2005) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. Environmental Pollution 138: 92-99
- Dal T, Dal MS, Ağır İ (2012) *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. Van Tıp Dergisi 19 (3): 137-148
- Don RH, Pemberton JM (1981) Properties of Six Pesticide Degradation Plasmids Isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Bacteriology 68:1-686
- Doyuran S (2012) Çeşitli Klinik Örneklerden *Stenotrophomonas maltophilia* İzolasyonu ve Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60 s
- Fulthorpe R, McGowan C, Maltseva OW, Holben WE, Tiedje JM (1995) 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria Contain Mosaics of Catabolic Genes. Applied and Environmental Microbiology 60(9): 3274-3281
- Güngör B (2007) 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin (2,4-D) İmmobilize *Pseudomonas putida* ile Biyokimyasal Yıkımının İncelenmesi. İzmir Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 101 s
- Güven S, Demirel Zorba NN (2013) Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu. NOBEL yayınları, Ankara
- Han L, Liu Y, He A, Zhao D (2014) 16S rRNA gene phylogeny and tfdA gene analysis of 2,4-D degrading bacteria isolated in China. World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s11274-014-1680-6
- In-Hyun P, Jong-Ok K (2003) Isolation and Characterization of 4-(2,4-Dichlorophenoxy) Butyric Acid-Degrading Bacteria from Agricultural Soils. Journal of Microbiology and Biotechnology 13(2): 243-250
- Kaya D (2016) Pestisitlerin (Sentetik, Doğal ve Biyopestisit) Mikrobiyal Floraya Etkisi. Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115 s
- Kumar A, Trefault N, Olaniran AO (2016) Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. Critical Reviews in Microbiology 42(2): 194-208
- Lal B, Khanna S (1996) Degradation of Crude Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. Journal of Applied Bacteriology 81: 355-362
- Oliveira KO, Silva ARM, Silva BFDA, Milagre HMS, Milagre CDF (2018) Insights into The Microbial Degradation Pathways of The Ioxyniloctanoate Herbicide. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 13: 258-264

- Özdaş E, Utku A, Uyanıkgil Y, Baka M, Yavaşoğlu A, Biçer S, Ergen G (2006) Bir Herbisit Olan 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in Sıçanlarda Testis Dokusu Üzerine Etkisi. Ege Tıp Dergisi 45(3): 169-174
- Palanisamy N, Ramya J, Kumar S, Vasanthi NS, Chandran P, Khan S (2014) Diesel Biodegradation Capacities of Indigenous Bacterial Species Isolated from Diesel Contaminated Soil. Journal of Environmental Health Science & Engineering 12: 142
- Percival SL, Williams DW (2014) *Acinetobacter*. (Microbiology of Waterborne Diseases, Elsevier, Hollanda: Ed. Percival S, Yates MV, Williams D, Chalmers R, Gray N) 35-48
- Santacruz G, Bandala ER, Torres LG (2005) Chlorinated Pesticides (2,4-D and DDT) Biodegradation at High Concentrations Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Environmental Science and Health 40(4): 571-583
- Sayyed RZ, Wani SJ, Shaikh SS, Al-Harhi HF, Syed A, El-Enshasy HA (2019) Thermophilic PHB Depolymerase of *Stenotrophomonas* Sp., an Isolate from The Plastic Contaminated Site is Best Purified On Octyl-Sepharose CL-4B. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/618967v1>
- Serbert MP, Rebelo AM, Pinheiro A, Giongo A, Tavares LBB (2019) Biological Agents for 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid Herbicide Degradation. Applied Microbiology and Biotechnology 103: 5065-5078
- Silva TM, Stets MI, Mazzetto AM, Andrade FD, Pileggi SAV, Fávero PR, Cantú MD, Carrilho E, Carneiro PIB, Pileggi M (2007) Degradation of 2,4-D Herbicide By Microorganisms Isolated From Brazilian Contaminated Soil. Brazilian Journal of Microbiology 38: 522-525
- Smith-Grenier LL, Adkins A (1996) Isolation and Characterization of Soil Microorganisms Capable of Utilizing The Herbicide Diclofop-Methyl as a Sole Source of Carbon and Energy. Canadian Journal of Microbiology 42: 221-226
- Vangnai AS, Petchkroh W (2007) Biodegradation of 4-Chloroaniline by Bacteria Enriched from Soil. FEMS Microbiology Letters 268: 209-216
- Xia ZY, Zhang L, Zhao Y, Yan X, Li SP, Gu T, Jiang JD (2017) Biodegradation of The Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by a New Isolated Strain of *Achromobacter* sp. LZ35. Current Microbiol 74(2): 193-202
- Uysal A, Kurt Ş, Soylu S, Soylu Em, Kara M (2019) Yaprığı Yeneni Sebzelelerdeki Mikroorganizma Türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) Tekniği Kullanılarak Tanılanması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi 29(4)
- Yakar S (2014) Muğla Bölgesinde Yaygın Kullanılan Bazı İnsektisitlerin Domates (*L. esculentum* Mill.) Bitkisinde Lipit Peroksidasyon ve Antioksidatif Sistem Üzerine Etkileri, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 128 s
- Zhou H, Xiang J, Zhao Y, Chen Y (2018) Improvements of Pd/Fe Nanoparticles by Ethylenediamine Disuccinic acid for 2,4-D Dechlorination. Separation and Purification Technology 207: 377-386
- 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. The Journal of General and Applied Microbiology 61: 165-170
- Zwieten VL, Feng L, Kennedy LR (1995) Colonisation of Seedling Roots by 2,4-D Degrading Bacteria: A Plant-Microbial Model. Acta Biotechnol. 15: 27-39