

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM  
DALI

**PESTİSİT KONTAMİNASYONU OLAN TÜTÜN ARAZİSİNDEN  
ORGANOFOSFORLU BİLEŞİKLERE DİRENÇLİ BAKTERİLERİN  
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve YAVAŞ  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

VAN – 2023



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM  
DALI

**PESTİSİT KONTAMİNASYONU OLAN TÜTÜN ARAZİSİNDEN  
ORGANOFOSFORLU BİLEŞİKLERE DİRENÇLİ BAKTERİLERİN  
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve YAVAŞ

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından  
FYL-2022-10131 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2023





**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ danışmanlığında, Merve YAVAŞ tarafından sunulan “**Pestisit Kontaminasyonu Olan Tütün Arazisinden Organofosforlu Bileşiklere Dirençli Bakterilerin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 28 /08 /2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç Dr. Erdal ÖĞÜN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Funda ÖZDEMİR DEĞİRMENCİ

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..../..../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....  
Enstitü Müdürü



## ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Merve YAVAŞ





## ÖZET

### PESTİSİT KONTAMİNASYONU OLAN TÜTÜN ARAZİSİNDEN ORGANOFOSFORLU BİLEŞİKLERE DİRENÇLİ BAKTERİLERİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YAVAŞ, Merve

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

Ağustos 2023, 43 sayfa

Pestisitler günümüzde tarım, ilaç ve endüstri alanlarında kullanımı artan kimyasallar olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda çevre ve sağlık açısından kritik niteliklere sahip olan organoklorlu pestisitlerin yerini daha az zararlı olduğu düşünülen organofosforlu pestisitler almıştır. Ancak yapılan araştırmalarla organofosforlu pestisit sınıfında bulunan etken maddelerin de birçok karasal ve sucul ekosistemi yoğun olarak kontamine ettiği belirlenmiştir. Yaygın olarak kullanılan organofosfatlardan biri olan klorpirifos birçok tarım alanında insektisit olarak kullanılmaktadır. Ancak oluşturduğu toksik kalıntılar ile tarım ürünleri ile birlikte alınmasının dışında çeşitli yaşam alanlarındaki hedef dışı canlıların da etkilenmesine neden olmaktadır.

Bu tez ile birlikte, yer altı sularına bulaşma riski yüksek olan ve insanlarda özellikle endokrin sistemi etkileyen ve nörotoksik işleyişe zarar verdiği bilinen klorpirifos pestisit etken maddesini degrade edebilen bakteri suş veya suşlarının topraktan izolasyonu hedeflenmiştir. Tez kapsamında 40 yılı aşkın süredir pestisit kontaminasyonu olduğu bilinen Adıyaman İl sınırları içerisindeki tütün arazisinden alınan toprak örnekleri ile çalışılmıştır. Toprakta bulunan mikroorganizmalar enerji kaynağı olarak sadece klorpirifos bulunan minimal besiyerinde bu etken maddeyi kullanmaya zorlanmışlardır. Klorpirifosun kademeli artışı ile gerçekleşen zenginleştirme süreci sonunda morfolojik olarak ayırt edilen 23 bakteri izolatu belirlenmiştir. İzolatlar, mikroskopik analizler ve farklı kültür ortamları kullanılarak saf kültür olarak elde edilmişlerdir. Moleküler karakterizasyon için 16S rDNA bölgesi analiz edilmiş ve tanımlanan bakterilerin üç farklı cinse (*Klebsiella*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*) ait olduğu tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışması, klorpirifosu parçalayabilen bakterilerin teşhisi amacıyla yapılan ülkemizdeki ilk çalışma olması nedeni ile ileri çalışmalara öncülük edebilecek bir çalışma olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** 16S rDNA, Biyodegradasyon, *Klebsiella*, Klorpirifos, Moleküler karakterizasyon, Organofosforlu pestisit, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*



## ABSTRACT

### RESISTANT TO ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS FROM PESTICIDE CONTAMINATED TOBACCO LAND IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIA

YAVAŞ, Merve

M.Sc. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tuğba ÖZAKTAŞ

August 2023, 43 pages

Pesticides are emerging as chemicals that are increasingly used in agriculture, medicine and industry. In recent years, organochlorine pesticides, which have negative impacts in terms of environment and health, have been replaced by organophosphorus pesticides, which are thought to be less harmful. However, it has been determined that the pesticides in the organophosphorus class heavily contaminate many terrestrial and aquatic ecosystems. Chlorpyrifos, one of the widely used organophosphates, is used as an insecticide in many agricultural areas. However, the toxic residues it creates, cause the non-target creatures in various habitats to be affected, as well as being taken with agricultural products.

In this thesis, the aim was to identify bacterial isolates from soil that can degrade chlorpyrifos, known to damage the endocrine and neurotoxic system in humans and has a high risk of contaminating groundwater. For this reason, soil samples were collected from a tobacco field in Adiyaman province known to have pesticide contamination for more than 40 years. Microorganisms in the soil were forced to use this active substance in minimal media containing only chlorpyrifos as an energy source. At the end of the enrichment process with the gradual increase of chlorpyrifos, 23 bacterial isolates were morphologically differentiated. Isolates were obtained as pure culture using microscopic examinations and different culture media. As a result of molecular characterization by analyzing the 16S rDNA region the identified bacteria belonged to three different genera (*Klebsiella*, *Sphingobacterium*, and *Pseudomonas*). This thesis is the first study in Türkiye to determine the chlorpyrifos degradable bacteria, as it has been a study that can guide further studies.

**Keywords:** 16S rDNA, Biodegradation, Chlorpyrifos, *Klebsiella*, Molecular characterization, Organophosphorus pesticide, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*



## TEŞEKKÜR

Aklın gücünden kuvvetli olan tek şey kalbin cesaretidir der John Nash. Cesaret kaynağımı bulmamda önderlik eden, tüm sorularıma, sorunlarıma ve dâhi cevaplarıma kapısını her daim açık bırakan, olmazları ilke edinenlerin tersine bilime katkı sağlayacak her türlü fikre her zaman olurlarıyla yaklaşan, çalışarak kazanılamayacak kadar değerli bir sermaye olan dürüstlük, sabır, erdem ve iş ahlâkını lisans eğitimimden bu yana bana kazandıran, yüksek lisans çalışmamda uzmanlaşmam için desteklerini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel süreçlerde her zaman desteğini gördüğüm, tez değerlendirme sürecinde de değerli katkılarda bulunan Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'e; değerli vaktini ayırarak tez değerlendirme sürecinde bulunan Dr. Öğr. Üyesi Funda ÖZDEMİR DEĞİRMENCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam boyunca deneysel süreçlerdeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ayten TEKPİNAR ve değerli ekibi Arş. Gör. Ayşenur KALMER ve Şüheda ALDEMİR'e, çalışma numunesi olan toprak teminindeki desteklerinden dolayı Serdan TURAP ve Mehmet ÇELİKTEN'e teşekkürlerimi sunarım. Başta Ayşe Gözde BİÇEK olmak üzere yüksek lisans süreci boyunca birlikte çalıştığım değerli laboratuvar ekip arkadaşlarıma ve bu çalışmayı FYL-2022-10131 No'lu proje olarak destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAPB) teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her anımda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen, bugüne gelmemde ve tüm bu teşekkürlerin ve tezin gerçek sahibi olan başta annem, babam ve canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Buraya sığdıramadığım nice teşekkürün sonunu yine ilke edindiğim bir sözle bitirmek istiyorum.

*Şafak vaktinin söyleyecek sırları var, uykuya geri dönme; gerçekten istediğin şeyi sormalısın, uykuya geri dönme. Mevlâna...*

2023

Merve YAVAŞ



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	7
3.1 Materyal .....	7
3.1.1 Toprak Örneği .....	7
3.1.2 Saha Araştırması .....	7
3.1.3 Toprak Örnekleme.....	8
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....	8
3.1.5 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler .....	9
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1 Örneklem Alanına Ait Toprağın Fiziko-Kimyasal Özelliklerinin Tanımlanması .....	11
3.2.2 Pestisit Biyodegradasyon Potansiyeli Olan Bakteri İzolatlarının Zenginleştirilmesi.....	11
3.2.3 Bakteri İzolasyonu .....	12
3.2.3.1 Mikroskopik İnceleme.....	12
3.2.4 İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanmaları .....	13
3.2.4.1 Genomik DNA İzolasyonu.....	13
3.2.4.2 16S rDNA Bölgesinin Çoğaltılması.....	14
3.2.4.3 DNA Fragmentlerinin Doğrulması.....	16
3.2.4.4 DNA Dizi Analizi.....	16
4. BULGULAR .....	17
4.1 Toprağın Fiziko-Kimyasal Özelliklerinin Tanımlanması.....	17
4.2 Pestisit Biyodegradasyon Potansiyeli Olan Bakterilerin Zenginleştirilmesi .....	18

4.3 Pestisit Degredasyon Kabiliyeti Olan İzolatların Morfolojik Olarak Ayrılması .	18
4.3.1 Bakteri İzolatlarının Saf Olarak Elde Edilmesi .....	20
4.3.2 Bakteri İzolatlarının Hücre Duvar Yapılarına Göre Ayrımı .....	21
4.4 Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanımlanmaları .....	22
4.4.1 16S rDNA Bölgesinin PZR Amplifikasyonu .....	22
4.4.2 Moleküler Analiz.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	27
KAYNAKLAR .....	35
ÖZ GEÇMİŞ.....	43



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1 PBS için gerekli kimyasallar .....	9
Çizelge 3.2 CTAB için gerekli kimyasallar.....	9
Çizelge 3.3 1 L 50X TAE Buffer için gerekli kimyasallar.....	10
Çizelge 3.4 TE Buffer için gerekli kimyasallar .....	10
Çizelge 3.5 PZR için kullanılan primerlerin baz dizilimleri ve erime sıcaklıkları (TM) 15	
Çizelge 3.6 PZR karışımı için kullanılan kimyasallar .....	15
Çizelge 3.7 PZR koşulları.....	15
Çizelge 3.8 Elektroforez için DNA örneklerinin hazırlanması .....	16
Çizelge 4.1 Örnekleme toprağının fiziko-kimyasal özellikleri .....	17
Çizelge 4.2 Saf kültür olarak elde edilen izolatların farklı besiyerlerindeki kolonileşme süreleri ve gram tipleri.....	22
Çizelge 4.3 Bakteri izolatlarının adlandırılmaları, benzerlikler oranları ve NCBI erişim numaraları .....	25



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Pestisitlerin ekosistemdeki farklı ortamlara taşınma şekli .....	4
Şekil 2.2 CP'nin kimyasal formülü .....	5
Şekil 3.1 Toprak örneklerinin alındığı tarım arazisinin coğrafik konumu .....	7
Şekil 3.2 İzolatların ayırd edilmesinde kullanılan farklı koloni morfolojileri.....	13
Şekil 4.1 İzolatların katı besiyerinde belirlenmeleri.....	19
Şekil 4.2 Kontrol gruplarının katı besiyerlerinin inkübasyon sonu görüntüleri.....	19
Şekil 4.3 Saf kültür olarak elde edilen izolatlardan bazıları.....	20
Şekil 4.4 İzolatların gram boyama sonrası elde edilen 1000 X mikroskop görüntüleri .	21
Şekil 4.5 16S rDNA bölgesine ait PZR sonuçlarının elektroforez görüntüsü.....	23
Şekil 4.6 AB4 izolatına ait 16S rDNA bölgesinden geri primer ile elde edilmiş sekans kromatogramının bir parçası .....	24
Şekil 5.1 16S rDNA bölgesine ait V1-V9 değişken ve korunmuş bölgeler .....	30



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>B</b>	Bor
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>Cu</b>	Bakır
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>Fe</b>	Demir
<b>g</b>	Gram
<b>L</b>	Litre
<b>mg</b>	Miligram
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn</b>	Mangan
<b>Na</b>	Sodyum
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>ng</b>	Nanogram
<b>U</b>	Ünite
<b>Zn</b>	Çinko
<b>µl</b>	Mikrolitre

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>bç</b>	Baz Çifti
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CP</b>	Klorpirifos
<b>CTAB</b>	Setrimetil Amonyum Bromür
<b>da</b>	Dekametre
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dS</b>	Desimens
<b>EDTA</b>	Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EMB</b>	Eosin Metilen Mavisi(Levin)
<b>F</b>	İleri (forward ) Primer
<b>g</b>	Yer Çekimi Birimi
<b>MSM</b>	Minimal Salt Besiyeri
<b>N</b>	Normalite
<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NaoH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>NBÇG</b>	Normal Büyüyen Çalışma Grubu
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OP</b>	Organofosforlu
<b>PAH</b>	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
<b>PBS</b>	Fosfat Tuz Tamponu
<b>PVP</b>	Polivinilpirolidon
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>R</b>	Geri (reverse ) Primer
<b>rDNA</b>	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
<b>TAE</b>	Tris-asetik Asit-EDTA Tamponu
<b>TE</b>	Tris-EDTA Tamponu
<b>U</b>	Ünite
<b>UV</b>	Ultraviyole

## **Kısaltmalar**

## **Açıklama**

**YBÇG**

Yavaş Büyüyen Çalışma Grubu





## 1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini artırmak için 1940'lı yıllardan beri kullanılan pestisitler modern tarımın tamamlayıcı bir bileşenidir. Pestisit kullanımı, tarımsal ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otlardan koruyabilmek ve kaliteli üretimi güvence altına alabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup, kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, en çok tercih edilen yöntemdir (Tiryaki vd., 2010). Artan nüfus ve ekilebilir tarım alanlarının azalması da gerekçe gösterilerek pestisit kullanımı her geçen gün artmaktadır (Kaymak ve Serim, 2015). Tarımsal alanlarda kullanılan toplam pestisit miktarı küresel düzeyde 2020 yılı için 2.7 milyon ton (Özercan ve Taşçı, 2022), Türkiye pestisit kullanım miktarı ise 2022 yılı için 55 bin tondan fazla olarak belirlenmiştir (TÜİK, 2022). Türkiye'de 2020 yılında bölgeler itibarıyla pestisit kullanımı incelendiğinde, Akdeniz Bölgesi 15 bin ton pestisit kullanımı ile ilk sırada yer alırken, Ege Bölgesi 12.8 bin ton kullanım ile ikinci sırada, Marmara Bölgesi de 9.5 bin tonluk kullanımı ile üçüncü sırada yer almaktadır (TÜİK, 2022).

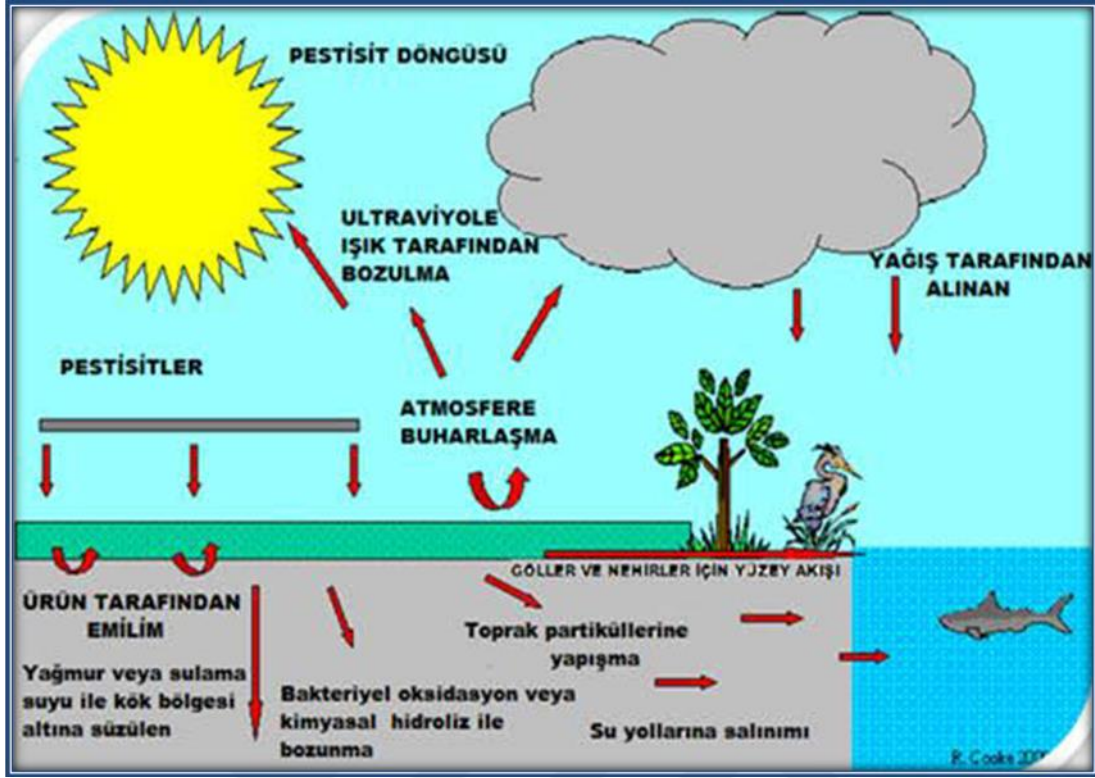
Ülkemiz ekonomisinde tarımın yeri çok büyüktür. Türkiye'de tarım ürünleri, gıda ve endüstri hammaddesi olarak kullanılmalarının yanı sıra ihracatları ile de ekonomiye büyük katkı sağlamaktadırlar. Bu ürünlerin en büyük alıcıları AB ülkeleri ile ABD ve diğer gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerdir (Kızılaslan ve Yaşa, 2011). Ancak tarım ilaçlarının yanlış uygulanması ekolojik kirliliğin yanısıra ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Bu kirleticiler pamuk, tütün, mısır, pirinç gibi ülkemiz ekonomisinde önemli ihracat ürünlerinde kullanılmaktadır. Bilinçsiz pestisit kullanımı ile toprağın ekolojik dengesinde ciddi zararlar oluşarak kullanılabilir tarım arazilerini azaltmakta ve toprak kalitesini düşürmektedir (Delen vd., 2005). Son yıllarda yapılan araştırmalarla çevre ve sağlık açısından kritik niteliklere sahip olduğu belirlenen pestisitler birçok ülkede yasaklanırken bunların yerini daha az zararlı olduğu düşünülen farklı pestisitler almaktadır. Ancak yine araştırmalar göstermektedir ki günümüzde sıklıkla kullanılan "daha az zararlı olduğu düşünülen" pestisitler de birçok karasal ve sucul ekosistemi yoğun olarak kontamine etmektedir. Bunlardan biri olan organofosforlu (OP) pestisitler tarım, ilaç ve endüstride yaygın olarak kullanılmakta (Cantelli-Forti vd., 1993; Chaudhuri vd., 1999) ve dünya çapında böcek ilaçları satışının da %34'ünü oluşturmaktadır (Singh ve Walker, 2006). OP sınıfından olan klorpirifos (CP) dünya çapında yaygın olarak

kullanılmaktadır (Gilani vd., 2015; Bose vd., 2021). CP'nin sürekli kullanımı sonucu hem topraktaki yüksek kalıcılığı nedeni ile tarım arazilerinde biriktiği hem de bu alanların yakınındaki yer altı ve yüzey sularında kirliliğe yol açtığı belirlenmiştir (Liang vd., 2011). Bu nedenle başta Avrupa ülkeleri ve ABD olmak üzere 2019'dan itibaren yasaklanmaya başlamıştır (Dahllof ve Horel, 2019). Ancak Hindistan ve Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde uygun maliyetli olması ve tohum aktivitesini etkilememesi sebebiyle kullanımları halen devam etmektedir (Rathod ve Garg, 2017; Balakrishnan ve Rao, 2019). Ülkemizde de elma, armut, şeftali, patates, domates, biber, patlıcan, tütün, mısır, pirinç başta olmak üzere çeşitli tarım ürünlerinde Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) tarafından 21.05.2020 tarihinde yasaklanana kadar yaygın olarak kullanılmıştır (TOB, 2020).

Tez kapsamında yapılan çalışmanın amacı yer altı sularına bulaşma riski yüksek olan ve insanlarda özellikle endokrin sistemi etkileyen ve nörotoksik işleyişe zarar verdiği bilinen CP ekotoksik pestisitine karşı direnç gösteren ve dolayısıyla biyodegradasyon kabiliyeti olduğu düşünülen bakterilerin tespit edilmesidir. Bu tarz çalışmaların dünya genelinde yoğun olarak devam etmesine rağmen Türkiye topraklarından biyodegradasyon kabiliyeti olan mikroorganizmaların keşfine yönelik herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Tez çalışmasının amacı belirlenirken her organizmanın degradasyon kapasitesi ve yöntemi kendine özgü olacağından yeni bir mikroorganizmanın varlığı veya hali hazırda bilinen bir mikroorganizmadaki biyokimyasal farklılığın önemli olacağı fikrinden yola çıkılmıştır. Bununla beraber, OP bileşiklerin kimyasal yapılarının benzer olması sebebiyle bu gruptaki herhangi bir pestisite karşı degradasyon yeteneğine sahip mikroorganizmaların varlığının ortamda bulunan diğer OP bileşiklerin de degradasyonlarını hızlandıracağı bilinmektedir (Sutherland ve Horne, 2002; Siddavattam vd., 2003; Singh vd., 2004; Singh ve Walker, 2006). Literatürde çapraz adaptasyon olarak tanımlanan bu durum birçok pestisit için kanıtlanmıştır (Wilson, 1984; Cain ve Mitchell, 1996; Warton vd., 2003). OP bileşiklerin benzer kimyasal yapısı ve parçalanma şekillerindeki benzerlik bu bileşikleri de çapraz adaptasyon için oldukça uygun hale getirmektedir (Singh vd., 2004).

## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

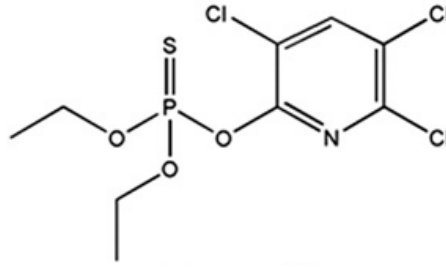
Pestisitler, topraktaki tüm ksenobiyotikler arasında en yaygın kontaminantlardır. Kullanımları, son 50 yıldaki hızlı nüfus artışı ve yüksek kaliteli gıda talebinin artmasıyla, kaçınılmaz bir hal almıştır. 2050 yılında, tarımda pestisit kullanımının 2000 yılından 2.7 kat daha fazla olacağı tahmin edilmektedir dolayısıyla bu durum gelecek nesiller için büyük bir tehdit unsurudur (Oberemok vd., 2015). Pestisitlerin kullanım miktarındaki artış, zararlı çevresel etkilere neden olmakla birlikte sucul veya karasal diğer canlılar gibi hedef olmayan organizmaları da olumsuz etkilemektedir (Cantelli-Forti vd., 1993; Chaudhuri vd., 1999). Son zamanlarda yapılan çalışmalar pestisitlerin nörotoksik etkilerini kanıtlamıştır. Pestisitlere yoğun olarak maruz kalmak, doğrudan veya dolaylı olarak ölüme yol açabilecek ciddi rahatsızlıklarla sonuçlanmaktadır (Simonelli vd., 2007). Bu rahatsızlıkların başında Hodking lenfoma (Luo vd., 2016), Parkinson (Brouwer vd., 2017), endokrin sistem bozukluğu (Freire vd., 2013) gelmektedir. Ayrıca göğüs ve prostat kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünü tetiklediği de bilinmektedir (Thongprakaisang vd., 2013). Pestisitlerin oluşturduğu kalıntıların çevre ve tarım arazilerindeki dağılımı su, toprak ve hava ekosistemlerinin kirlenmesine yol açar ve insanların kullanmış olduğu gıdaların da yapısında değişikliklere neden olur. Pestisit kullanımı ile toksik maddeler çoğunlukla toprakta birikim yapmakta ve buradan da su kaynaklarına geçerek daha büyük çapta ekolojik zararlara neden olmaktadır (Şekil 2.1). Sonuç olarak bu ekolojik kirlilik biyolojik çeşitliliğin zarar görmesine neden olmakla birlikte (Pico vd., 2018) iklim değişikliğinin de etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Alvarenga vd., 2018).



Şekil 2.1 Pestisitlerin ekosistemdeki farklı ortamlara taşınma şekli (Tiryaki ve Potur, 2017)

Pestisitler yapılarına bağlı olarak organoklorlu bileşikler, OP bileşikler, karbamatlar, piretroidler ve biyopestisitler olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar (Sun vd., 2020). Bu gruplardan biri olan OP bileşikler tarım, ilaç ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Cantelli-Forti vd., 1993; Chaudhuri vd., 1999). Bu bileşikler hedef ve hedef dışı organizmalar için oldukça toksiktirler (Portier vd., 2016). Özellikle insanlarda görme bozuklukları, solunum sistemi rahatsızlıkları ve üreme döngüsünde olumsuz sonuçlara neden olabilmektedirler (Vassilev ve Kambourova, 2006). OP pestisitler kolinesterazlara bağlanarak post-sinaptik bağlantılarda asetilkolinin, kolin ve asetik asidin hidrolizini bloke eder. Asetilkolinesterazın (AChE) birleşmesinin engellenmesinden dolayı asetilkolin birikir, kasların hızlı bir şekilde seğirmesi, koordinasyon, konvülsiyonlar, felç ve nihayetinde ölüm ile sonuçlanır (Korhonen vd., 1990; Kolakowski vd., 1997). OP sınıfından olan CP, geniş spektrumlu bir böcek ilacıdır (Şekil 2.2). Dünya çapında yaygın olarak kullanılan bu etken maddenin sağlık üzerine ciddi etkileri olduğu bilinmektedir (Yücel vd., 1999). Kronik etkiler kanser, doğum defektleri, nörotoksisite, nörodavranışsal bozukluklar, nörofizyolojik değişiklikler (Lee

vd., 2004) ile endokrin sistem üzerine olan negatif etkiler ile üreme ve fertilité üzerine etkiler olarak da sıralanabilir (Eskenazi vd., 1999; Qiao vd., 2001; Rawlings vd., 2010; Viswanath vd., 2010). Özetle CP insan ve hayvanlar üzerinde oldukça etkili bir toksik maddedir.



Şekil 2.2 CP'nin kimyasal formülü. (Liang vd., 2011)

Tarım topraklarındaki sürekli pestisit kullanımı, özellikle 1940 yılından beri yoğun bir şekilde devam etmesi sebebi ile toprakta mevcut halde bulunan kalıntıların temizlenmesi tarım arazilerinin sürdürülebilirliği, ürün verimliliği ve kalitesi amacıyla gerekmektedir. Bu durumla başa çıkabilmek için, genellikle toprağın yüzey katmanlarında birikimin artması ve çevrede kalıcılığı ile sonuçlanan yaygın pestisit kullanımına karşı önlemler geliştirilmektedir (Wolejko vd., 2020). Pestisit birikimine karşı alınan önlemlerden biri olan fizikokimyasal stratejilere dayalı enzimlerle biyolojik iyileştirme, pestisitlerin zararsız türlere parçalanması olayıdır. Ancak doğal enzimlerin kullanılması genellikle yüksek maliyet ve yan ürünlerinin de çevreye zararlı olması açısından endüstriyel biyoteknolojide tercih edilmemektedir (Bilal vd., 2019). Bir diğer yöntem olan mikrobiyal degradasyon, bu kimyasalların mikroorganizmalar aracılığı ile iyileştirilmesidir (Sun vd., 2020). Bazı toprak mikroorganizmalarının, pestisitleri karbon, azot, fosfor ve kükürt kaynakları olarak kullanılabildikleri literatürdeki çalışmalarda bildirilmiştir (Narayanan vd., 2020; Whangchai vd., 2021).

CP'nin topraktaki kalıcılığı toprağın türü, nemi, pH'sı gibi pek çok özelliğe bağlı olarak ve çevre koşullarının da etkisi ile 240 güne kadar devam etmektedir (Racke, 1993; Singh vd., 2004). Abiyotik etkilerin yanı sıra toprağın içerdiği mikroorganizma çeşitliliği de CP'nin degradasyonunda bir o kadar etkilidir (Liang vd., 2011). Bu nedenle pestisit atıklarının temizlenmesinde, pestisite maruz kalmış farklı alanlardan izole edilen mikroorganizmaların kullanılabileceği gösterilmiştir (Singh vd., 1999; 2004; Yang vd., 2006;

Qiu vd., 2007; Pino ve Penuela, 2011). Çeşitli topraklardan izole edilen ve pestisit kullanma yeteğine sahip *Rhodococcus* (Parente vd., 1994), *Flavobacterium*, *Pseudomonas* cinslerine ait farklı türler (Sethunathan ve Yoshida, 1973; Rani ve Lalithakumari, 1994; Rani vd., 2008) daha önceki çalışmalarda CP'nin biyodegradasyonu için kullanılmıştır. Bununla birlikte CP ile kontamine edilmiş tarım arazisinden izole edilen *Bacillus licheniformis* (Zhu vd., 2010), *P. putida* (Ajaz vd., 2005), *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* ve *B. subtilis* (Rani vd., 2008; Dua ve Joshi, 2020) türlerinin CP'yi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği bildirilmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Toprak Örneği

Tez kapsamında çalışılacak toprak örneği Adıyaman ilinde tütün yetiştirilen bir tarım arazisinden temin edilmiştir. Arazi Adıyaman merkezine bağlı olup 22 km uzağında bulunan atalağa köyündeki GPS koordinatları 37°57'27.3600" Kuzey ve 38°18'18.3564" Doğu olan mevkiidedir (şekil 3.1).



şekil 3.1 Toprak örneklelerinin alındığı tarım arazisinin coğrafik konumu

##### 3.1.2 Saha Araştırması

Çalışma başlatılmadan önce Türkiye genelinde tarım arazilerinde bir saha araştırması yapılmıştır. Pestisit kullanan araziler içinde, yoğun olarak OP pestisitlerden CP'yi kullanan bir arazi olarak, tütün üretimi yapılan Adıyaman il sınırları içerisindeki arazi örnekleme alanı olarak belirlenmiştir. Belirlenen arazide Kasım 2018 tarihinde ön çalışma olarak TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri

Destekleme Programı kapsamında desteklenen “Pestisit Kontaminasyonu Olduğu Bilinen Tarım Arazisinden Klorpirifosa Dayanıklı İzolatların Belirlenmesi” projesi yürütülmüş olup çalışma sonunda etken maddeye dayanıklı 4 izolat tespit edilmiştir.

### **3.1.3 Toprak Örnekleme**

Numuneler aynı tarla arazisinin beş farklı alanından 0-20 cm derinlikten alınmıştır (Liang vd., 2011; Akbar vd., 2014). Toplanan örnekler steril plastik bir torbada karıştırılıp en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 2 mm’lik bir elekten elenerek deneysel süreçler için 4°C’de muhafaza edilmiştir (Akbar vd., 2014).

### **3.1.4 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

#### ***MSM-M9 Besiyeri***

MSM-M9 5X (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g/L, NaCl, 2.5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33.9 g/L, NH<sub>4</sub>Cl, 5 g/L) besiyerinden 200 mL hazırlanıp, 2 mL 1 M MgSO<sub>4</sub> ilave edilerek 1X elde etmek için toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 50 mL olarak 250 mL’lik erlenmeyerlere aktarılmış ve 121°C’de 20 dk otoklavlanmıştır.

#### ***NA Besiyeri***

NB besiyerinden alınan 8 g 1 L dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmesinin ardından 15 g agar eklenerek 121°C’de 20 dk otoklavlanmıştır. Yaklaşık 45°C’ye kadar soğutulan besiyerine ilgili miktar kadar CP eklenip çözdürülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan katı besiyerleri 4°C’de muhafaza edilmiştir.

#### ***Antibiyotik İçeren Eosin Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri***

EMB agar besiyerinden 37.5 g bir miktar dH<sub>2</sub>O çözdürülerek son hacim 1 L olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Ardından 121°C’de 20 dk otoklavlanmıştır. Steril hale

getirilen besiyerine 2500 IU/mL penisilin G benzatin eklenmiştir. Katı besiyeri ortamı sağlanarak 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.1.5 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

#### *Fosfat Tuz Tamponu (PBS)*

Çizelge 3.1'de verilen kimyasallar 800 mL dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülmüştür. pH değeri 1 N HCl ilavesi ile 7.4'e ayarlanmış ve dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1 PBS için gerekli kimyasallar

Konsantrasyon	Miktar (1 L)
137 mM NaCl	8 g
2.7 mM KCl	0.2 g
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

#### *CTAB*

Çizelge 3.2'de verilen kimyasallar karıştırılıp su banyosunda 60°C'de tamamen çözünmesi sağlanmasının ardından 100 mL'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2 CTAB için gerekli kimyasallar

Konsantrasyon	Miktar (100 mL)
CTAB	2 g
Tris-HCl (1 M pH:8)	10 mL
EDTA	4 mL

Çizelge 3.2 CTAB için gerekli kimyasallar(devam)

Konsantrasyon	Miktar (100 mL)
NaCl	28 mL
PVP	2.76 g

### ***TAE Buffer***

Çizelge 3.3’de verilen kimyasallar karıştırılıp toplam hacim 1 L olarak ayarlanmıştır. 121°C’de 20 dk otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kullanım için 1/50 oranında seyreltilmiştir.

Çizelge 3.3 1 L 50X TAE Buffer için gerekli kimyasallar

Konsantrasyon	Miktar (1 L)
Trisma Base	242 g
Asetik Asit	57.1 mL
EDTA (0.5 M pH8)	100 mL

### ***TE Buffer***

Tris HCl (1 M pH:8) ile EDTA (0.5 M) Çizelge 3.4’de verilen miktarlarda karıştırılarak toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L’ye tamamlanmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4 TE Buffer için gerekli kimyasallar

Konsantrasyon	Miktar (1 L)
Tris HCl (1M pH 8)	10 mL
EDTA (0.5 M)	2 mL

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Örneklem Alanına Ait Toprağın Fiziko-Kimyasal Özelliklerinin Tanımlanması

Örneklem alanından temin edilen toprağın fiziko-kimyasal özellikleri hizmet alımı aracılığı ile tanımlanmıştır.

### 3.2.2 Pestisit Biyodegradasyon Potansiyeli Olan Bakteri İzolatlarının Zenginleştirilmesi

Toprak örneğindeki CP'yi degrade edebilen bakterilerin zenginleştirilmesi için 10 g toprak ve 50 mg/L CP, 50 mL MSM-M9 sıvı besiyeri içerisine ilave edildikten sonra 250 mL'lik erlenmeyerler 28°C'de 150 rpm'de bir hafta boyunca inkübe edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol grupları da çalışma grupları ile birlikte aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Negatif kontrol grupları [K(-)], çalışma grupları ile aynı konsantrasyonda CP içeren MSM-M9'dan, pozitif kontrol grupları [K(+)] ise çalışma grupları ile aynı miktarda toprak örneği içeren MSM-M9'dan oluşmaktadır. Tüm gruplar duplike olarak çalışılmıştır. Bir hafta sonunda alınan 5 mL inokulant, başlangıç miktarı kadar etken madde içeren 50 mL MSM-M9 içerisine aktarılıp, aynı inkübasyon koşullarında bir hafta daha inkübe edilmiştir. Böylelikle her pasajlama işlemi ile besiyeri ortamı tazelenmiş olup bakterilerin adaptasyonları tetiklenmiştir. Bu işlem tüm deney ve kontrol grupları için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Üçüncü haftada etken madde konsantrasyonu iki kat artırılarak (100 mg/L) yeni besiyerlerine transferlerin gerçekleştirilmesinin ardından koşullar değiştirilmeden inkübasyon devam ettirilmiştir. Dördüncü haftada ise yeni inokulant ile üçüncü hafta tekrarlanmıştır (Akbar vd., 2014).

Adaptasyon sürecinde pasajlama işlemi için bir haftalık inkübasyon süresi belirlenmiş olup bu çalışma grupları normal büyüme gösteren çalışma grubu (NBÇG) olarak adlandırılmıştır. Bu süreçte yavaş büyüyen bakterileri de kaçırmamak adına inkübasyon süresi her bir erlenmeyerde 2 haftaya kadar uzatılmıştır. Yavaş büyüyenlerin çalışması da ayrı gruplar olarak takip edilmiş ve yavaş büyüme çalışma grubu (YBÇG) olarak adlandırılmıştır.

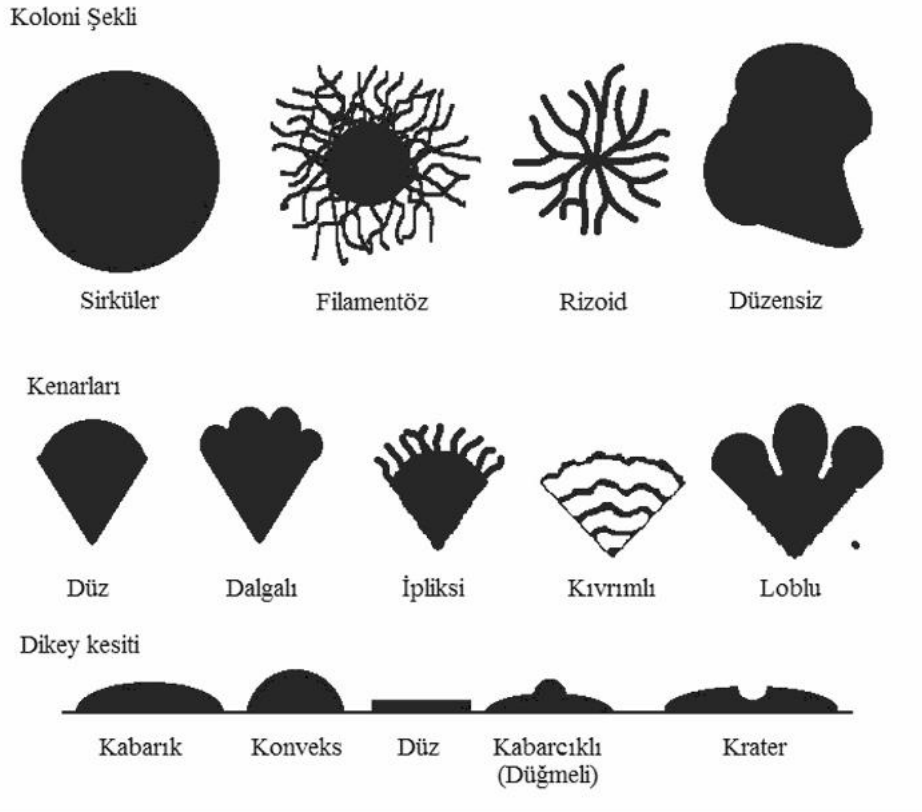
### 3.2.3 Bakteri İzolasyonu

Dördüncü haftanın sonunda kültürlerin PBS içerisinde 10 kat seyreltmeleri hazırlanmış ve her seyreltmeden 100 µL alınarak başlangıç konsantrasyonu kadar (50 mg/L CP) etken madde içeren MSM-M9 katı besiyerlerine ekim yapılmıştır. Katı besiyerleri 28°C'de inkübe edilip, koloni oluşumu 30 gün boyunca hergün takip edilmiştir. Bu çalışma her grup için duplike olarak gerçekleştirilmiştir. Kolonilerin ayrılmasında Şekil 3.2'deki morfolojik özellikler kullanılmıştır.

Morfolojik olarak farklılık gösteren koloniler ayırt edilerek saf kültür olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Bu aşama 50 mg/L CP etken madde içeren zengin besiyerine (NA) çizgi ekim tekniği uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Gerekli durumlarda bu inokülasyon birkaç kez tekrarlanmıştır. Halen saf olmayan koloniler için ise EMB ve 2500 IU/mL penisilin G benzatin içeren EMB besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Saf kültürleri elde edilen izolatlar daha uzun süre muhafaza edilebilmeleri için %15'lik gliserol çözeltisinde homojen hale getirilerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

#### 3.2.3.1 Mikroskopik İnceleme

Saf olarak elde edilen izolatlar minör modifikasyon içeren gram boyama yöntemi ile mikroskopik olarak incelenmiştir (Bartholomew ve Mittwer, 2023). Bunun için alınan tek bir koloni steril PBS içerisinde çözdürülerek lam üzerine yayılıp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ateşte fikse edilmiştir. Lam üzerine hazırlanan preparata ilk olarak gram (+) bakterilerin tespiti amacıyla kristal viyole boyası eklenip 2.5 dk bekleme süresi sonunda yıkanmasının ardından lügol ile 1 dk boyunca kaplanması sağlanmıştır. Lügol çözeltisinin de yıkanması sonrasında preparat üzerine %95'lik etanol ile 10 saniye boyunca tekrar yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak gram (-) bakterilerin tespiti için safranin ile kaplanan preparat 30 saniyelik bekleme süresi sonunda yıkanıp kurutularak mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 3.2 İzolatların ayırd edilmesinde kullanılan farklı koloni morfolojileri (Acharya, 2013)

### 3.2.4 İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanmaları

#### 3.2.4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Saf kültürleri elde edilen bakteri suşlarının moleküler olarak tanımlanabilmeleri için genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Bunun için modifiye CTAB yöntemi kullanılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). Bu yöntem diğer organizmaların yanı sıra bakteriyel genomik DNA izolasyonu için de kullanılmaktadır (Petersen ve Scheie, 2000; Moreira vd., 2010; William vd., 2012).

CTAB protokolü kapsamında DNA izolasyonu yapılacak bakteri izolatu katı besiyeri üzerinden tek koloni olmasına dikkat edilerek steril kürdan yardımı ile alınmıştır. Alınan koloninin 1 mL CTAB çözeltisi içeren epondorf tüpte yine kürdan yardımı ile dağılması sağlanmıştır. Kısa süreli vorteks yapılarak da bu süreç hızlandırılmıştır. Ardından 50 µL β-merkaptetanol eklenip tüplerin yavaş bir şekilde birkaç kez alt üst

edilerek karıştırılmasından sonra 4°C’de 10 dk boyunca santrifüj (17.000 g) edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (üst faz), etiketlenen yeni ependorf tüpe dikkatli bir şekilde aktarılmıştır. Transfer edilen süpernatant üzerine -20°C’de muhafaza edilen 600 U/mL proteinaz K (20 mg/mL) enziminden 20 µL ilave edilmiştir. Tüp 40 dk boyunca 60°C su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpe -20°C’de muhafaza edilmiş RNaz A (10 mg/mL) enziminden 4 µL eklenerek 45 dk boyunca 60°C’lik su banyosunda ikinci kez inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplere 24:1 oranında kloroform-izoamil alkol karışımından 600 µL aktarılmıştır. Ardından 4°C’de 8 dk boyunca santrifüj (17.000 g) edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki süpernatant etiketlenen yeni ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine süpernatant miktarının %8’i kadar amonyum asetat (7.5 M) eklenmiştir. Tüpe son olarak -20°C’de muhafaza edilen izopropanol’dan 800 µL ilave edilmiştir. Tüp -20°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüp ivedilikle 4°C’de 3 dk boyunca santrifüj (17.000 g) edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. Ardından tüpe 800 µL %70’lik etanol eklenip 3 dk boyunca 4°C’de 17.000 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasının ardından tüp 30 dk oda sıcaklığında kapakları açık şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi sonrası tüpe 50 µL TE tampon çözelti (pH:8) eklenmiş ve spektrofotometrik ölçümü yapılarak 4°C’de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.4.2 16S rDNA Bölgesinin Çoğaltılması**

Elde edilen genomik DNA’dan 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması için ileri primer olarak 27f, geri primer olarak da 1492r evrensel primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.5) (Peace vd., 1994; Ozaktas vd., 2012; Akbar vd., 2014; Santillan vd., 2020). Her bir PZR tüpü için toplam hacim 50 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). Reaksiyon esnasında izolatlar ile birlikte pozitif ve negatif kontroller de kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak daha önce sekansı elde edilmiş bir çevresel izolat kullanılmıştır. Negatif kontrol ise DNA içermeyen PZR karışımı olarak hazırlanmıştır. Çizelge 3.7’de belirtilen koşullar doğrultusunda PZR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5 PZR için kullanılan primerlerin baz dizilimleri ve erime sıcaklıkları (TM)

Primer	Sekans (5'-3')	TM (°C)
İleri primer (27f)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	57.3
Geri primer (1492r)	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	56.5

Çizelge 3.6 PZR karışımı için kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Miktar (µl)
KCl tampon çözelti	5
dNTP	2
İleri Primer (27f)	2
Geri Primer (1492r)	2
MgCl <sub>2</sub>	5
Taq DNA Polimeraz	0.2
DNA	2
Apirojen su	31.8

Çizelge 3.7 PZR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
İlk denetürasyon	94	3 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	} 30
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	5 dk	1

### 3.2.4.3 DNA Fragmentlerinin Doğrulanması

PZR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesinin boyutu (yaklaşık 1500 bp) jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Bunun için tüm PZR örnekleri Çizelge 3.8’de belirttiği şekilde hazırlanarak yüklenmesinin ardından, elektroforez tankına yerleştirilen jel 80 voltta 30 dk boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler UV altında incelenmiştir.

Çizelge 3.8 Elektroforez için DNA örneklerinin hazırlanması

Kimyasal	Miktar (µl)
DNA merdiveni	2
DNA yükleme Boyası	1
İzolat DNA örneği	5

### 3.2.4.4 DNA Dizi Analizi

PZR ürünleri ve primerler Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH şirket protokolüne uygun olarak iletilip ABI 3730XL DNA Analyser dizileme cihazında Sanger sekanslama yöntemi ile dizilerek nükleotid dizi verileri hizmet alımı aracılığı ile elde edilmiştir.

İleri ve geri primerler aracılığı ile elde edilen kromatogramlar, FinchTV (Versiyon 1.4.0) programı ile görünür hale getirilmiştir. Her iki primerden elde edilen diziler Clustal Omega 1.2.4 (EMBL-EBI, 2023) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için en güvenilir olan DNA dizisi alınmıştır. İzolatlara ait DNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında BLAST uygulaması aracılığı ile eşleştirilerek her birinin taksonomik olarak tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca elde edilen DNA dizilerinin daha sonraki çalışmalarda da kullanılabilmesi için NCBI veri sistemine yüklenmiş ve erişim numaraları alınmıştır (NCBI, 2023).

## 4. BULGULAR

### 4.1 Toprağın Fiziko-Kimyasal Özelliklerinin Tanımlanması

Örneklem alanından alınan toğrağın fiziko-kimyasal analizi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Örneklem toprağının fiziko-kimyasal özellikleri

Bünye Sınıfı	Killi Tınlı
Suyla Doyunluk (%)	62
Suyla Doymuş Toprakta pH	0.03
Toplam Tuz (%)	0.03
Organik Karbon (%)	1.41
Organik Madde (%)	2.43
Kireç (%)	2.44
EC (dS/m)	0.650
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/da)	70.42
Mg (mg/kg)	821
Ca (mg/kg)	9582
Na (mg/kg)	48.8
Zn (mg/kg)	4.27
Cu (mg/kg)	3.94
Fe (mg/kg)	3.01
Mn (mg/kg)	2.27
B (mg/kg)	0.43
K <sub>2</sub> O (kg/da)	236.93

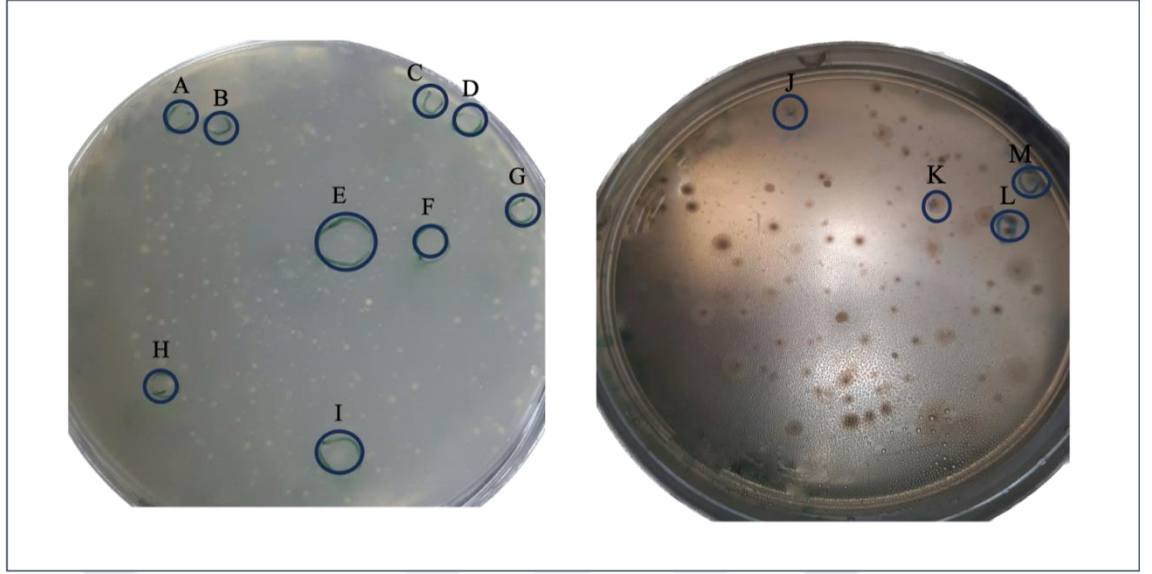
## 4.2 Pestisit Biyodegradasyon Potansiyeli Olan Bakterilerin Zenginleştirilmesi

Toprak örneğindeki CP etken maddesini degrade edebilme yeteneğindeki bakterilerin zenginleştirilmesi amacıyla CP dışında enerji kaynağı içermeyen MSM-M9 besiyeri kullanılmıştır. Çalışma grupları ile eş zamanlı ve duplike olarak çalışılan K (-) ve K (+) grupları ile de elde edilen bakterilerin sadece CP degrade edebilenler olduğu netleştirilmiştir.

Adaptasyon sürecinde normal inkübasyon süresi olarak bir hafta belirlenirken (NBÇG), yavaş büyüyen bakterileri de kaçırmamak adına inkübasyon süresi her bir grupta iki haftaya kadar uzatılmış ve bu grupların çalışması ayrı çalışma grubu olarak takip edilmiştir (YBÇG). Sonuç olarak NBÇG'nin zenginleştirme aşaması dört hafta sonunda, YBÇG'ninki ise sekiz hafta sonunda tamamlanmıştır.

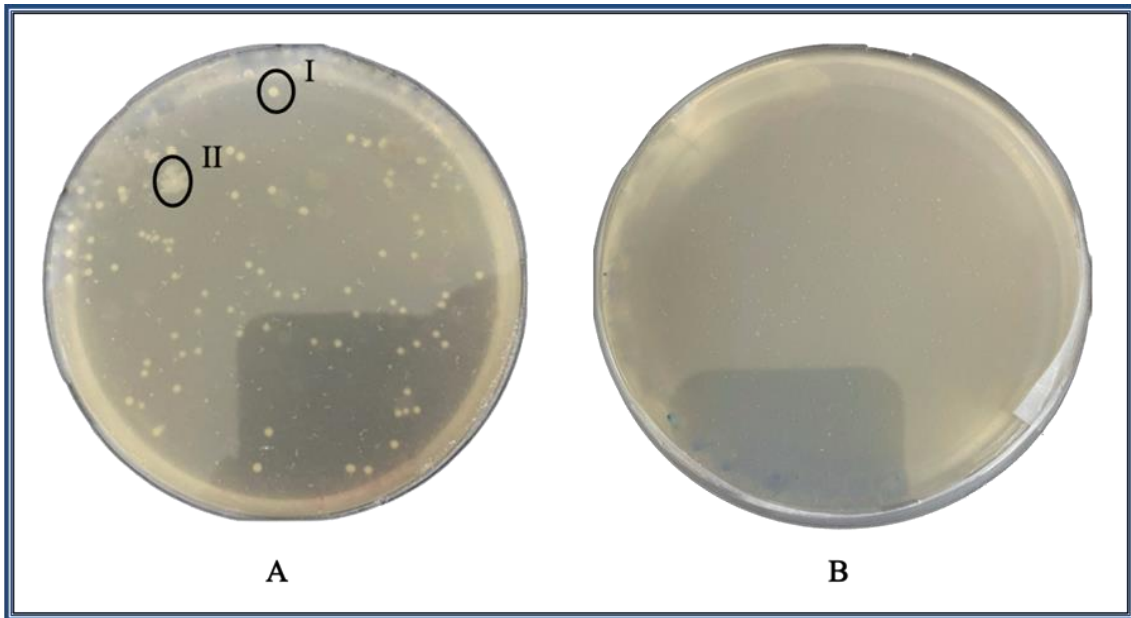
## 4.3 Pestisit Degredasyon Kabiliyeti Olan İzolatların Morfolojik Olarak Ayrılması

Dört ve sekiz haftalık zenginleştirme süreci sonrası çalışma ve kontrol grupları başlangıç konsantrasyonu kadar CP içeren (50 mg/L) MSM-M9 katı besiyerine seri seyreltme ile ( $10^{-9}$ ) aktarılmıştır. Koloni gelişimi 30 gün boyunca takip edilmiş ve farklı morfolojik özelliğe sahip koloniler Şekil 3.2'de belirtildiği gibi tanımlanmıştır. Çalışma sahası Adıyaman sınırları içerisinde olduğu için izolatlar "Adıyaman Bakterisi" (AB1, AB2, vb.) olarak numaralandırılmıştır (Şekil 4.1). Bu aşamada toplamda 23 izolat morfolojik olarak ayırt edilebilmiştir. Bunlardan ilk 16 izolat (AB1-16) NBÇG'den, geri kalanlar ise (AB17-23) YBÇG'den elde edilmiştir. NBÇG'de kolonilerin oluşumları yaklaşık 24 gün sürerken, YBÇG grubundaki kolonilerin oluşumları 16 günde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.1 İzolatların katı besiyerinde belirlenmeleri. A) AB24 izolatı, B) AB23 izolatı, C) AB20 izolatı, D) AB21 izolatı, E) AB22 izolatı, F) AB18 izolatı, G) AB19 izolatı, K) AB2 izolatı, L) AB1 izolatı, M) AB3 izolatı, J) AB4 izolatı

Katı besiyeri aşamasında K (+) grubunda koloni gelişimi gözlenmezken, K (-) grubunda iki tip koloni tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

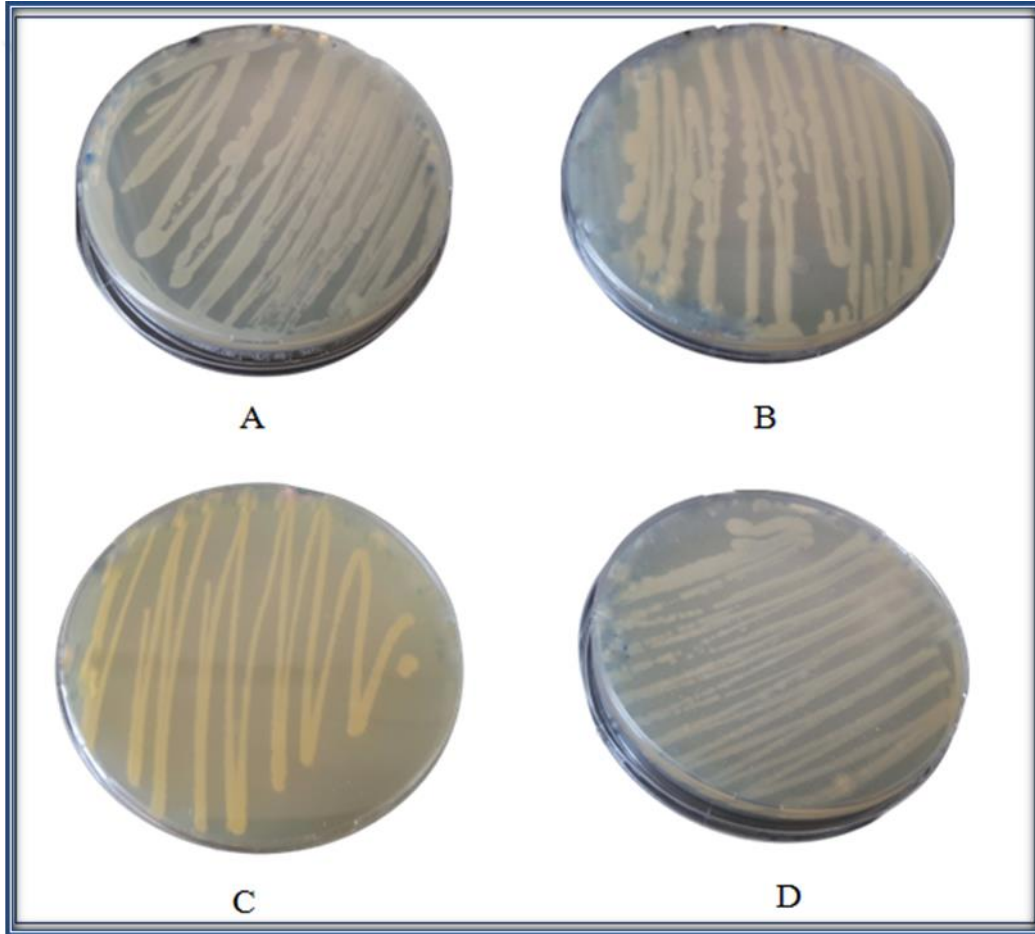


Şekil 4.2 Kontrol gruplarının katı besiyerlerinin inkübasyon sonu görüntüleri. A) K (-) grubu I, Birinci izolat; II, İkinci izolat B) K (+) grubu

### 4.3.1 Bakteri İzolatlarının Saf Olarak Elde Edilmesi

Morfolojik olarak ayırt edilen koloniler, saf kültür olarak elde edilmeleri için 50 mg/L CP içeren NA besiyerinde inkübe edilmişlerdir. Ayrıca bazı izolatlar için antibiyotik içeren (2500 IU/mL penicilin G benzatin) EMB besiyeri de kullanılmıştır. Sonuç olarak 13 izolat saf olarak elde edilebilmiştir (Şekil 4.3).

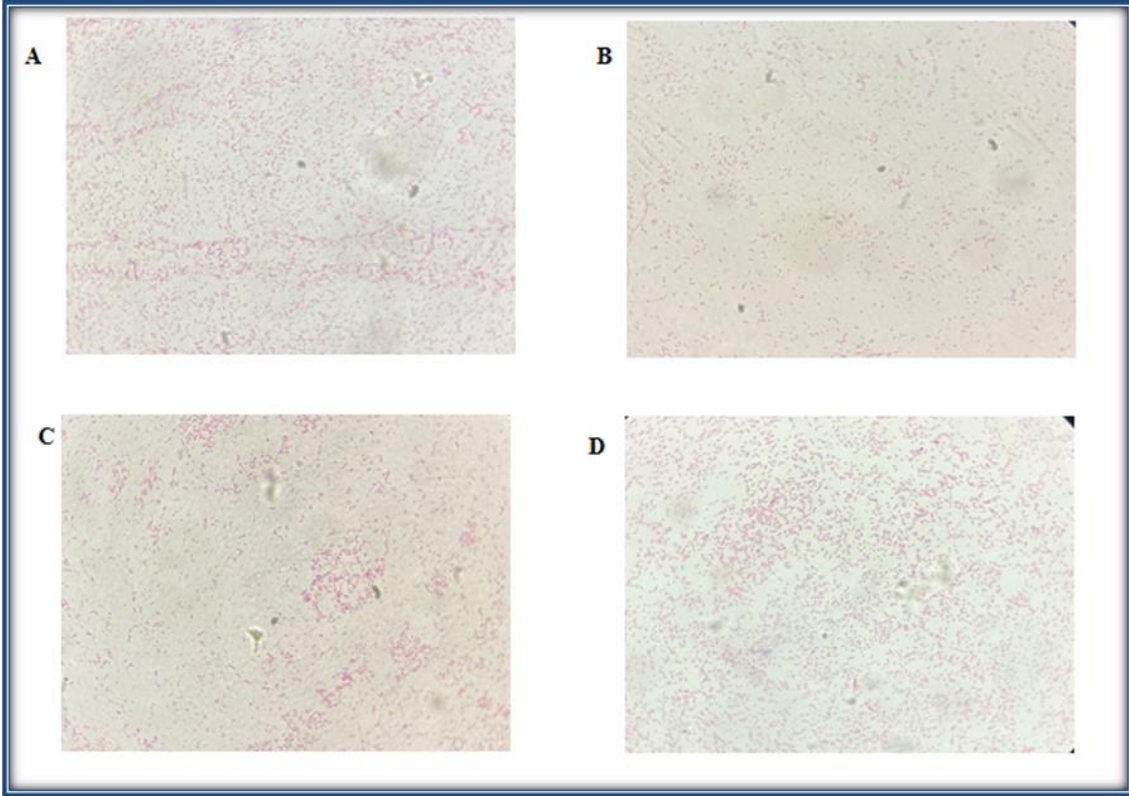
İzolatların farklı katı besiyerlerindeki koloni oluşum süreçleri de değişiklik göstermiştir. Saf olarak elde edilen izolatların koloni oluşturma süreleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.3 Saf kültür olarak elde edilen izolatlardan bazıları. A) AB3, B) AB6, C) AB24, D) AB18

### 4.3.2 Bakteri İzolatlarının Hücre Duvar Yapılarına Göre Ayırımı

Tespit edilen izolatların hücre duvar yapılarına göre sınıflandırılmaları ve mikroskopik analizleri için gram boyamaları yapılmıştır. Elde edilen 1000 X mikroskop görüntülerinden bazıları Şekil 4.4’de verilmiştir. Ayrıca izolatların gram (+/-) durumları Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.



Şekil 4.4 İzolatların gram boyama sonrası elde edilen 1000 X mikroskop görüntüleri. A) AB18 gram (-), B) AB21 gram (-), D) AB6 gram (-)

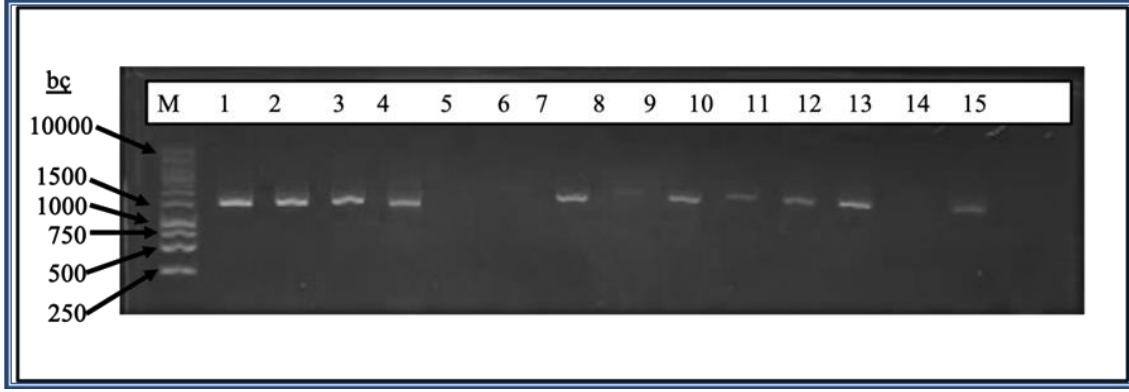
Çizelge 4.2 Saf kültür olarak elde edilen izolatların farklı besiyerlerindeki kolonileşme süreleri ve gram tipleri

İzolat Adı	MSM-M9+CP (gün)	NA+CP (gün)	EMB+Antibiyotik (gün)	Gram(+/-)
AB3	24	5	-	-
AB4	24	-	3	-
AB6	24	-	3	-
AB7	24	-	3	-
AB9	24	-	3	-
AB10	24	-	3	-
AB12	24	-	3	-
AB13	24	-	5	+
AB14	24	5	-	-
AB15	24	5	-	-
AB16	24	-	3	-
AB18	16	5	-	-
AB20	16	5	-	-
AB21	16	5	-	-
AB23	24	-	3	-

#### 4.4 Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanımlanmaları

##### 4.4.1 16S rDNA Bölgesinin PZR Amplifikasyonu

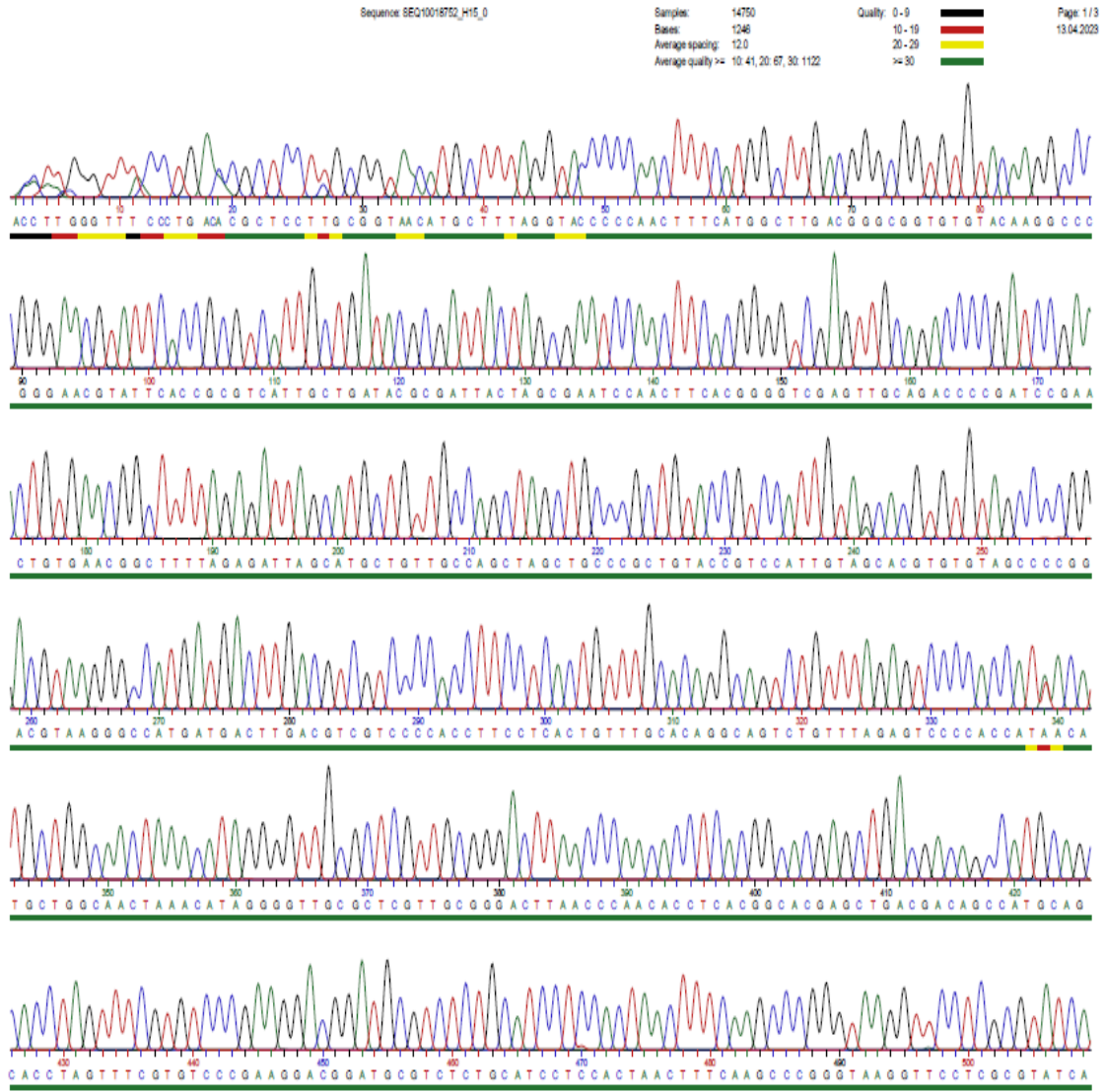
İzolasyonu yapılan genomik DNA örneklerinden 27f ve 1492r primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan fragmentlerin doğruluğu jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Yaklaşık 1500 bp'ne karşılık gelen fragmentler doğru olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 16S rDNA bölgesine ait PZR sonuçlarının elektroforez görüntüsü. M) Marker (10000-250 bç), 1) AB1 izolatu, 2) AB2 izolatu, 3) AB3 izolatu, 4) AB4 izolatu, 5) AB10 izolatu, 6) AB14 izolatu, 7) AB17 izolatu, 8) AB13 izolatu, 9) AB15 izolatu, 10) AB18 izolatu, 11) AB21 izolatu, 12) AB7 izolatu, 13) AB21 izolatu 14) Negatif Kontrol, 15) Pozitif Kontrol

#### 4.4.2 Moleküler Analiz

Her bir bakteri izolatından elde edilen yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki DNA örneklerinin dizi analizi Sanger sekanslama yöntemi ile elde edilmiştir. Her iki primerden elde edilen diziler Clustal Omega 1.2.4 (EMBL-EBI, 2023) aracılığı ile karşılaştırılmış ve en doğru dizi belirlenmiştir. Geri primeri (1492r) aracılığı ile elde edilen bölgenin bir kısmına ait kromatogram görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir. Her bir izolata ait dizi NCBI sistemine yüklenerek erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.6 AB4 izolatına ait 16S rDNA bölgesinden geri primer ile elde edilmiş sekans kromatogramının bir parçası

Çizelge 4.3 Bakteri izolatlarının adlandırılmaları, benzerlikler oranları ve NCBI erişim numaraları

İzolat	Bakteri Adı	Benzerlik Oranı (%)	Erişim Numarası
AB 3	<i>Klebsiella aerogenes</i>	99.93	OR412612.1
AB 4	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	99.43	OR412613.1
AB13	<i>Peribacillus sp.</i>	99.85	OR584307.1
AB14	<i>Pseudomonas sp.</i>	99.86	OR412614.1
AB15	<i>Sphingobacterium thalpophilum</i>	98.70	OR412615.1
AB18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.57	OR412616.1
AB20	<i>Pseudomonas putida</i>	99.19	OR412617.1
AB21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.93	OR412618.1
AB23	<i>Pseudomonas sp.</i>	98.37	OR584308.1



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pestisitler, haşere kontrol stratejilerinin bir parçası olarak tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak ksenobiyotik özellikleri nedeniyle faydalı toprak mikroorganizmalarının çoğalmasını ve toprakta bunların metabolitlerine dönüşümünü olumsuz etkileyebilmektedirler. Pestisit uygulaması zararlıları kontrol altına alarak mahsul verimini artırır ancak aşırı kullanımları çeşitli hedef ve hedef dışı yaşam formları üzerinde zararlı etkilere neden olur. Pestisitlerin bir sınıfı olan OP bileşikler küresel boyutta yaygın olarak uygulanmaktadır. OP pestisitler grubuna dahil olan ve birçok canlının yanı sıra insanda da zararlı etkileri olan CP özellikle sürekli kullanımı sonucu tarım arazilerinde birikebilir, bu da uygulama alanı ile birlikte bu alanların yakınındaki yer altı ve yüzey sularının da kirlenmesine neden olabilir. Bu bağlamda tez kapsamında OP pestisitler ile kontamine olan başta tarım arazileri olmak üzere diğer ekolojik alanların da temizlenmesi amacıyla CP pestisitine karşı biyodegradasyon yeteneğine sahip potansiyel bakteri suşlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Toprak, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için organik ve mineral bileşenlerin bir karışımından oluşan doğal bir ortamdır. Zararlı kimyasalların ortamdan uzaklaştırılması anlamında toprak türü biyodegradasyon verimliliğini belirleyen önemli bir faktördür. Bununla birlikte mikrobiyal içerik, organik madde içeriği, kil, nem içeriği, iletkenlik, pH gibi toprak özelliklerindeki değişimler ve diğer çevresel koşullar da pestisit bozunma oranını etkiler (Gupta ve Gajbhiye, 2002). Bu bağlamda örneklem alanı olarak yaklaşık 40 yıllık aktif pestisit uygulanan ve kullanılan pestisitlerden biri olan CP tüketimi ise 10 yıla tekabül eden bir tarım arazisi seçilmiştir. Böylece tarım arazisindeki mikrobiyal konsorsiyum içerisinden hali hazırda pestisit/CP kullanımına adapte olmuş mikroorganizmalar arasından CP degradasyonu kabiliyeti olanlara ulaşma ihtimali artırılmıştır. Aynı şekilde tarım arazisindeki mikrobiyal çeşitliliğin tamamına ulaşabilmek adına arazinin beş farklı konumundan elde edilen toprak numuneleri karıştırılarak çalışma örneği elde edilmiştir. İlk 20 cm'lik yüzey toprağının kullanılmasının nedeni ise pestisit degradasyon kabiliyeti olan mikroorganizmaların çoğunlukla aerobik özellikte olduğunun bilinmesidir (Gangola vd., 2022).

Deneysel çalışmaların ilk basamağı olan adaptasyon aşamasında mikroorganizmaları hedef pestisiti tüketmeye zorlamak amacıyla içerisinde enerji

kaynağı olarak sadece CP bulunan minimal besiyeri (MSM-M9) inkübasyon ortamı olarak kullanılmıştır (Jha vd., 2022; Lourthuraj vd., 2022; Saengsanga ve Phakratok, 2023). Aynı zamanda toprak örneğinden gelen mikroorganizmaların kullanabileceği maddelerin tükenmesini hızlandırmak ve oluşan atık ürünleri uzaklaştırmak için adaptasyon süreci içerisinde belirli sürelerde pasajlama gerçekleştirilerek besiyerleri tazelenmiştir. Zenginleştirme süreci bakterilerin CP'yi enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerinin gelişmesine zorlamış ve bu kabiliyette olan bakterilerin ortama adapte olarak çoğalmaları sağlanmıştır. Literatürde de bakterilerin CP kullanma adaptasyonları için benzer zenginleştirme aşamalarının mevcut olduğu bilinmektedir (Rani vd., 2008; Akbar vd., 2014; Asamba vd., 2022). Bu çalışmalarda da benzer şekilde besiyeri ortamı olarak MSM-M9 kullanılmıştır. Çalışmalarda alınan numunenin kaynağına ve çalışma tasarımına bağlı olarak farklı CP konsantrasyonları, inkübasyon süresi ve pH gibi değişik parametlerde de biyodegradasyon özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde adaptasyon koşulları belirlenirken sıcaklık, pH ve CP konsantrasyonu gibi parametlerin optimum biyodegradasyon için gerekli olan seviyelerde olması göz önünde bulundurulmuştur. Bu süreçte tüm çalışma ve kontrol grupları duplike çalışılarak deneysel hata payı en aza indirgenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan K (+) grubunda sadece toprak içeren besiyeri ortamı ile mikroorganizmaların CP'siz ortamdaki büyüme durumları takip edilirken; K (-) grubu ile sadece CP varlığında besiyeri ortamındaki mikrobiyal büyüme durumları takip edilmiştir.

Katı besiyerine geçiş sonrası izolatların morfolojik olarak ayırt edilmeleri sağlanmıştır. Bu aşamada NBÇG ve YBÇG arasındaki en belirgin fark kolonileşme süreleri olarak belirlenmiştir. NBÇG'deki izolatların katı besiyerinde koloni oluşturma süreleri NBÇG'deki izolatlara göre daha uzun sürmüştür (Çizelge 4.2). Bunun nedeni muhtemelen YBÇG grubunun sıvı besiyerindeki daha uzun süren adaptasyon sürecinin beklenildiği gibi bakterilerin katı besiyerindeki gelişimlerini hızlandırmış olmasıdır. Kontrol gruplarının da çalışma grupları ile katı besiyerlerindeki inkübasyonları aynı koşullarda gerçekleşmiştir. Bu aşamada K (+) grubunda beklenildiği şekilde üreme gözlenmemiştir. Bu da çalışma gruplarından izole edilen kolonilerin CP varlığında büyüeyebilen ve hatta CP'yi enerji kaynağı olarak kullanabilenler olduğunu göstermektedir. Sadece K (-) grubunda CP kaynağı olarak kullanılan ticari pestisitten geldiği düşünülen morfolojik olarak farklı iki koloni tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Kültür aşamalarının sonunda morfolojik olarak ayırt edilen 23 izolattan 16'sı (AB1- AB16) NBÇG'den, 7'si ise (AB17-AB23) YBÇG'den ayırt edilmiştir. Mikroskopik inceleme ile saf olmadıkları tespit edilen izolatların saf kültür olarak ayırtılmaları amacıyla penisilin G benzatin antibiyotiğini içeren EMB agar besiyeri kullanılmıştır. EMB besiyeri genel olarak gram (-) bakteriler için seçici bir besiyeri olarak bilinse de Enterokoklar, Staphylokoklar gibi bazı gram (+) bakteriler ile maya gibi patojenik olmayan ve laktozu fermente edemeyen organizmaların da bu besiyerinde gelişebildiği bilinmektedir (Facklam, 1973). Bu nedenle besiyerine hücre duvarı biyosentezindeki son adımı katalize eden transpeptidazı spesifik olarak inhibe ederek gram (+) bakterileri baskılayan penisilin G benzatin eklenmiştir (Erdoğan ve Korukluoğlu, 2018).

Çalışma sonunda yedi izolat moleküler olarak karakterize edilmiştir. Moleküler karakterizasyon aşamasında bakteri filogenisinde ayırdedici bir bölge olan 16S rDNA bölgesi kullanılmıştır. 16S rDNA bölgesi Şekil 5.1'de görüldüğü gibi yüksek oranda korunmuş dizilerle ayrılan V1 ile V9 değişken bölgelerini içerir (Matsuo vd., 2021). Korunmuş bölgeler tüm bakteriler için ortak iken değişken bölgeler, cins veya tür seviyesinde hatta alt türler düzeyinde farklılıklar gösterebilmektedir (Suau vd., 1999; Satokari vd., 2003). Elde edilen analiz sonuçlarına göre AB3 izolatu *K. aerogenes*, AB4 ve AB15 izolatları *S. thalophilum*, AB18 ve AB21 izolatları *P. aeruginosa*, AB20 izolatu *P. putida* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). AB13, AB14 ve AB23 izolatları birden fazla tür ile yüksek oranda benzerlik göstermeleri nedeni ile tür seviyesinde tanımlanmaları yapılamamıştır. AB13 *Peribacillus* cinsine, AB14 ve AB23 izolatlarının ise *Pseudomonas* cinsine ait oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 5.1 16S rDNA bölgesine ait V1-V9 değişken ve korunmuş bölgeler (Fasesan vd. 2020)

AB3 izolatu *K. aerogenes* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). Daha önce *Enterobacter aerogenes* olarak bilinen *K. aerogenes*, gram (-) ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Chart, 2012). *K. aerogenes* izolatuının literatürde yapılan bazı çalışmalarda 100-300 mg/L CP konsantrasyonlarında büyüebildiği ve CP biyodegradasyon yeteneği olduğu görülmüştür (Awad vd., 2011; Yang vd., 2006; Li vd., 2007). Bu sonuç yaptığımız adaptasyon aşamasında kullanılan CP miktarı ile uyum göstermektedir. Ayrıca bu bakterinin organofosfat triesterlere karşı güçlü aktivite gösteren bir grup hidrolitik enzim olan organofosfat hidrolaz aktivitesine sahip olduğu da gösterilmiştir (Lourthuraj vd., 2022). Dolayısıyla *K. aerogenes* bakterisinin pestisit degrade edebilme özelliği literatürde yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir.

AB4 ve AB15 izolatları moleküler karakterizasyon sonucunda *S. thalpophilum* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). *Sphingobacterium* cinsi, daha önce *Flavobacterium* türleri olarak sınıflandırılan organizmaları içermektedir. Bu cinse aktarılan organizmalar ise hücre zarlarında büyük miktarlarda sfingofosfolipid bileşikleri içermekte ve onları flavobakterilerden ayıran başka taksonomik özellikler ile de ayrılmaktadırlar (Steinberg ve Burd, 2015). *Sphingobacterium* cinsi gram (-) çubuklardır (Liu vd., 2008). Bu cinse ait türler farklı habitatlarda bulunmakta (Ahmed vd., 2014) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), boyalar, böcek ilaçları ve plastikler gibi birçok çevresel kirleticiyi degrade edebilme yetenekleriyle bilinmektedirler (Haiyan vd., 2007). *S. thalpophilum* türünün CP biyodegradasyon kabiliyeti olduğu yapılan çalışmada olduğu gibi önceki çalışmalarda da tespit edilmiştir (Fulekar, 2014).

AB18 ve AB21 izolatları *P. aeruginosa*, AB20 izolatu *P. putida* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca AB14 ve AB23 izolatlarının da *Pseudomonas* cinsine ait oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.3). AB14 izolatu *P. palmensis* ile %99.86, *P. gingdaonensis* ile %99.86 ve *P. brassicae* ile %99.65 oranında benzerlik gösterdiği; AB23 izolatu ise *P. juntendi*, *P. laurentiana* ve *P. faucium* türleri ile %98.37 oranında benzerlik gösterdiği için tür seviyesinde tanımlanamamış ve *Pseudomonas* sp. olarak verilmiştir. Bu cinse ait

türler toprakta bol miktarda bulunan gram (-) çubuk şeklinde bakterilerdir. Saprotrofik olan bu bakteriler organik maddenin mineralizasyonunda hayati bir role sahiptir. Bu bakterilerin çeşitli aromatik hidrokarbonları, yağ, petrol ürünleri ve pestisitleri degrade edebilme özelliğine sahip oldukları bilinmektedir (Mosqueda vd., 1999; Xu vd., 2008; Sarkar vd., 2009). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin pestisit degradasyonunda yer alan bir dizi katabolik yolak ve enzime sahip olduğu ve CP'yi de farklı oranlarda parçalama yeteneğinin olduğu bildirilmiştir (Gilani vd., 2015). Bunlar arasında *P. putida* ve *P. aeruginosa* türleri CP degrade edebilen etkili izolatlar olarak literatürde yer almaktadır (Vijayalakshmi ve Usha, 2012). Ekstrem ekolojik koşullarda büyüme yeteneğine sahip olan *P. aeruginosa*, metabolik çok yönlülüğü sayesinde bazı dezenfektanları ve birçok antibiyotiği dahi metabolize ederek karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Kung vd., 2010). Yaşam süresi diğer *Pseudomonas* türlerine göre daha uzun olması ve CP degradasyonunun yanı sıra TCP degradasyon yeteneğine de sahip olması sebebiyle *P. aeruginosa*'nın diğer *Pseudomonas* türlerine göre CP degradasyonunda daha verimli olduğu kabul edilmiştir (Lakshmi vd., 2008). *P. putida* ise fosfotriester bağına hidrolize eden fosfotriesteraz enzimine sahip olması sebebiyle CP'yi fosfor kaynağı olarak degrade edebilmektedir (Istamboulie vd., 2010). *P. putida*'nın da diğer *Pseudomonas* türleri ile karşılaştırıldığında biyodegradasyon kapasitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Carpenter vd., 2008). Yapılan CP biyodegradasyon zenginleştirilmesi çalışmasında literatürde de daha önce bu amaçla tanımlanmış 5 izolat tespit edilmiştir.

CP biyodegradasyonuna sahip izolatlar içinde tanımlanan AB13 izolatının *Peribacillus* cinsine ait olduğu gösterilmiştir (Çizelge 4.3). İzolat *P. frigoritolerans* ile %99.79, *P. simplex* ile %99.51 oranında benzerlik gösterdiği için *Peribacillus* sp. olarak tanımlanmıştır. *Peribacillus*, Bacillales takımının Bacillaceae familyasına ait, gram pozitif veya gram değişken boyama sergileyen, çubuk şeklinde bir bakteri cinsidir. *Peribacillus* üyeleri aerobik ya da fakültatif anaerobiktir ve olumsuz çevresel veya beslenme koşulları altında endospor oluşumu gösterirler (Patel ve Gupta, 2020). *Peribacillus* sp.'nin organoklorlu bileşiklerden endosülfana karşı biyodegradasyon yeteneğine sahip olduğu Casanova vd.'nin (2021) çalışmasında bildirilmiştir. Ancak CP degradasyon kabiliyetine yönelik bir bilgiye erişilememiştir.

Artan insan nüfusu ve ekilebilir tarım arazileri göz önünde bulundurulduğunda pestisit kullanımından yakın zamanda vazgeçilmeyeceği bir aşikârdır. Bu nedenle

kullanılan pestisitlerin doğaya zarar vermeyecek bir forma dönüşmesinin sağlanması kaçınılmaz bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda tez kapsamında halen dünya genelinde yoğun olarak kullanılan ve toksisite değeri yüksek CP pestisitinin degradasyonunu gerçekleştirebilen bakterilerin tespit edilmesi hedeflenmiştir. CP kullanımı gelişmiş ülkelerin çoğunda ve ülkemizde yakın geçmişte yasaklanmasına karşın, dünya genelinde yoğun olarak kullanılmaya devam etmektedir. Aynı zamanda CP degradasyonuna sahip mikroorganizmaların çapraz adaptasyon kabiliyetleri ile CP ile aynı grupta bulunan ve CP'nin yasaklanması ile kullanımları artan diğer OP bileşiklerin degradasyonunda da kullanılabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Mitchell ve Cain, 1996; Warton vd., 2003; Singh vd., 2005). Çalışma kapsamında elde edilen ve moleküler olarak tanımlanan izolatların CP'yi parçalayabilme kabiliyetleri literatür ile uyumluluk göstermektedir. Bu tarz çalışmalar dünya genelinde yoğun olarak devam etmesine rağmen Türkiye topraklarından yeni organizmaların keşfine yönelik çalışmalar ne yazık ki yok denecek kadar azdır. Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki pestisit çalışmalarına örnek olarak Yücel vd. (1999) ve Kumral vd. (2020) verilebilir. Ancak yapılan bu çalışmalar incelendiğinde literatürde biyodegradasyon yeteneği bilinen mevcut mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalar olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda yapılan tez çalışması, pestisitleri degrade edebilen bakterilerin izole edilmesi yönünde Türkiye topraklarında yapılmış ilk çalışma olarak literatürdeki yerini alacaktır. Tanımlanan *Peripacillus* cinsine ait izolatın pestisit degradasyon kabiliyetine ait bilgiler sınırlı olup, bu tür üzerine yapılacak daha detaylı çalışmalar ile belki de Türkiye topraklarından tanımlanmış yeni bir izolat bu anlamda literatürdeki yerini alabilecektir. Ayrıca yapılacak daha ileri çalışmalar ile tespit edilen izolatların tamamının biyodegradasyon kapasitelerinin benzerlerinden farklı olup olmadığı belirlenebilecektir. Tez kapsamında tanımlanan bakteriler ile doğrudan bir remediasyon kiti oluşturulması hedeflenebileceği gibi ileri moleküler projelerle bu parçalanmayı gerçekleştiren enzimler belirlenebilir ve nanoteknoloji ile desteklenerek remediasyon ürünlerine dönüştürülebilir. Ayrıca ya doğrudan bakteri izolatları ya da barındırdıkları enzimler, pestisit kontaminasyonu olan alanları belirlemek için biyosensör olarak kullanılabilirler. Bunların yanısıra medikal anlamda pestisit toksisitesinin tedavisi için yine bu enzimlerden panzehir olarak faydalanılabilir. Bu bağlamda başta tarım arazileri olmak üzere doğrudan halk sağlığına

yönelik ürünlerin oluşturulmasına yönelik projeler daha sonraki hedefler arasında yer almaktadır.





## KAYNAKLAR

- Acharya, T. (2013). Colony morphology of bacteria; how to describe bacterial colonies. Erişim tarihi: 1 Mart 2023. Erişim adresi: <https://web.archive.org/web/20141108044958/https://microbeonline.com/colony-morphology-bacteria-describe-bacterial-colonies/>
- Ahmed, I., Ehsan, M., Sin, Y., Paek, J., Khalid, N., Hayat, R., Chang, Y. H. (2014). *Sphingobacterium pakistanensis* sp. nov., a novel plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere of *Vigna mungo*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 325-333.
- Akbar, S., Sultan, S., Kertesz, M. (2014). Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2755-2766.
- Alvarenga N., Birolli, W. G., Vacondio, B., Selegim, M. H., Porto, A. L. (2018). Enantioselective biodegradation of the pyrethroid ( $\pm$ )-lambda-cyhalothrin by marine-derived fungi. *Chemosphere*, 197, 651-660.
- Asamba, M. N., Mugendi, E. N., Oshule, P. S., Essuman, S., Chimbevo, L. M., Atego, N. A. (2022). Molecular characterization of chlorpyrifos degrading bacteria isolated from contaminated dairy farm soils in Nakuru County, Kenya. *Heliyon*, 8(3).
- Ajaz, M., Jabeen, N., Akhtar, S., Rasool, S. A. (2005). Chlorpyrifos resistant bacteria from Pakistani soils: isolation, identification, resistance profile and growth kinetics. *Pakistan Journal of Botany*, 37(2), 381.
- Awad, N. S., Sabit, H. H., Abo-Aba, S. E., Bayoumi, R. A. (2011). Isolation, characterization and fingerprinting of some chlorpyrifos-degrading bacterial strains isolated from Egyptian pesticides-polluted soils. *Afr J Microbiol Res*, 5(18), 2855-2862.
- Balakrishnan, S. L., Rao, P. (2019). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial strains isolated from agricultural soils of Visakhapatnam district. *J Bioremediat Biodegrad*, 10(459), 2.
- Bartholomew, J. W., Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16(1), 1-29.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Barceló, D. (2019). Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Science of The Total Environment*, 695, 133896.
- Brouwer M., Huss A., Mark M., Nijssen P. C., Mulleners, W. M., Sas, A. M., Vermeulen, R. C. (2017). Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environment International*, 107, 100-110.
- Bose, S., Kumar, P. S., Vo, D. V. N. (2021). A review on the microbial degradation of chlorpyrifos and its metabolite TCP. *Chemosphere*, 283, 131447.
- Cantelli-Forti, G., Paolini, M., Hrelia, P. (1993). Multiple end point procedure to evaluate risk from pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 101(suppl 3), 15-20.
- Cain, R. B., Mitchell, J. A. (1996). Enhanced degradation of the fungicide vinclozolin: isolation and characterisation of a responsible organism. *Pesticide Science*, 48(1), 13-23.
- Carpenter, R. J., Hartzell, J. D., Forsberg, J. A., Babel, B. S., Ganesan, A. (2008). *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *Journal of Infection*, 56(4), 234-240.

- Casanova, A., Cabrera, S., Díaz-Ruiz, G., Hernández, S., Wachter, C., Zubillaga, M., Ortíz, I. (2021). Evaluation of endosulfan degradation capacity by six pure strains isolated from a horticulture soil. *Folia Microbiologica*, 66(6), 973-981.
- Chaudhuri, K., Selvaraj, S., Pal, A. K. (1999). Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(1), 63-67.
- Chart, H. (2012). Klebsiella, enterobacter, proteus and other enterobacteria: Pneumonia; urinary tract infection; opportunist infection. In *Medical Microbiology: Eighteenth Edition* (pp. 290-297). Elsevier Inc..
- Dahllof, S., Horel, S. 2019. Pesticides chlorpyrifos banned by EU. Euobserver Section: investigations.[accessed2020/01/10].<https://euobserver.com/investigations/14685>.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.
- Dua, K., Joshi, N. (2020). Chlorpyrifos: It's bioremediation in agricultural soils. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 2049-2060.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. (2005). Türkiye'de pestisit kullanımı, kalinti ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği*, 6, 629-648.
- EMBL-EBI. (2023). Clustal omega multiple alignment tools. Erişim tarihi: 10 Mart 2023. Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Erdoğan, Ç., Korukluoğlu, M. (2018). Antibiyotik dirençli staphylococcus aureus ve gıda güvenliği açısından önemi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (19), 9-15.
- Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R. (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 3), 409-419.
- Facklam, R. R. (1973). Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. *Applied Microbiology*, 26(2), 138-145.
- Fasesan, D., Dawkins, K., Ramirez, R., Rasheed-Jada, H., Onilude, A., Nash, O., Esiobu, N. (2020). Analysis of a tropical warm spring microbiota using 16S rRNA metabarcoding. *Advances in Microbiology*, 10(4), 145-165.
- Fulekar, M. H. (2014). Rhizosphere bioremediation of pesticides by microbial consortium and potential microorganism. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), 235-248.
- Freire C., Koifman, R. J., Sarcinelli, P. N., Rosa, A. C. S., Clapauch, R., Koifman, S. (2013). Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environmental research*, 127, 7-15.
- Gangola, S., Bhatt, P., Kumar, A. J., Bhandari, G., Joshi, S., Punetha, A., ... Rene, E. R. (2022). Biotechnological tools to elucidate the mechanism of pesticide degradation in the environment. *Chemosphere*, 296, 133916.
- Gilani, R. A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M. F. H., Rehman, S. U., Chaudhary, H. J. (2015). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus Pseudomonas. *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 105-119.
- Gupta, S., Gajbhiye, V. T. (2002). Persistence and leaching of  $\beta$ -cyfluthrin in alluvial soil of India. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 58(12), 1259-1265.

- Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C. (2007). Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere*, 66(2), 340-346.
- Istamboulie, G., Durbiano, R., Fournier, D., Marty, J. L., Noguier, T. (2010). Biosensor-controlled degradation of chlorpyrifos and chlorfenvinfos using a phosphotriesterase-based detoxification column. *Chemosphere*, 78(1), 1-6.
- Saengsanga, T., Phakratok, N. (2023). Biodegradation of chlorpyrifos by soil bacteria and their effects on growth of rice seedlings under pesticide-contaminated soil. *Plant, Soil and Environment*, 69(5), 210-220.
- Sutherland, T. D., Horne, I., Harcourt, R. L., Russell, R. J., Oakeshott, J. G. (2002). Isolation and characterization of a *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 380-389.
- Kaymak, S., Serim, A. T. (2015). Pestisit sektöründe araştırma ve geliştirme. *Meyve Bilimi*, 2(1), 27-34.
- Kızılaslan, N., Yaşa, Ö. (2011). Türkiye'deki tarımsal mücadele üretim tüketim ve dış ticaretinin Avrupa birliği uyum sürecinde gelişim seyri. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 2011(2), 103-116..
- Korhonen, K. E., Törrönen, R., Ylitalo, P., Hänninen, O. (1990). Inhibition of cholinesterases by DFP and induction of organophosphate-detoxicating enzymes in rats. *General Pharmacology: The Vascular System*, 21(4), 527-533.
- Kumral, A., Kumral, N. A., Gurbuz, O. (2020). Chlorpyrifos and deltamethrin degradation potentials of two *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen, 1919)(Lactobacillales: Lactobacillaceae) strains. *Turkish Journal of Entomology*, 44(2), 165-176.
- Lakshmi, V. C., Kumar, M., Khanna, S. (2008). Biodegradation of chlorpyrifos in soil by enriched cultures. *Current Microbiology*, 58, 35-38.
- Kolakowski, J. E., Defrank, J. J., Harvey, S. P., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T., Lai, K., Wild, J. R. (1997). Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 15(4), 297-312.
- Lee, W. J., Blair, A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Rusiecki, J. A., Sandler, D. P., Alavanja, M. C. (2004). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(23), 1781-1789.
- Liang, B., Yang, C., Gong, M., Zhao, Y., Zhang, J., Zhu, C., Li, S. (2011). Adsorption and degradation of triazophos, chlorpyrifos and their main hydrolytic metabolites in paddy soil from Chaohu Lake, China. *Journal of environmental management*, 92(9), 2229-2234.
- Li, X., He, J., Li, S. (2007). Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. *Research in Microbiology*, 158(2), 143-149.
- Liu, R., Liu, H., Zhang, C. X., Yang, S. Y., Liu, X. H., Zhang, K. Y., Lai, R. (2008). *Sphingobacterium siyangense* sp. nov., isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1458-1462.
- Luo, D., Zhou, T., Tao, Y., Feng, Y., Shen, X., Mei, S. (2016). Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Scientific Reports*, 6(1), 25768.

- Lourthuraj, A. A., Hatshan, M. R., Hussein, D. S. (2022). Biocatalytic degradation of organophosphate pesticide from the wastewater and hydrolytic enzyme properties of consortium isolated from the pesticide contaminated water. *Environmental Research*, 205, 112553.
- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Hirota, K. (2021). Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiology*, 21, 1-13.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M. I., Ramos, J. L. (1999). Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene*, 232(1), 69-76.
- Moreira, M., Noschang, J., Neiva, I. F., Carvalho, Y., Vicente, V. A. (2010). Methodological variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 845-849.
- Mitchell, J. A., Cain, R. B. (1996). Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science*, 48(1), 1-11.
- Narayanan, M., Ranganathan, M., Subramanian, S. M., Kumarasamy, S., Kandasamy, S. (2020). Toxicity of cypermethrin and enzyme inhibitor synergists in red hairy caterpillar *Amsacta albistriga* (Lepidoptera: Arctiidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 1-8.
- NCBI. (2023). National Center for Biotechnology Information. Erişim tarihi: 12 Mart 2023. Erişim adresi: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Oberemok V. V., Zaitsev, A. S., Levchenko, N. N., Nyadar, P. M. (2015). A brief review of most widely used modern insecticides and prospects for the creation of DNA insecticides. *Entomological Review*, 95(7), 824-831.
- Ozaktas, T., Taskin, B., Gozen, A. G. (2012). High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment. *Water Research*, 46(19), 6382-6390.
- Özercan, B., Taşcı, R. (2022). Türkiye’de pestisit kullanımının iller, bölgeler ve pestisit grupları açısından incelenmesi. *Ziraat Mühendisliği*, (375), 75-88.
- Patel, S., Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406-438.
- Parekh, N. R., Walker, A., Roberts, S. J., Welch, S. J. (1994). Rapid degradation of the triazinone herbicide metamiltron by a *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(5), 467-475.
- Portier, C. J., Armstrong, B. K., Baguley, B. C., Baur, X., Belyaev, I., Bellé, R., Zhou, S. F. (2016). Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). *J Epidemiol Community Health*, 70(8), 741-745.
- Peace, T. A., Brock, K. V., Stills Jr, H. F. (1994). Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence of the putative agent of proliferative ileitis of hamsters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 832-835.

- Petersen, F. C., Scheie, A. A. (2000). Genetic transformation in *Streptococcus mutans* requires a peptide secretion-like apparatus. *Oral Microbiology and Immunology: Short communication*, 15(5), 329-334.
- Pico, Y., El-Sheikh, M. A., Alfarhan, A. H., Barcelo, D. (2018). Target vs non-target analysis to determine pesticide residues in fruits from Saudi Arabia and influence in potential risk associated with exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 53-63.
- Pino, N., Penuela, G. (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 827-831.
- Qiao, D., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. (2001). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environmental Health Perspectives*, 109(9), 909-913.
- Qiu, X., Zhong, Q., Li, M., Bai, W., Li, B. (2007). Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B2. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(4), 297-301.
- Racke, K. D. (1993). Environmental fate of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, 1-150.
- Rani, M. S., Lakshmi, K. V., Devi, P. S., Madhuri, R. J., Aruna, S., Jyothi, K., Venkateswarlu, K. (2008). Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth response. *African Journal of Microbiology Research*, 2(2), 26-31.
- Rani, N. L., Lalithakumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), 1000-1006.
- Jha, S. K., Chishti, Z., Ahmad, Z. (2022). Enterobacter sp. SWLC2 for biodegradation of chlorpyrifos in the aqueous medium: modeling of the process using artificial neural network approaches. *Computers and Electronics in Agriculture*, 193, 106680.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 621-641.
- Rathod, A. L., Garg, R. K. (2017). Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 47, 29-34.
- Rawlings, N. C., Cook, S. J., Waldbiling, D. (2010). Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2, 4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54(1), 21-36..
- Santillan, G. S., Barnabé, C., Magallón-Gastelum, E., Waleckx, E., Yumiseva, C. A., Grijalva, M. J., Brenière, S. F. (2020). Molecular data supports monophyly of *Triatoma dispar* complex within genus *Triatoma*. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104429.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J., Willem, M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(4), 572-584.
- Sarkar, S., Seenivasan, S., Premkumar, R. (2009). Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere. *Plant Soil Environ*, 55(5), 196-201.

- Sethunathan, N., Yoshida, T. (1973). A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion. *Canadian Journal of Microbiology*, 19(7), 873-875.
- Steinberg, J. P., Burd, E. M. (2015). Other gram-negative and gram-variable bacilli. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8. ed., Vol. 2, pp. 2667-2683). Elsevier: Oxford, UK.
- Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S. B., Merrick, M. (2003). Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (opd) gene cluster found in Flavobacterium sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2533-2539.
- Simonelli, A., Basilicata, P., Miraglia, N., Castiglia, L., Guadagni, R., Acampora, A., Sannolo, N. (2007). Analytical method validation for the evaluation of cutaneous occupational exposure to different chemical classes of pesticides. *Journal of Chromatography B*, 860(1), 26-33.
- Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J., Wright, D. J. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by Enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4855-4863.
- Singh, B. K., Walker, A., Wright, D. J. (2005). Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(9), 1675-1682.
- Singh, B. K., Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471.
- Singh, B. K., Kuhad, R. C., Singh, A., Lal, R., Tripathi, K. K. (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19(3), 197-225.
- Sun, Y., Kumar, M., Wang, L., Gupta, J., Tsang, D. C. (2020). Biotechnology for soil decontamination: opportunity, challenges, and prospects for pesticide biodegradation. *Bio-based Materials and Biotechnologies for Eco-Efficient Construction*, 261-283.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4799-4807.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129-136.
- TOB. (2020). Tarım ve Orman Bakanlığı 2020 Yasaklanan bitki koruma ürünleri aktif madde listesi. Ankara. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/934/Yasaklanan-Bitki-Koruma-Urunleri-Aktif-Madde-Listesi>
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(2), 154-169.
- Tiryaki, O., Potur, T. (2017). Toprakta pestisitlerin arındırılmasında önemli bir araç: fitoremediasyon. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 33(1), 59-68.
- TÜİK. (2022). Türkiye İstatistik Kurumu 2022 Türkiye tarımsal ilaç kullanım miktarları [https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB\\_Bitki\\_Koruma\\_Urunleri/Istatistik/Yillar\\_Itibariyla\\_BKU\\_Kullanım\\_Miktar\\_2006-2022](https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Bitki_Koruma_Urunleri/Istatistik/Yillar_Itibariyla_BKU_Kullanım_Miktar_2006-2022).
- Vassilev, K., Kambourova, V. (2006). Pesticides as global environmental pollutants. *Chem Intent Accid Glob Environ Threat*, 26, 173-191.

- Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S. R., Divya, G., Roy, P. (2010). Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(1), 22-29.
- Vijayalakshmi, P., Usha, M. S. (2012). Optimization of chlorpyrifos degradation by *Pseudomonas putida*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(5), 2532-2539.
- Warton, B., Matthiessen, J. N., Shackleton, M. A. (2003). Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(8), 1123-1127.
- Wolejko, E., Jabłońska-Trypuć, A., Wydro, U., Butarewicz, A., Łozowicka, B. (2020). Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides—a review. *Applied Soil Ecology*, 147, 103356.
- Whangchai, K., Van Hung, T., Al-Rashed, S., Narayanan, M., Kandasamy, S., Pugazhendhi, A. (2021). Biodegradation competence of *Streptomyces toxytricini* D2 isolated from leaves surface of the hybrid cotton crop against  $\beta$  cypermethrin. *Chemosphere*, 276, 130152.
- Wilson, R. G. (1984). Accelerated degradation of thiocarbamate herbicides in soil with prior thiocarbamate herbicide exposure. *Weed Science*, 32(2), 264-268.
- William, S., Feil, H., Copeland, A. (2012). Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. *Sigma*, 50(6876).
- Xu, G., Zheng, W., Li, Y., Wang, S., Zhang, J., Yan, Y. (2008). Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 51-56.
- Yang, C., Liu, N., Guo, X., Qiao, C. (2006). Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiology Letters*, 265(1), 118-125.
- Yücel, Ü., Ilim, M., Gözek, K., Helling, C. S., Sarıkaya, Y. (1999). Chlorpyrifos degradation in Turkish soil. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 34(1), 75-95.
- Zhu, J., Zhao, Y., Qiu, J. (2010). Isolation and application of a chlorpyrifos-degrading *Bacillus licheniformis* ZHU-1. *African Journal Microbiology Research*, 4(24), 2716-2719.



## ÖZ GEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Merve YAVAŞ

### Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Fakülte : Fen Fakültesi

Bölüm : Moleküler Biyoloji ve Genetik

Mezuniyet Yılı : 2019

Yüksek Lisans

Üniversite :

Enstitü :

Anabilim Dalı :

Mezuniyet Yılı :

### Akademik Yayınlar

Yavas, M., Ozaktas, Ö., (2021). Determination of bacterial isolates from pesticide contaminated agricultural area **12th International Conference On Engineering & Natural Sciences**, Bingol, Turkey



**VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU**

Tarih 10/10/2023

Tez Başlığı: Pestisit Kontaminasyonu Olan Tütün Arazisinden Organofosforlu Bileşiklere Dirençli Bakterilerin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu.

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 29 (yirmi dokuz) sayfalık kısmına ilişkin, 10/10/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezin benzerlik oranı %8 (sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Merve YAVAŞ

Öğrenci No: 20910001126

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Statüsü: (X) Yüksek lisans ( ) Doktora

**DANIŞMAN**

**ENSTİTÜ ONAYI**

UYGUNDUR

UYGUNDUR