

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PESTİSİTLERİN (SENTETİK, DOĞAL VE BİYOPESTİSİT)  
MİKROBİYAL FLORAYA ETKİSİ

DURDANE KAYA

MAYIS 2016

**Biyoloji Anabilim Dalında** Durdane KAYA tarafından hazırlanan PESTİSİTLERİN (SENTETİK, DOĞAL VE BİYOPESTİSİT ) MİKROBİYAL FLORAYA ETKİSİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Sema ÇETİN  
Danışman

Jüri Üyeleri  
Başkan : Doç. Dr. Beril AKIN \_\_\_\_\_  
Üye (Danışman) : Prof. Dr. Sema ÇETİN \_\_\_\_\_  
Üye : Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU \_\_\_\_\_

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

## ÖZET

### PESTİSİTLERİN (SENTETİK, DOĞAL VE BİYOPESTİSİT) MİKROBİYAL FLORAYA ETKİSİ

KAYA, Durdane

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sema ÇETİN

Mayıs 2016, 99 sayfa

Pestisit terimi kısaca pest (zararlı, haşarat), adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelir. Tarımsal mücadelede pestisitlerin bilimsel denetimden yoksun, gelişi güzel ve aşırı dozda kullanılmaları sonucunda birçok olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır. Günümüzde organik tarım ve organik tarım ürünlerinin tüketimi önem kazandıkça sentetik pestisitlerin yerine, doğal pestisitlerin ve biyopestisitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Tarımsal uygulamalarda kullanılan bu pestisitlerin ekosistemdeki rolü üzerine birçok araştırma bulunmaktadır. Ancak mikrobiyal flora üzerine etkisiyle ilgili detaylı araştırmalara rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmada tarımsal uygulamalarda kullanılan bazı sentetik, biyopestisit ve doğal pestisit mikrobiyal flora üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Özellikle; tarım arazilerinden izole edilen bakterilerin pestisitlere duyarlılıkları belirlenerek metabolik aktivitelerindeki değişimlerin ve genetik modifikasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tarım arazilerinden alınan toprak numunelerinden toplamda 50 bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bakterilerde yapılan ön tanımlama çalışmalarından sonra seçilen 8 suşun moleküler tanımlama (16S rRNA dizilimine göre) ile türleri belirlenmiştir. Pestisit olarak kullanılan Basudin 60 EM, Dursban 4, Cupravit OB 21 (sentetik pestisitler), Bordo Bulamacı (doğal pestisit) ve Companion (*Bacillus Subtilis* GB03) (biyopestisit)'a bu suşların duyarlılıkları MİK yöntemiyle

gösterilmiştir. Genel inhibisyon testlerinde kuyu ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Ticari olarak günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan bu pestisitlerin tarım arazilerinde tavsiye edilen dozları da göz önünde tutularak yapılan genel inhibisyonların belirlenmesinden sonra bu suşlarda metabolik aktivitede meydana gelen değişimler tespit edilmiştir. Metabolik aktivite olarak da antibiyotik duyarlılıkları ve üreme eğrilerindeki değişimler belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre test edilen 8 suşta da arazide kullanılan doz uygulamalarında antibiyotik duyarlılıklarında artış tespit edilmiştir. Genetik modifikasyonlara dair yapılan analizlerde ise modifikasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak; günümüzde kullanılan tüm pestisitlerin mikrobiyal florada sadece sidal etki yapmadığı; aynı zamanda metabolik aktivitede ve genetik yapıda değişimlere neden olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Pestisit, Antibiyotik duyarlılık, MİK, Mikrobiyal flora

## ABSTRACT

### THE INFLUENCE OF PESTICIDES (BIOPESTICIDE, SYNTHETIC AND NATURAL PESTICIDE) ON MICROBIAL FLORA

KAYA, Durdane

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Sema ÇETİN

May 2016, 99 Pages

Pesticides short-term pest, (vermin) refers to the substance used to kill harmful organisms. Many negative effects arise as a result of using pesticides in agricultural fight the devoid of scientific audit, indiscriminate and excessive doses. Today, as it gains importance the consumption of organic farming and organic farming products, the use of natural pesticides and bio-pesticides instead of synthetic pesticides, have become widespread. There is a lot of research about the role in the ecosystem of these pesticides used in agricultural applications. However, it has not been found detailed studies on the effect on the microbial flora. Therefore, in our study, it is aimed to determine the effects of some synthetic, biopestisit and natural pesticide that are used in agricultural applications on microbial flora. Particularly, it is aimed to identificate the changes in metabolic activity and genetic modifications by determining the sensitivity to pesticides of the bacteria isolated from agricultural land.

It was carried out total 50 bacteria isolation from agricultural land as soil samples. After preliminary studies with these selected 8 bacteria have been identified species with molecular identification and made identification according to the 16s rRNA base sequence. The sensitivity of these strains to Basudin 60 EM, Dursban 4, Cupravit OB 21 (synthetic pesticide), Bordeaux mixture (natural pesticide) and Componion (*Bacillus subtilis* GB03) (biopesticide) was determined by MIC method.

Wells and disc diffusion methods were used in general inhibition tests. After the determination of general inhibition, nowadays in the consideration of commercially widely used also the recommended dose of these pesticides in agricultural areas, antibiotic susceptibility are reviewed to detect changes in metabolic activity in these bacteria. The antibiotic susceptibility and changes in growth curves were determined as metabolic activity. According to the obtained data, it has been found to increase in antibiotic susceptibility in the applications dose used in the field on 8 tested bacteria. It has been found to modification occurred in analysis on the genetic modifications. As a result; it has shown all pesticides that are used nowadays don't impact as only sidal on the microbial flora, at the same time that cause changes in metabolic activity and genetic structure.

**Key Words:** Pesticide, Antibiotic Sensitivity, MIC, Microbial Flora

Kendimi geliştirmemde emek veren, her türlü desteklerini benden esirgemeyen, bana doğruya giden yolu gösteren ve bu doğruyu bulmak için cesaretlendiren değerli anneme ve babama, biricik kardeşime ve rahmetli dedem Mustafa EROĞLU'na ithaf olunur...

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilimsel bilgi ve tecrübesi ile yol gösterici olan, tezimi yönlendirirken emeğini ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sema ÇETİN'e;

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına destek olan ve yol gösteren, karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda olan, bana çalışma ortamımı sunan ve orayı güzel kılan değerli hocam Doç. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU'na;

Tez çalışmamda DNA analizlerinde beni destekleyen Nur YILDIRIM ARSLAN ve tez düzenlemem sırasında bana destek olan Mehmet GÜVEN'e;

Tez çalışmamda hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve tez de kullandığım toprak ve yaprak numunelerinin temininde bana yardımcı olan dedem Veli KAYA ve amcam Faruk KAYA'ya;

Gazi Üniversitesinde geçirdiğim süre boyunca her zaman yanımda olan kardeşim olarak saydığım Ezgi METİN ve Mınoo POURHASSAN SHAMCHI'ya;

Hayatımın atıf noktalarına sebep olan can arkadaşlarım; Özlem DİZMAN, Elif ZAPÇIOĞLU, Dicle KAYMAK, Melike GÜLCÜ, Özgür Uğur ARIKAN, Serhat ÜTÜK, Sinem KOYUN, Sevgi TÜTER, İlkin Sevi AYDINLI, Ebru YİĞİT, Tülay ÖZDEN, Hakan ÖĞÜT ve çalışmalarım boyunca emeği geçen tüm arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca kararlarımın her zaman en büyük destekçileri olan, attığım her adımda bana sonuna kadar güvenen, sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi bilim uzmanlığı tez çalışmam sırasında da sonsuz sabır göstererek daima yanımda olan kıymetli annem Mahinur KAYA, babam Servet KAYA, kuzenim Esra KODAN ve biricik kardeşim Aybüke KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, 2015- 36 No'lu 'Zirai mücadelede kullanılan bazı pestisitlerin, toprak flora bakterileri sekonder metabolitlerinin (EPS ve siderofor) üretimine etkisi' isimli proje olarak KKÜ-BAP tarafından desteklenmiştir.



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Pestisitler .....	2
1.2. Pestisitlerin Özellikleri.....	3
1.3. Pestisitlerin Sınıflandırılması .....	4
1.4. Pestisitlerin Kullanım Alanları .....	7
1.5. Dünyada ve Türkiye’de pestisit kullanımı .....	7
1.6. Pestisitlerin Ekosistem Üzerindeki Etkileri .....	10
1.7. Toprak ve Mikroorganizma ilişkisi .....	14
1.8. Epifitik Mikroflora ve Pestisitler .....	17
1.9. Amaç .....	18
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	19
2.1. Materyal .....	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	21
2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	21
2.1.3. Kullanılan Test Bakterileri .....	21
2.2. Metod .....	22
2.2.1. Toprak ve Yaprak Numunelerinden Bakteri İzolasyonu .....	22
2.2.2. Moleküler İdentifikasyon Testleri .....	23
2.2.3. Tanımlaması Yapılan Suşların Muhafazası .....	24
2.2.4. Kullanılan Pestisitler .....	24
2.2.5. Pestisitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Tespiti .....	25
2.2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi .....	26
2.2.5.2. Kuyu Difüzyon Yöntemi .....	26

2.2.6. Test mikroorganizmalarının Pestisitlere Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi: MİK tayini.....	26
2.2.7. Pestisitlerin Mikrobiyal Floraya Etkisinin Tespiti .....	27
2.2.7.1. Toprak ve Yaprak İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarına Pestisitlerin Etkisi .....	27
2.2.7.2. Toprak ve Yaprak İzolatlarının Üremesine Pestisitlerin Etkisi.....	28
2.2.7.3. Genetik modifikasyonların Tespiti .....	29
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>30</b>
3.1. Toprak ve Yapraktan Elde Edilen İzolatların İdentifikasyonları .....	30
3.2. Çalışmada Kullanılan Pestisitlerin Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi .....	34
3.3. Test Mikroorganizmalarının Pestisitlere Duyarlılıklarının Belirlenmesi: MİK Tayini .....	39
3.4. Toprak ve Yapraktan İzole Edilen Suşların Metabolik Aktiviteleri Üzerine Pestisitlerin Etkisi .....	42
3.4.1. Antibiyotik Duyarlılıklarına Etkisi .....	42
3.4.2. Toprak ve Yapraktan İzole Edilen Suşların Üremesine Pestisitlerin Etkisi .....	58
3.4.3. Genetik Modifikasyonlar .....	64
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>84</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyada pestisit kullanımının etkiledikleri zararlı gruplarına göre dağılımı .....	8
1.2. Etkiledikleri zararlı gruplarına göre pestisitlerin Türkiye'deki kullanım oranları .....	9
1.3. Etkiledikleri zararlı gruplarına göre pestisitlerin Türkiye'deki kullanım miktarları (ton) .....	10
1.4. Pestisitlerin toprak-bitki-çevre sistemindeki davranışları .....	12
1.5. Pestisitlerin doğadaki hareketleri.....	13
2.1. Toplanan numunelerin istasyon yerleri; A: Demirişik Köyü, B: Kuyuluk Bölgesi .....	19
2.2. Toprak ve yaprak numunelerinin toplandığı Demirişik Köyü, İstasyon A görüntüleri .....	20
2.3. Toprak ve yaprak numunelerinin toplandığı Kuyuluk Bölgesi, İstasyon B görüntüleri .....	20
2.4. Toprak numunelerinden yapılacak bakteri izolasyonunun hazırlık aşaması .....	22
3.1. İzolatlardan seçilen 8 suşun morfolojileri.....	32
3.2. Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin <i>P. aeruginosa</i> üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği .....	37
3.3. Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin <i>E. coli</i> üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği.....	37
3.4. Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin <i>Salmonella sp.</i> üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği.....	38
3.5. Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin <i>S. aureus</i> üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği .....	38
3.6. Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin <i>B. spizenii</i> üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği.....	39
3.7. Companion (Biyolojik Pestisit) konsantrasyonunun MİK görüntüsü .....	41

3.8. Kontrol grubu olarak <i>Bacillus cereus</i> DY6, <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1 ve <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in antibiyotiklere duyarlılığı .....	44
3.9. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	46
3.10. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	46
3.11. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	47
3.12. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Tetracyclin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	47
3.13. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	48
3.14. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	48
3.15. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	50
3.16. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	51
3.17. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	51
3.18. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Tetracyclin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	52
3.19. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	52
3.20. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	53
3.21. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	55
3.22. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	55
3.23. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	56

3.24. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Tetracyclin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	56
3.25. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	57
3.26. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim .....	57
3.27. <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra tüplerde görülen bulanıklık değişimi .....	59
3.28. <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in (kontrol) üreme eğrisi .....	60
3.29. Cupravit (yüksek doz) ile muamele edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in üreme eğrisi .....	60
3.30. Companion (MİK) ile muamele edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in üreme eğrisi .....	61
3.31. Bordo bulamacı (Arazi=MİK) ile muamele edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in üreme eğrisi .....	61
3.32. Bordo bulamacı (yüksek doz) ile muamele edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in üreme eğrisi .....	62
3.33. Bordo bulamacı yüksek dozundaki <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in 0- 8.saatlerindeki koloni görüntüleri .....	63
3.34. <i>Bacillus cereus</i> DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı elektrogramı .....	67
3.35. Bordo bulamacıyla kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı elektrogramı .....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Pestisitlerin toprakta kalıcılık durumları .....	13
1.2. Verimli bir toprakta bulunan mikroorganizma ve mikrofaunanın yaklaşık sayıları ve biyomas miktarları .....	16
2.1. Çalışmada kullanılan sentetik, biyolojik ve doğal pestisitlerin özellikleri .....	25
2.2. Antibiyotik duyarlılık sonucu referans olarak alınan zon çapları (NCCLS, 2011 ve CA-SFM, 2007) .....	28
3.1. Toprak ve yaprak numunelerinden izole edilen saf kültürlerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	30
3.2. İzole edilen 8 suşun 16S ribozomal RNA'ya dayalı yapılan tür tayini sonuçları .....	33
3.3. Sentetik, biyolojik ve doğal pestisitlerin test mikroorganizmalarıyla yapılan kuyu ve disk yöntemiyle belirlenen inhibisyon zon çapları (mm).....	35
3.4. Pestisitlerin test mikroorganizmaları üzerindeki MİK konsantrasyonları .....	40
3.5. Kontrol grubu olarak <i>Bacillus cereus</i> DY6, <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1 ve <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm) .....	43
3.6. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm) .....	44
3.7. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm) .....	49
3.8. Pestisitlerle kültüre edilen <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm) .....	54
3.9. <i>Bacillus tequilensis</i> DT2'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra belirlenen generasyon sayıları ve süreleri .....	58
3.10. Pestisitlerle muamele öncesi ve sonrası <i>Bacillus cereus</i> DY6'un 16S ribozomal RNA'ya dayalı tür tayini sonucu .....	64
3.11. <i>Bacillus cereus</i> DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı .....	65

3.12. Bordo bulamacıyla kültüre edilen <i>Bacillus cereus</i> DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı .....	66
--	----



## SİMGELER DİZİNİ

mm	Milimetre
$\mu$ l	Mikrolitre
g	Gram
cm	Santimetre
ml	Mililitre
kg	Kilogram
ha	Hektar
h	Saat





## 1.GİRİŞ

Günümüzde artan nüfusun besin ihtiyacını karşılayacak tarım alanlarının kısıtlı oluşu, insanoğlunun karşılaştığı en önemli problemlerden birisidir. FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre mevcut dünya nüfusunun % 40'ı yeterli seviyede beslenememekte, bunun sonucunda da açlık ve sefaletten dolayı her yıl binlerce kişi ölmektedir [1]. Bitkiler, hızla artan dünya nüfusunun temel besin kaynağını oluşturur. Ancak temel besin kaynağını oluşturan bu bitkilerin yetiştirilmesi esnasında çeşitli tarımsal zararlılar da bulunmaktadır. Bunlar yabancı ot, nematod, tarımsal ürünlere zarar veren mikroorganizmalar ve böcek çeşitleridir. Yapılan çalışmalarda gıda üretiminin 1/3'ünün bu zararlılar tarafından tahrip edildiği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte ortalama yılda 80 milyon artan dünya nüfusunu beslemek için kullanılan tarım alanlarının miktarı da sınırlıdır ve küresel ısınmanın sonuçlarından biri olarak gün geçtikçe bu alanlar azalmaktadır [2-6]. Ortaya çıkan beslenme problemini çözmek amacıyla öncelikli olarak tarım alanlarından maksimum düzeyde ürün sağlanabilmesi hedeflenmiş ve bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır [7]. Bu nedenle, doğal dengeyi tehdit eden tarım ilaçlarından tümüyle vazgeçmemiz de mümkün değildir. Ülkemizde yaklaşık 2000 pestisit ruhsatlandırılmıştır. Bu ilaçların % 75' i Çukurova bölgesinde kullanılmakta olup bilinçsizce yapılan uygulamalardan dolayı çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Örneğin; çilek üretiminde bu ilaçların kullanımından sonra meydana gelen olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyvenin bulunmasından dolayı hasatın bir kerede yapılamaması, olgunlaşmamış meyveler için yapılan ilaçlamalar sonucunda olgunlaşanlar üzerinde de ilaç kalıntılarının kalması; narenciye ağaçlarında meyve verme aşamasında kullanılması gereken sistemik ilaçların meyve verdikten sonra da kullanılması bu sorunlardan bazılarıdır [8].

Dünya nüfusunun beslenme ihtiyacının karşılanması, tarımda birim alandan alınan ürün miktarının artması, iyi tohum kullanımı, gübreleme, sulama, toprak hazırlama gibi faktörlerin yanında hastalık ve zararlılarla mücadele ile mümkün olmaktadır [9]. Pestisitler; tarım zararlıları ve hastalıklarla mücadele, tarımsal üretimde kalite ve verimliliğin artırılmasında, hasat öncesi ve sonrasında kayıpların önlenmesinde

önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde ve dünyada uygulama kolaylığı ve iyi sonuç alınması nedeniyle daha çok kimyasal savaşa başvurulmaktadır. Bu amaçla kullanılan kimyasallar (sentetik, doğal ve biyolojik), bitki koruma ürünleri olarak ulusal mevzuata göre kullanılmaktadır [10]. Türk Gıda Kodeksi bitki koruma ürünlerini; tarımsal ürünlerin üretimi, işlenmesi, depolanması, taşınması ve dağıtılması sırasında hastalığın, zararlıların, yabancı otların ve mikroorganizmaların kontrol edilmesi, uzaklaştırılması, imha edilmesi ve önlenmesi amacıyla kullanılan, bitki gelişimini düzenleyiciler dahil, kimyasal maddeler olarak tanımlamaktadır. Bitkilerin büyümesini düzenleyen, yaprak düşüren, filizlenmeyi önleyen maddeler de bu tanım kapsamına girmektedir.

### **1.1. Pestisitler**

Pestisitler, besin maddelerinin üretimi, tüketimi, depolanmaları sırasında tarımsal ürünlere zarar veren ve ürün kaybına neden olan hastalık yapıcı mikroorganizma ve böcek, kemirici, yabancı ot, mantar gibi zararlıları uzaklaştırmak, yok etmek ve bitki büyümesini düzenlemek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ürünlerdir [8, 11].

Bitki zararlılarına karşı zehir etkisine sahip olan pestisitler, gıda maddeleri için“bulaşan” niteliğindeki istenmeyen maddelerdir. Buna göre bulaşanlar; bitki, hayvan ve/veya toprak kökenli yabancı maddeler, ilaç kalıntıları, insan sağlığına zararlı olan plastik madde, deterjan, dezenfektan, radyoaktif madde kalıntıları ve her türlü istenmeyen maddelerdir [12, 13].

Türkiye' de ve birçok gelişmiş ülkede tarım zararlıları ile mücadele, kimyasal ilaçlarla yapılmaktadır. Bugün tarım ilaçlarının kullanılmaması durumunda, bazı ürünlerde ortalama % 65 civarında kayıpların meydana gelebileceği tahmin edilmektedir. Ancak tarım ilaçları, çoğu insan tarafından bilinçsizce kullanılmaktadır. Bu ilaçlardan en önemlisi ve kullanımına dikkat edilmezse en zararlıları ise pestisitlerdir [1, 4, 6, 9, 14-16].

## 1.1.Pestisitlerin Özellikleri

İdeal bir pestisit; hedef canlıya spesifik olmalı, insanlara zarar vermemeli, ucuz olmalı, kolay uygulanabilmeli, kolayca toksik olmayan maddelere dönüşebilmeli ve yanıcı, aşındırıcı-patlayıcı olmamalıdır [17]. Pestisitler, oksitleyici özelliğe sahip bileşiklerdir. Hücre membranındaki lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyebilmektedirler. Membran lipitlerinin oksidasyonu ile lipitlerin peroksidasyonuna neden olup, hücre membran permeabilitesini bozarak hücre metabolizmasını ve morfolojisini olumsuz yönde etkilemektedirler [18]. Ancak günümüzde kullanılan pestisitlerin çoğu aromatik bileşikler olup biyolojik etkinliklerinin yanı sıra topraktaki kalıcılığıyla kirletici özellikler göstermekte ve diğer canlılarda (besin zinciri yoluyla) toksik etkilere neden olmaktadır.

Pestisitlerin topraktaki kalıcılığı, pestisit başlangıç düzeyinin yarısının ortadan kalkması veya diğer bileşiklere ayrışabilmesi için gereken zaman olarak tanımlanır. Bazı durumlarda ortaya çıkan bu ayrışma ürünleri, özgün bileşik kadar veya ondan daha zararlı etkilere sahip olabilmektedir [9]. İnsanlar tarafından tüketilen gıdalardaki pestisit kalıntıları, insan sağlığı açısından önemli bir risk faktörüdür. Bu nedenle, tüketiciye ulaştırılan ürünün güvenli olması bakımından gıdalara bulaşan tarım ilaçlarının minimum seviyede tutulması gerekmektedir. Yasalarda öngörülen limitlerin aşılmasıyla insan sağlığı tehlikeye girebilmekte ve zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hayvan yemlerinde kullanılan pestisitlerin besin zinciri yoluyla iletilmesi de insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır [12]. Bu kimyasal maddelerin kalıntıları farklı zamanlarda biyolojik besin zincirine girerek akut ve kronik zehirlenme tehlikesinden başka, muhtemel mutajenik etkileri ile gelecek nesillerin genetik sağlığını tehdit etmektedir [19]. Birçok araştırmacı, pestisitlerin mutajenik ve karsinojenik etkilere sahip olduklarını bildirmiştir [20-27]. Bolognesi ve Morasso (2000), kullandıkları pestisitlerin (sentetik pestisit) %59'unun gen mutasyonu, %83'ünün kromozomal hasar ve %71'inin DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir [28].

## **1.2.Pestisitlerin Sınıflandırılması**

### **Formülasyon şekillerine göre;**

Toz ilaçlar (DP), ıslanabilir toz ilaçlar (WP), suda çözünen toz ilaçlar (SP), kuru tohum ilaçları (DS), solüsyonlar veya sulu çözeltiler, emülsiyon konsantre ilaçlar (EC), akıcı konsantre ilaçlar (SC), yağlar (GS) (yazlık ve kışlık yağlar), tabletler (TB), granüller (GR), pelletler, aerosoller (AE), zehirli yemler (RB), kapsül şekli verilmiş formülasyonlar (süspansiyonlar) (CS), gübre karışımları, yağ konsantreleri ve yağ solüsyonları, çok düşük hacimli ilaçlamaya uygun sulandırılmadan kullanılan sıvı ilaç formülasyonları, gaz halinde olanlar (ve neşredenler) (VP-GA) ve diğerleri şeklinde sınıflandırılır [29].

### **Etkiledikleri zararlı gruplarına göre;**

İnsektisit (böcekleri öldüren), akarisit (akarları, örümcekleri öldüren), nematisit (nematodları öldüren), mollusisit (yumuşakçaları öldüren (salyongozları)), rodentisit (kemirgenleri öldüren), avisit (kuşları öldüren), afisit (yaprak bitlerini öldüren), fungusit (fungusları öldüren), fungustatik (fungusların faaliyetini durduran), herbisit (yabancı otları öldüren), bakterisit (bakterileri öldüren), algisit (algleri öldüren), mitisit (kurt ve kenelere karşı) ve virusit (virüslere karşı) şeklinde sınıflandırılır [9, 29].

### **Kullanma tekniğine göre;**

Doğrudan kullanılan ilaçlar, toz ilaçlar, ÜLV formülasyonu, granüller ve bazı nematisitler ve su veya organik çözücü ile seyreltilerek kullanılan ilaçlar şeklinde sınıflandırılır [29].

### **Etkilediği zararlının biyolojik dönemine göre;**

Larvisit (larva öldüren), ovisit (yumurta öldüren), ovalarvasit (hem yumurta hem larva öldüren) ve erginleri öldüren şekilde sınıflandırılır [29].

### **Zararlılara etki yollarına göre;**

Zararlılarda; pestisitın zararlı organizmaya giriş yolu dikkate alınır. Mide zehirleri, değme (temas) zehirleri ve solunum (teneffüs) zehirleri. Bitkilerde ise; sistemikler, yarı sistemikler ve sistemik olmayanlar şekilde sınıflandırılır [29].

### **Toksik özelliklerine göre;**

Etkilediği canlılarda meydana getirdiği zehirlenmeler esas alınarak yapılan sınıflandırmadır. Fiziksel zehirler, protoplazma zehirleri, sinir sistemi zehirleri, solunum zehirleri ve antikoagulantlar (Kanın pıhtılaşmasını engelleyerek iç kanamaya sebep olan ilaçlar) şekilde sınıflandırılır [29].

### **Kontrol ettiği zararlının bulunduğu yere ve konukçu durumuna göre;**

Kültür bitkilerindeki zararlılara karşı kullanılanlar, orman zararlılarına karşı kullanılanlar, kerestelerin korunmasında kullanılanlar, depodaki ürüne zarar verenlere karşı kullanılanlar, ev böceklerine karşı kullanılanlar, hastalık vektörlerine karşı kullanılanlar, hayvan ve insanlardaki dış parazitlere karşı kullanılanlar olarak sınıflandırılır [29].

### **İlacın fiziki haline göre;**

Katı formülasyonlar (toz - WP - granül vb.) ve likit formülasyonlar (EC - yağlar - solüsyonlar vb.) şeklinde sınıflandırılır [29].

### **Bileşimindeki etkili madde grubuna göre;**

**a) İnsektisit etkili maddeler;** Klorlu hidrokarbonlar, organik fosforular, karbamatlar, sentetik piretroitler, benzoyl üreler, bakteriler ve diğerleri olarak sınıflandırılır [29].

**b) Akarisit etkili maddeler;** Halojen ve oksijenliler, amin ve hidrazin türevleri, dinitrojenal ve esterler, kükürtler, organik kalaylılar ve diğerleri olarak sınıflandırılır [29].

**c) Kış mücadele yağları ve yazlık yağlar;** DNOC ammonium-yağ, yağ + DNOC ve yazlık yağlar olarak sınıflandırılır [29].

**d) Fumigantlar, nematisitler ve toprak fumigantları**

**e) Rodentisit ve mollusisit etkili maddeler**

**f) Fungisit etkili maddeler;** Bakırlılar, dicarboximitler-phytalinidler, dithiocarbamatlar, kalaylılar, kükürtlüleri, nitro bileşikler ve diğerleri koruyucu fungusitler olarak kullanılırken, aminler ve amidler, benzimidiazoller, morpholinler, pyrimidinler, imidazoller, triazoller ve diğerleri sistemik fungusitler olup bunun yanı sıra biyolojik fungusitler de biyolojik materyallerden elde edilen organik bileşikler olarak sınıflandırılır [29].

**g) Herbisit etkili maddeler;** Penoxy bileşikler, karbamatlar, üre bileşikleri, sulfonyl üreler, anilinler, amidler ve anilidler, benzoik asitler, picolinic asitler, organik

halojen asitler, diazinler, triazinler, benzonitriller, siklohexonlar, imidazolinonlar, triazoller, oxadiazoller, amino fosfonatlar ve diğeri olarak sınıflandırılır [29].

**h) Bitki korumada kullanılan diğeri etkili maddeler;** Demirli bileşikler, böcek cezbediciler, fremonlar, bitki gelişim düzenleyiciler, auxinler, gibberellinler, gibberellin A4/A7+benzylodinine, sitokininler, inhibitörler ve büyüme gerileticiler ve diğeri olarak sınıflandırılır [29].

### **1.3.Pestisitlerin Kullanım Alanları**

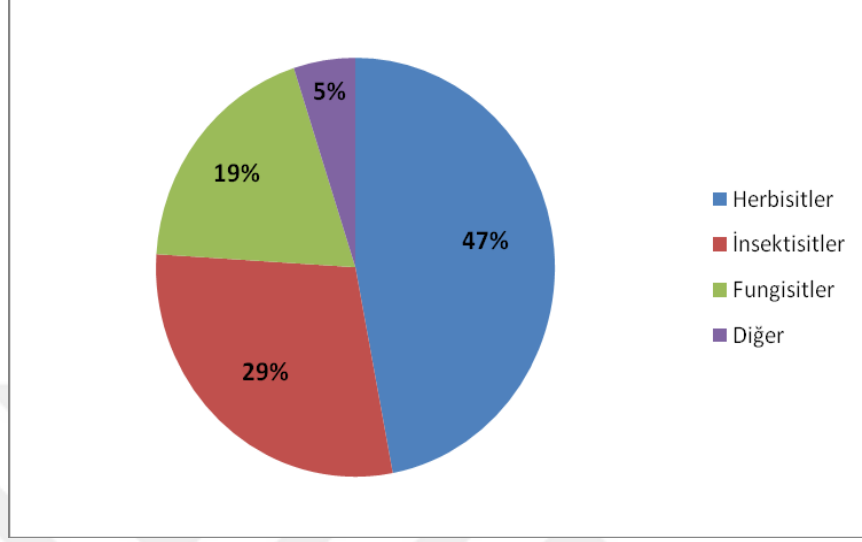
18. yüzyılda pestisitler kullanılmaya başlanmakla birlikte kimyasal pestisitler 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmıştır [17]. Eski kültürlerde bazı bitki hastalıklarına karşı kükürt kullanıldığı bilinmekle birlikte, esas bitki koruma çalışmaları, Pasteur'ün 19. yüzyılda bazı bitkisel ve hayvansal hastalıklara ait mikroorganizmaları keşfetmesi ile başlamıştır. Bu organizmaları etkileyebilecek ilaçların araştırılması sonucunda, tarım ilaçları kullanılmaya başlanmıştır [30].

Tarımsal pestisitlerin % 14 - 80' i toprağa uygulanmaktadır [31]. ABD' de pestisit kullanımının % 75' i tarımsal alandadır. Buna karşın dünyada DDT, aldrin, dieldrin, klordon, heptaklor, lindan, toksofen kullanımları yasaklanmıştır [17].

### **1.4.Dünyada ve Türkiye'de Pestisit Kullanımı**

1970 yılında başlayan çevre koruma hareketlerinden sonra bütün dünyada pestisit kullanımının çok daha kontrollü yapıldığı, mevcut etkili maddelerin yeniden emniyetlilik testlerine alındığı ve bu değerlendirmeler sonunda bazı pestisitlerin çeşitli ülkelerde yasaklandığı, kısıtlandığı ya da kontrollü kullanıldığı bilinmektedir. Avrupa ve Amerika'da tarım ilacı üreten tesisler çevresel baskılar nedeni ile kapatılmakta, burada üretilen ilaçların birçoğu Avrupa ve Amerika' da kullanılmamakta ve geliştirmekte olan ülkelere satılmaktadır. Dünyada, yılda 2,5

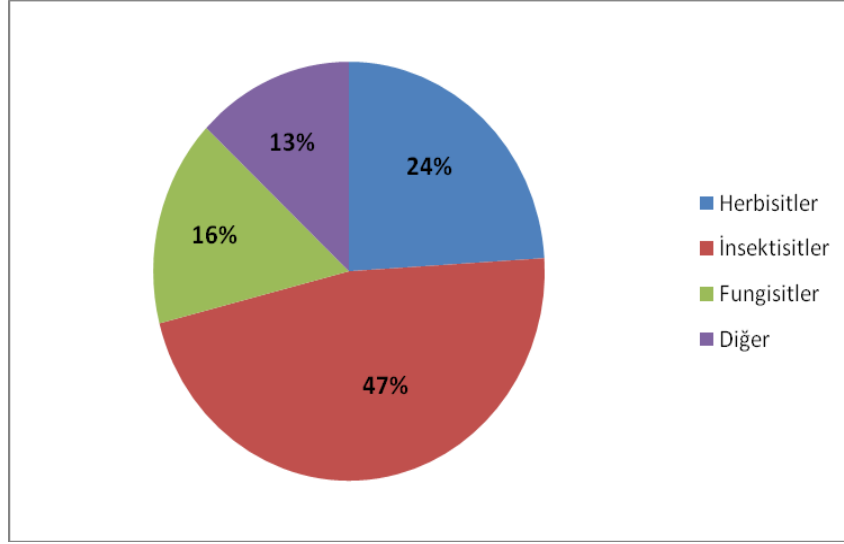
milyon tondan fazla olan küresel çapta pestisit kullanım oranları Şekil 1.1' de görülmektedir [1, 9].



**Şekil 1.1.** Dünyada pestisit kullanımının etkiledikleri zararlı gruplarına göre dağılımı [17]

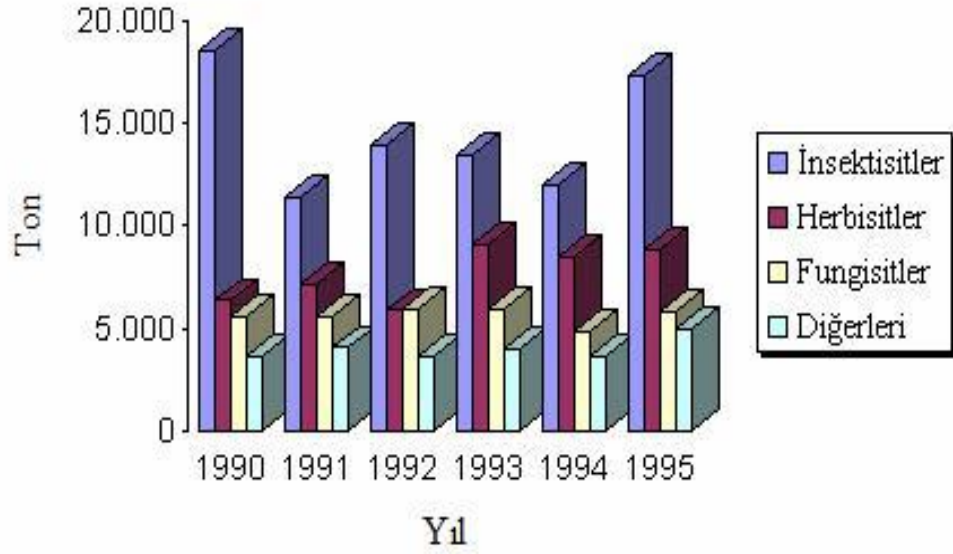
Türkiye’de formülasyon olarak pestisit kullanımı 49.000 ton civarındadır ve pestisit pazarı yıllık 250 milyon doları bulmaktadır [32, 33]. Türkiye’de ise pestisit kullanımı Avrupa ülkelerine oranla daha düşük olup, yıllık tüketim miktarı 1 hektarlık alanda 400–700 gramdır [17]. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de etkiledikleri zararlı grubuna göre en çok kullanılan pestisitler sırasıyla, insektisitler, herbisitler ve fungusitlerdir (Şekil 1.2).





**Şekil 1.2.** Etkiledikleri zararlı gruplarına göre pestisitlerin Türkiye’deki kullanım oranları [17]

Şekil 1.3’ de Türkiye'deki pestisit kullanım miktarları verilmiş olup 1990 yılında 18.551 ton civarındaki insektisit kullanımı 1991, 1992, 1993 ve 1994 yıllarında düşme göstermiş, fakat 1995 yılında tekrar 17.383 ton seviyesine yükselmiştir. Herbisitler ise 1990 yılında 6.349 ton civarında iken yıllar geçtikçe tüketim miktarlarının arttığı görülmektedir. Fungisitler için ise tüketim miktarı 6.000 ton civarında seyretmektedir [34].



**Şekil 1.3.** Etkiledikleri zararlı gruplarına göre pestisitlerin Türkiye’deki kullanım miktarları (ton) [34].

Ülkemizde tarım teşkilatları, pestisit kullanımı için alınması gereken önlemler ile ilgili olarak kullanıcıyı bilinçlendirmeye yönelik çalışmalar yapmaktadır. Daha önceden kullanılan, fakat çok zehirli olduğu için kullanımı tamamen yasaklanan ilaçların bir kısmı halen ülkemizde ruhsatlı olarak satılmaktadır [9].

### 1.5. Pestisitlerin Ekosistem Üzerindeki Etkileri

Pestisitlerin kullanımı, bir taraftan tarımda üretimi arttırırken, diğer taraftan bilinçsiz ve hatalı kullanımları sonucunda, hem insan hem de çevre sağlığı üzerinde problem oluşturmaktadır. Pestisitler, tavsiye edilen dozların üzerinde kullanıldıklarında, gereğinden fazla sayıda ilaçlama yapıldığında, gerekmediği halde birden fazla ilaç karıştırılarak kullanıldığında veya son ilaçlama ile hasat dönemi arasında bırakılması gereken süreye uyulmadığı durumlarda, gıdalarda, toprak, su ve havada, kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Yüksek dozda pestisit

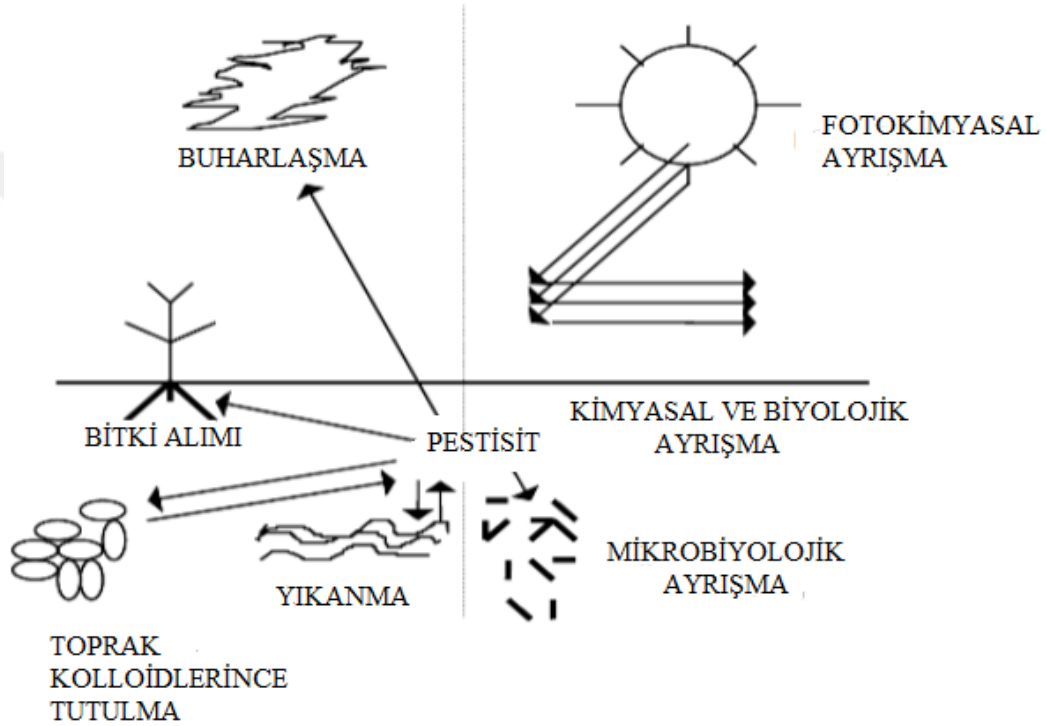
kalıntısı içeren gıdalarla beslenen insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda, akut veya kronik zehirlenmeler olabilmekte, özellikle bazı ürünlerde aroma ve kalite değişimleri meydana gelebilmektedir [1]. Hemen hemen bütün insektisitler spesifik olmadıklarından sadece hedef organizmaları öldürmekle kalmayıp, omurgalı ve omurgasız organizmaları da etkilemektedir [35, 36, 37].

Pestisitlerin canlılar üzerindeki etkileri ilk kez, 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkileri saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü), Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi'ni kurmuşlardır. Bu komitenin çalışmaları sonucu, konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış ve bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Tarımsal pestisit kullanımında, dünya çapındaki tüm otoritelerce kabul edilen maksimum pestisit seviyesi 0,1 µg /l' dir [31]. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunmasına müsaade edilebilir maksimum miktarları, ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir [38]. Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler, hava, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitinin çevredeki durumunu; kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi ve uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir [39].

Pestisitlerin, en önemli yan etkileri arasında;

- i. Kuş, balık, mikroorganizma ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler ve üreme potansiyelinin azalması,
- ii. Hedef olmayan canlılarda pestisitlere karşı dayanıklılık oluşması sonucu, hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
- iii. Ekosistemin yapısının ve türlerin sayısının değişmesi gibi uzun süren etkilere neden olması sayılabilir [39].

Pestisitler toprakta, güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal; bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik ve topraktaki kil ve organik maddeler tarafından adsorplanıp desorplanarak kimyasal degradasyona uğramaktadırlar. Toprağın yapısı, tipi, miktarı, organik madde içeriği, pH' sı ve toprakta bulunan baskın mikroorganizma türleri, tüm bu degradasyon olaylarını etkileyen faktörlerdendir (Şekil 1.4) [38].



**Şekil 1.4.** Pestisitlerin toprak-bitki-çevre sistemindeki davranışları [40].

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında ise, bir kısmı buharlaşma ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilmektedir (Şekil 1.5). Doğrudan suya yapılan uygulamalar sonucunda (sivrisinek mücadelesi gibi) ise pestisitler, su bitkileri veya dip çamurları tarafından tutulmaktadır [41].



Şekil 1.5. Pestisitlerin doğadaki hareketleri [17]

Pestisitlerin toprakta kalıcılığı, pestisit, toprak ve çevre şartlarına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (Çizelge 1.1) [42].

Çizelge 1.1. Pestisitlerin toprakta kalıcılık durumları [42]

Pestisitlerin içerdiği etken maddeler	Toprakta kalma süresi	Kalıcılık durumu
Organik fosforular ve Karbamatlar	1-12 hafta	Kalıcı değil
2,4-D, Atrazin ve diğerleri	1-18 ay	Orta derecede kalıcı
Klorlandırılmış hidrokarbonlular	2-5 yıl	Kalıcı
Civa, arsenik ve kurşun bileşikleri	Hiç bozulmadan devamlı	Devamlı kalıcı

## **1.6. Toprak ve Mikroorganizma ilişkisi**

Toprak yalnızca kum, silt ve kil gibi mineral fraksiyonlarından ve çeşitli ayrışma düzeyindeki çeşitli organik maddelerden oluşmamaktadır. Toprakta hem mikroskopik ve hem de makroskopik nitelikte canlılar yer almaktadır. Çok sayıda bakteri, mantar, alg, virüs, protozoa gibi organizmaların yanısıra, mikroskopik büyüklükteki toprak omurgasızlarından omurgalı canlılara kadar değişen toprak canlıları, karmaşık bir etkileşim içinde toprakta bulunurlar. Toprak, bu canlıların çoğalmaları ve varlıklarını sürdürmeleri için iyi bir gelişme ortamıdır. Bu mikroorganizmalar, toprağın gelişmesinde, kimyasal-fiziksel niteliklerinde ve verimliliği üzerinde büyük rol oynarlar [43].

Duvigneaud [44]' e göre toprak içinde bulunan mikroorganizmalar 5 grupta incelenmiştir.

### **a) Bitkilerin kökleri içindeki mikroorganizmalar**

Organik madde kaynağı olarak diğer bütün organizmalardan daha büyük bir öneme sahiptirler. Bu kökler, toprak mikroorganizmalarına ölü dokular sağlarlar. Bitki kökleri canlıyken topraktaki çözünebilen besinleri alarak bir denge sağladıkları gibi, besin maddelerinin yararlı hale geçmesine de doğrudan etki ederler.

### **b) Algler**

Alglerin çoğu klorofil içeren canlılardır. Bu sebepten dolayı diğer koşulların uygun olması halinde, toprağın yüzeyine yakın bölümünde yaygın olarak bulunurlar. Bazı alg türleri ise gerekli enerjilerinin büyük bir bölümünü organik maddelerden sağladıklarından alt horizonlarda da bulunabilirler.

### **c) Mantarlar**

Mantarlar toprağın yapı maddelerinin değişiminde büyük rol oynarlar. Mantarlar da bakteriler ve aktinomisetler gibi, klorofil içermezler ve bu nedenle de enerji ve

karbon gereksinimleri için organik maddeye ihtiyaç duyarlar. Toprakta bulunan mantarların çoğu küf formunda olup, az sayıda maya formu olanlara da rastlanır.

#### **d) Aktinomisetler**

Nemli ve iyi havalanmayan topraklarda gelişen mikrofloradır. Kurak zamanlarda bazen bakteri ve mantarlara göre daha fazla aktivite gösterirler. Asidik topraklara karşı duyarlı olup, optimum gelişmeleri pH 6.0-7.5 arasındaki topraklarda görülür. Bakterilerden sonra toprakta en fazla sayıda bulunan mikroorganizmalardır. Aktinomisetler organik artıkların çözünmesinde ve besin maddelerinin açığa çıkmasında büyük rol oynar.

#### **e) Bakteriler**

Toprakta çok sayıda bulunan ve bakteri popülasyonunun %90'ını oluşturan cinsler; *Pseudomonas sp*, *Arthrobacter sp*, *Clostridium sp*, *Achromabacter sp*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp* ve *Flavobacterium sp.*'dur.

Farklı toprak tipleri üzerinde yapılmış olan çeşitli araştırmalarda, 1 gram topraktaki bakteri sayısının, yüz bin ile bir milyar arasında değişebildiği saptanmıştır.

Toprak verimliliği, birim alandan alınan ürün ya da sağlanan net kârdır ve toprak kalitesinin bir göstergesidir. Toprak bozuldukça verim azalıyorsa ya da girdiler artarken kârlılık düşüyorsa bu durum, toprak kalitesinin azaldığını işaret eder. Toprak kalitesini belirlemede, son yirmi yıl içinde toprakların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirildiği ve çeşitli verimlilik endekslerinin kullanıldığı parametrik yaklaşımlar ortaya çıkmıştır [45].

Verimli tarım topraklarının bir gramında 2.5 milyon bakteri, 400.000 mantar, 50.000 alg ve 30.000 protozoanın bulunduğu belirtilmektedir [46]. Bitkilerin gereksinimi olan karbon, azot, fosfor, kükürt, demir, magnezyum gibi elementler, mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucunda bitkide yararlı hale çevrilir.

Örneğin; mikroorganizmalar, bitkilerin yararlanamadığı elementel azotu ( $N_2$ =dinitrojen) atmosferden tutarak (fiksasyon) bitkilerin yararlanabileceği formlara çevirir. Karmaşık yapıdaki bitkisel ve hayvansal doku kalıntılarının ayrıştırılması ile bünyede tutulan diğer besin elementleri de bu mineralizasyon süreçleri sonucunda serbest hale geçer. Mikroorganizmaların karbon döngüsüne yapmış oldukları bu katkıyla serbest kalan  $CO_2$ , fotosentez yoluyla bitki dokusunda yeniden regüle olur. Ayrıca topraktaki çeşitli mikroorganizmalar aracılığıyla toprak erozyonu engellenir [43]. Toprak verimliliğinin karakterize edilmesinde, içerdiği organizmaların tür çeşitliliği ve sayıları da önemlidir (Çizelge 1.2) [47, 48].

**Çizelge 1.2.** Verimli bir toprakta bulunan mikroorganizma ve mikrofaunanın yaklaşık sayıları ve biyomas miktarları [48].

<b>ORGANİZMALAR</b>	<b>SAYILAR (g toprakta)</b>	<b>BİYOMAS (Kg/ha)</b>
Bakteriler	$10^8-10^9$	300-3000
Aktinomisetler	$10^7-10^8$	300-3000
Funguslar	$10^5-10^6$	500-5000
Algler	$10^3-10^6$	10-1500
Protozoa	$10^3-10^5$	5-200
Nematodlar	$10^1-10^2$	1-100
Yer solucanları	$10^9$	10-1000
Diğer mikrofauna	$10^8$	1-200

Mikrobiyal hücrelerin pek çoğu toprağın kuruması sırasında ölmektedir. Sadece çevre koşullarına dirençli olan türler, uzun süre kuraklığa dayanabilmektedir. Araştırmalar, mikroorganizma türlerinin kuraklığa karşı farklı direnç ve tepkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır [43].



Toprak mikroorganizmaları toprağın fiziksel ve kimyasal yapısını düzenler, öldürülmeleri ile topraktaki denge bozulur. Pestisitler, topraktaki mikroorganizma faaliyetleri sonucunda parçalanarak zararsız formlara dönüşebilmekte, bazı durumlarda ise mikroorganizmaların doğaya yararlı faaliyetlerini engellemektedir. Örneğin; pestisitler toprak verimliliğini arttırmada önemli rol oynayan solucanların ölmesine neden olmaktadır. Pestisitler, mikrobiyal popülasyonu, metabolik ve fizyolojik aktivitesini değiştirmek yolu ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilirler. Pestisitlerin etkilediği bitkiler, hayvanlar ve diğer mikroorganizmalar dengelerinin bozulması ile farklı bazı durumların ortaya çıkmasına da neden olabilmektedir. Örneğin; bitkilerde uygulanan sentetik pestisitlerin yaprakların stomalarında anomalilere, mezofil dokularında bozulmalara yol açtığı tespit edilmiştir [15]. Yine aynı şekilde tarım ile uğraşan ve pestisitlere maruz kalan bireyler ile kalmayanlar arasında yapılan çalışmalarda, pestisite maruz kalan bireylerde yapısal ve sayısal kromozom aberasyonları ile kardeş kromatid değişiminin yüksek oranlarda tekrarlandığı bildirilmiştir. [49].

### **1.8. Epifitik Mikroflora ve Pestisitler**

Genelde bitkilerin yaprakları, ilk oluştuklarında mikroorganizmalardan yoksundur. Ancak zamanla yaprak yüzeyine değişik mikroorganizmalar gelmekte ve yaşamlarını orada sürdürmektedirler. Yaprak yüzeyi mikroflorası; konak türü, yaprağın yapısı, olgunluk durumu ve bitki örtüsünün yoğunluğu gibi pek çok faktör tarafından etkilenmektedir. Mikroorganizmaların total sayısı ise özellikle sıcaklık ve nem gibi atmosferik koşullara bağlıdır [50]. Bit, böcek salgıları ve polen tozları mikroorganizmaların gelişimini desteklemektedirler. Bu besin kaynaklarını patojenler de kullandığından, yaprak epifitleri ile hastalık etmenleri arasında bir rekabet meydana gelmektedir. Birçok yaprak patojeninin biyolojik kontrolü bu duruma dayanmaktadır [50, 51].

Yaprak yüzeyine uygulanan kimyasalların, yaprağın epifitik mikroflorası üzerine etkileri oldukça değişken ve karmaşıktır [51-54]. Kullanılan fungusitlerin etki spektrumlarına bağlı olarak yaprağın saprofitik mikroflorasında azalmalar ya da

önemli değişimler ortaya çıktığı tespit edilmiştir [55, 56]. Pestisitlerin diğer bir etkisi ise yapılarındaki etken maddenin diğer maddeler ile etkileşerek bitkinin cins, tür ve gelişme devrelerinde değişik fitotoksik etkilerde bulunmasıdır [57]. Pestisitler, bitki yapraklarında birim alandaki stoma dağılımını azaltarak, fotosentez için gerekli gaz alış verişini ve bunun sonucunda bitkinin fotosentez hızını düşürerek metabolik faaliyetlerin yavaşlamasına sebep olmaktadır [58]. Yüksek dozlarda pestisit kullanımı, bitkilerin fotosentez ve transpirasyon gibi işlevlerinin gerçekleştiği yapraklarda da fizyolojik yönden önemli farklılıklara yol açmaktadır [36].

### **1.9. Amaç**

Bu çalışmada, bitki zararlı ve hastalıklarının kontrolünde kullanılan sentetik pestisitler (Basudin 60 EM, Dursban 4, Cupravit OB 21), doğal pestisitler (Bordo bulamacı) ve biyopestisitler (Companion- *Bacillus Subtilis* GB03) yer almaktadır. Tarımsal uygulamalarda kullanılan bu pestisitlerin ekosistemdeki rolü üzerine birçok araştırma bulunmaktadır. Ancak mikrobiyal flora üzerine detaylı araştırmalara rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmada tarımsal uygulamalarda kullanılan bazı sentetik, biyopestisit ve doğal pestisitlerin mikrobiyal flora üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Özellikle; tarım arazilerinden izole edilen bakterilerin pestisitlere duyarlılıkları belirlenerek metabolik aktivitelerindeki değişimlerin ve genetik modifikasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2.MATERYAL VE METOD

### 2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan zirai ilaç uygulanmamış yaprak ve toprak örnekleri; Mersin bölgesi tarım arazileri kapsamında belirlenen 2 istasyondan ( Demirişik Köyü, Kuyuluk) toplanmıştır. Demirişik Köyü, İstasyon A ve Kuyuluk Bölgesi İstasyon B olarak belirlenmiştir (Şekil 2.1, 2.2, 2.3). Demirişik Köyü haritada, 36.952175 enlem ve 34.420696 boylam, Kuyuluk Bölgesi ise 36.763081 enlem ve 34.507137 boylam konumunda gösterilmektedir [59, 60]. Seçilen bölgedeki topraklar; kumlu veya kumlu killi balçık toprağıdır ve toprak reaksiyonu alkalidir (pH:7,0 - 8,0) [61]. Demirişik Köyü mevkinde ormanlık alanlardan alınan toprak örneklerinin pH'sının (7,2–7,7) aralığında hafif alkalen karakterde olduğu bilinmektedir [62].



Şekil 2.1. Toplanan numunelerin istasyon yerleri; A: Demirişik Köyü, B: Kuyuluk Bölgesi [63].



**Şekil 2.2.** Toprak ve yaprak numunelerinin toplandığı Demirişik Köyü, İstasyon A görüntüleri



**Şekil 2.3.** Toprak ve yaprak numunelerinin toplandığı Kuyuluk Bölgesi, İstasyon B görüntüleri

### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kimyasal pestisit olarak Basudin 60 EM (Bayer), Cupravit OB 21 (Bayer) ve Dursban 4 (Dow Agro Sciences); doğal pestisit olarak Bordo Bulamacı (Lenafruit 20 WP); biyolojik pestisit olarak ise Companion (Growth Products) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise şunlardır;  
Nütrient Agar (Oxoid) , Nütrient Broth (Oxoid), sodyum klorür, etanol (% 96), bazik fuksin, lugol, kristal viyole, gliserin Merck firmasından temin edilmiştir.

### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Vorteks (Velp Scientifica), otoklav (Mednif), inkübatör (Labart), pasteur fırın (Elektro-mag), ışık mikroskobu (Olympus), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), hassas terazi (Sartorius).

### 2.1.3. Kullanılan Test Bakterileri

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus spizzenii* ATCC 6633, Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitim A.B.D. Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonundan; *Escherichia coli* KKÜ ve *Salmonella sp.* KKÜ ise Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Merkezi'nden temin edilmiştir.



## 2.2 Metod

### 2.2.1. Toprak ve Yaprak Numunelerinden Bakteri İzolasyonu

Belirlenen istasyonlardan toprak ve yaprak numunelerinin laboratuvara getirilebilmesi için, öncelikle toprak numuneleri alınırken 100/100 cm olarak ölçülen seçilmiş parsellerin üst toprak bölgesi 5 cm derinliğinde kazılmıştır. Steril metal kürek ile alınan bu toprak numuneleri 500 ml'lik steril cam kavanozlar içine toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir [64]. Getirilen topraklar 2 mm gözenekli elekten geçirildikten sonra numunelerden alınan 10 gr toprak örneği steril erlenler içerisine alınmıştır. 1'den 5'e kadar dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu dilüsyon serilerinden 0.1'er ml alınarak Nutrient Agarlı plakların üzerine drigalski özesiyle yayma ekim yapılmıştır (Şekil- 2.4) .



**Şekil 2.4.** Toprak numunelerinden yapılacak bakteri izolasyonunun hazırlık aşaması

Yapraktan izolasyon için istasyon A ve B'de belirlenen bahçelerden numuneler toplanmıştır. İstasyon A'da mevcut 3 bahçede (dalda bir elma, gülden çavuş elma ve şeftali) ve İstasyon 2 de mevcut 1 bahçede (portakal) sağlıklı yaprak taşıyan ağaçlardan steril poşetlere toplanan 500 gr yaprak laboratuvara getirilmiştir. Getirilen yaprak numunelerinden 10 gram tartılarak direkt zenginleştirme ortamına alınmış ve izolasyon için dilüsyona tabi tutulmuştur. Dilüsyon serilerinden 0.1'er ml alınarak Nutrient Agar içeren plakların üzerine drigalski özesiyle yayma ekim yapılmıştır.

Tüm yaprak ve toprak numunelerinden hazırlanan kültürler etüvde 30 °C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden saf kültür eldesi için Nütrient Broth içeren tüplere ekim yapılmıştır. Bu şekilde tarım arazilerinden alınan toprak ve yaprak numunelerinden toplamda 50 bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen saf kültürlerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için gram boyama, spor boyama, hareketlilik testi yapılmış ve koloni morfolojileri incelenmiştir [65]. İleri tanımlama yapılabilmesi için bu izolatlardan en kolay üreyebilen ve yoğun biyomas elde edilebilen 8 izolat seçilmiştir.

### **2.2.2. Moleküler İdentifikasyon Testleri**

Moleküler tanımlama için seçilen 8 izolat Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi’ne gönderilmiştir. Moleküler identifikasyonlar için öncelikle saf olarak verilen numunelerden DNA izolasyonu ve sekans analizleri yapılmıştır. Bu aşamada merkezde yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

1. Thermo Nanodrop 1000 cihazı ile DNA’ların saflık ve miktar tayini yapılmıştır.
2. DNA’lar, Universal 27F/1492R primer çifti ile PCR reaksiyonuna konulmuştur. PCR şartları; DNA 100 ng, 10X Buffer 5 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10 pmol Primer forward 1,5 µl, 10 pmol Primer reverse 1,5 µl, 1U taq DNA polimeraz 0,3 µl, ddH<sub>2</sub>O, toplam hacim 50 µl.  
PCR Programı;
  - a) 94 °C’ de 2 dakika
  - b) 94 °C’ de 20 saniye
  - c) 53 °C’ de 30 saniye
  - d) 72 °C’ de 1 dakika- 2’ye 35 döngü

- e) 72 °C'de 4 dakika
- f) 4 derece sonsuz

3. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel'e yüklenerek görüntülenmiştir.
4. PCR ürünleri sekansı alınmıştır.

A) PCR ürünleri exosap ile temizlenmiştir.

B) Sekans PCR'ı BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i ile yapılmıştır.

C) Sekans PCR'ları sephadex ile temizlenmiştir.

D) Çift yön olarak cihaza yüklenmiştir.

5. Sonuçlar; DNA Dragon ve Finch TV programları ile analiz edilerek tanımlama için NCBI'a yüklenmiştir (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit).

### **2.2.3. Tanımlaması Yapılan Suşların Muhafazası**

Her bir bakterinin Nutrient Agar besiyerine ekilen 24 saatlik saf kültüründen bir öze dolusu alınıp, içerisinde 500 µl %30'luk gliserol ve 500 µl Nutrient Broth bulunan ependorf tüplere aktarılarak karıştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Ayrıca pasajlama yöntemiyle de stoklar hazırlanmıştır. Bunun için de Nutrient Broth'da aktiveleştirilen suşlar yatık agara alınarak + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.4. Kullanılan Pestisitler**

Çalışmada kullanılan pestisitler (sentetik, biyolojik ve doğal) ve özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.



**Çizelge 2.1.** Çalışmada kullanılan sentetik, biyolojik ve doğal pestisitlerin özellikleri

Pestisit Adı	Ürün Grubu	Üretici Firma	CAS No Ürün Kodu	Etken madde	Arazi Dozu	Yüksek Doz
Basudin 60 EM	İnsektisit	Bayer	333- 1-5	Diazinon	0,75ml/ L	12 ml/L
Cupravit OB 21	Fungisit	Bayer	1071-83-6	Bakır oksiklorür	8 mg/ ml	256 mg/L
Dursban 4	İnsektisit (organo-fosforlu)	Dow Agro Sciences	070101	Klorpirifos- etil	1,5 ml/ L	24 ml/L
Bordo Bulamacı	Fungisit	Lenafрут 20 WP	-	Kalsiyum hidroksit ve Bakır(II) Sülfat	15mg/ml	240 mg/ml
Companion ( <i>Bacillus Subtilis</i> GB03)	Biyolojik Fungisit	Growth Products	-	<i>Bacillus Subtilis</i> GB03	0.5 ml/L	16 ml/L

Çalışmadaki pestisitlerin uygulamalarında 3 doz kullanılmıştır. Bunlar; MİK değerleri (MİK denemeleri sonucu elde edilen verilere göre), arazi dozları (etikette bildirilen) ve yüksek dozlar (istasyonların bulunduğu bölgede yapılan uygulamalar kapsamına göre) olarak belirlenmiştir.

### 2.2.5. Pestisitlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Tespiti

Çalışmada kullanılan pestisitlerden sentetik pestisitlerin antibakteriyel özelliklerinin bilinmesine rağmen fungusit olarak piyasada bulunan doğal ve biyopestisitlerin antibakteriyel özellikleri hakkında yeterli bilgiye ulaşılamamıştır. Bu nedenle test edilecek bu pestisitlerin antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kuyu ve disk difüzyon yöntemleri kullanılarak genel inhibisyon etkileri test edilmiştir.

### **2.2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi**

Bu yöntem “Kirby-Bauer Disk Difüzyon Test Protokolü” ne göre uygulanmıştır [66]. Denemelerde aktive edilen test bakterilerinden (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus spizanii* ATCC 6633, *Escherichia coli* KKÜ ve *Salmonella sp.* KKÜ ) 100 µl alınıp Nutrient Agara drigalski özesiyle yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Whatman No:1 kağıtları 5-6 mm’lik diskler halinde hazırlanarak steril edilmiş ve her birine 100 µl olacak şekilde emdirilen pestisitlerle (arazi doz ve yüksek doz) hazırlanan diskler plaklara yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zonlar şeffaf cetvel kullanılarak mm cinsinden ölçülmüştür. Bu yöntem 5 adet test bakterisi için ayrı ayrı yapılmıştır [67].

### **2.2.5.2. Kuyu Difüzyon Yöntemi**

Denemelerde kullanılan test bakterileri aktifleştirilip Nutrient Agara ekimi yapıldıktan sonra plaklara 7-8 mm çapında kuyular açılmıştır. Her bir kuyunun içerisine 100 µl pestisit (arazi doz ve yüksek doz) eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zonlar şeffaf cetvel kullanılarak mm cinsinden ölçülmüştür. Bu yöntem 5 adet test bakterisi için ayrı ayrı yapılmıştır [68].

### **2.2.6. Test mikroorganizmalarının Pestisitlere Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi: MİK tayini**

Çalışmada kullanılan pestisitlerin MİK konsantrasyonlarının belirlenmesi için mikrodilüsyon denemeleri yapılmıştır. Mikrodilüsyon denemeleri için U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Buradaki kuyucukların içine 100 µl Nutrient Broth, 50 µl test edilecek bakteri kültürü ve farklı konsantrasyonlara denk gelecek şekilde pestisitler ilave edilmiştir. Her bir pestisit için farklı konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir [69, 70].

### 2.2.7. Pestisitlerin Mikrobiyal Floraya Etkisinin Tespiti

Pestisitlerin mikrobiyal flora ya etkisine yönelik olarak, metabolik aktivitelerdeki değişimler baz alınmıştır. Bu nedenle mevcut izolatların içinden yaprak-toprak numunelerinin aynı istasyonlardan olmasına dikkat edilerek indikatör 3 suş seçilmiştir. Bu suşlar; *Bacillus cereus* DY6, *Micrococcus yunnanensis* DT1 ve *Bacillus tequilensis* DT2'tir.

#### 2.2.7.1. Toprak ve Yaprak İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarına Pestisitlerin Etkisi

Seçilen 3 suş Nutrient Broth'da 24 saat boyunca 37 °C'lik etüvde inkübe edilmiş ve 0.5 Mac Farland'a uygun bulanıklıkta kültür elde edilmiştir.

Kontrol grubu için; 3 ml'lik Nutrient Broth'a aktifleştirilen suşlardan 100'er µl eklenmiş ve 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Seçilen 3 suş ile MİK'de kullanılan test bakterileri karşılaştırılıp her bir pestisite en uygun MİK değeri seçilmiştir. Pestisitlerden arazi dozu stoğu, MIC stoğu ve yüksek doz stoğu hazırlanıp milipordan geçirilmiş ve steril ependorf tüplere alınmıştır. Daha sonra hazırlanan 3 ml'lik Nutrient Broth'a; pestisit stoklarından hesaplanan miktarlarda pestisitler ve seçilen 3 suştan 100'er µl eklenerek, 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Pestisit içeren besiyerleriyle hazırlanan bu kültürlerden Nutrient Agar içeren plaklara drigalski özesiyle ekim yapılmış ve antibiyotik diskleri steril bir pens yardımı ile ortama yerleştirilmiştir. 30 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zonlar şeffaf cetvel kullanılarak mm cinsinden ölçülmüştür. Suşlara ait duyarlılık tespitinde 6 çeşit antibiyotik diski kullanılmıştır. Bu diskler penicillin (10U), tetracycline (30 µg), ampicillin (10 µg), gentamycin (120 µg), erythromycin (15 µg) ve vancomycin (30 µg)'dir. Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda elde edilen zon çapları, Çizelge 2.2'deki verilere göre değerlendirilmiştir (NCCLS, 2011 ve CA-SFM, 2007).

**Çizelge 2.2.** Antibiyotik duyarlılık sonucu referans olarak alınan zon çapları  
(NCCLS, 2011 ve CA-SFM, 2007)

Antibiyotik diskler	Disk İçeriği	Zon Çapları (mm)		
		Dirençli	Orta	Duyarlı
Penicillin	10 units	≤14	-	≥15
Tetracycline	30 µg	≤14	15–18	≥19
Ampicillin	10 µg	≤16	-	≥17
Gentamycin	120 µg	<11	11 -16	≥17
Erythromycin	15 µg	≤13	14–22	≥23
Vancomycin	30 µg	≤14	15–16	≥17

#### 2.2.7.2. Toprak ve Yaprak İzolatlarının Üremesine Pestisitlerin Etkisi

Pestisitlerin bakteri üremesine etkisini belirlemek amacıyla antibiyotik duyarlılıklarında en fazla değişim gösteren suş seçilmiştir. Bu suş *Bacillus tequilensis* DT2'dir. *Bacillus tequilensis* DT2 suşu, Nutrient Broth'da 24 saat boyunca 37 °C'lik etüvde inkübe edilmiş ve 0.5 Mac Farland'a uygun bulanıklıkta kültür elde edilerek kontrol grubu oluşturulmuştur.

Deneme gruplarında da test edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılığını en fazla değiştiren sentetik pestisit cupravit (yüksek doz), doğal pestisit bordo bulamacı (arazi=MİK ve yüksek doz) ve biyopestisit companion (MİK dozu) *Bacillus tequilensis* DT2 suşuna uygulanmıştır.

0., 2., 4., 6., 8., 10., 26., 28. ve 50. saatlerdeki her bir tüpten 100 µl alınarak Nutrient Agarlı plakların üzerine drigalski özesiyle yayma ekim yapılarak, 30 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerin 24 saat sonunda bakteri sayımları yapılarak generasyon sayısı (bakteri popülasyonunda meydana gelen her bölünme) ve generasyon süreleri (iki generasyon arasında geçen zaman) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [71].

$$n = \frac{\log b - \log a}{\log 2} \qquad g = \frac{t \times \log 2}{\log b - \log a}$$

n= Generasyon sayısı

g= Generasyon süresi

a= Başlangıçtaki mikroorganizma sayısı

b= Süre sonundaki mikroorganizma sayısı

t= Aradan geçen zaman

### 2.2.7.3. Genetik Modifikasyonların Tespiti

Genetik modifikasyonların tespitinde metabolik aktivitelerden antibiyotik duyarlılıkta ve bakteri üremesinde en fazla değişikliğin tespit edildiği pestisit olan bordo bulamacı, indikatör pestisit olarak seçilmiştir. Bu nedenle 100'er ml otoklavlanmış Nutrient Agara bordo bulamacının hesaplanan uygun Arazi=MİK dozu ve yüksek dozu ilave edilmiştir. Aktifleştirilmiş *Bacillus cereus* DY6, *Micrococcus yunnanensis* DT1 ve *Bacillus tequilensis* DT2 suşları, öze yardımıyla tek koloni düşürülecek şekilde bordo bulamaçlı ortama ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler, inkübasyon sonucunda oluşan kolonilerin genetik modifikasyonlarının tespiti için Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama Ve Araştırma Merkezi'ne gönderilmiştir. Merkezde bakteri tanımlama için yapılan işlemler tekrarlanmıştır. Buna göre önceki ve sonraki sonuçlar karşılaştırılarak modifikasyonlar tespit edilmiştir.

### 3.ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Toprak ve Yapraftan Elde Edilen İzolatların İdentifikasyonları

Numuneleri topladığımız 2 istasyonda toplam 4 bahçeden alınan toprak ve yaprak örneklerinden elde edilen 50 izolatin biyoşimik test sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

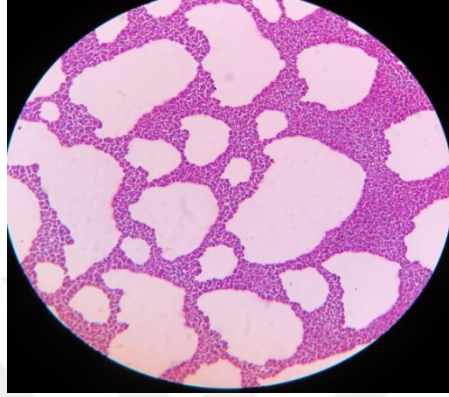
**Çizelge 3.1.** Toprak ve yaprak numunelerinden izole edilen saf kültürlerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolat Kodu	İstasyon Adı	Koloni Morfolojisi	Koloni Rengi	Gram Özelliği	Hareketlilik	Hücre Şekli	Spor Boyama
DY1	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY2	İstasyon B	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY3	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY4	İstasyon B	S Tipi	Sarı	Gr (-)	-	Kok	-
DY5	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY6	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY7	İstasyon B	S Tipi	Sarı	Gr (-)	-	Kok	-
DY8	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY9	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY10	İstasyon B	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY11	İstasyon B	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY12	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY13	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY14	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DY15	İstasyon B	S Tipi	Sarı	Gr (-)	-	Kok	-
DY16	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT1	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT2	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+

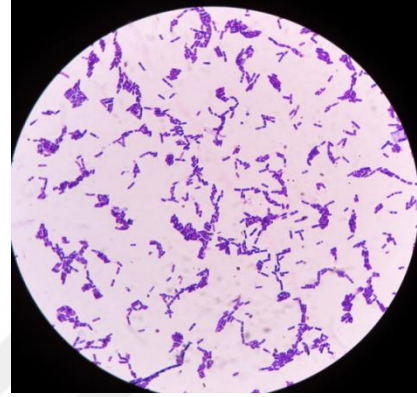
**Çizelge 3.1. (devam)**

DT3	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT4	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT5	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT6	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT7	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT8	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT9	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT10	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT11	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT12	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT13	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT14	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT15	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	+
DT16	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT17	İstasyon A	S tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT18	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT19	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT20	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT21	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT22	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT23	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT24	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT25	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT26	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT27	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT28	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT29	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT30	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT31	İstasyon A	S Tipi	Sarı	Gr (+)	-	Kok	-
DT32	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT33	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+
DT34	İstasyon A	R Tipi	Beyaz	Gr (+)	-	Basil	+

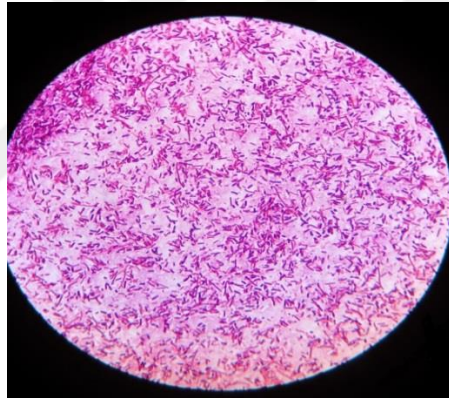
Çizelge 3.1’de toplam 3 adet Gram negatif bakteri, 47 adet Gram pozitif bakteri, 30 adet sporlu bakteri, 50 adet hareketsiz bakteri, 30 adet R tipi koloni ve 20 adet S tipi koloni listelenmiştir. Bu izolatlardan seçilen 8 suşun gram boyama sonuçları ve koloni morfolojileri Şekil 3.1’de verilmiştir.



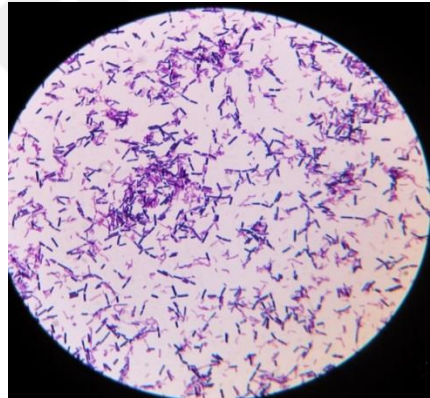
*Micrococcus yunnanensis* DT1



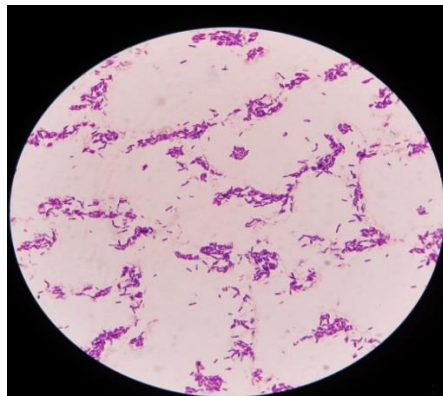
*Bacillus tequilensis* DT2



*Bacillus invictae* DY1



*Bacillus cereus* DY2



*Bacillus subtilis* DY3



*Cellulosimicrobium* sp. DY4

Şekil 3.1. İzolatlardan seçilen 8 suşun morfolojileri





*Bacillus subtilis* DY5



*Bacillus cereus* DY6

**Şekil 3.1. (devam)**

İzolatlardan seçilen 8 suşun Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi kapsamında yapılan 16S ribozomal RNA'ya dayalı tür tayini sonuçları Çizelge 3.2'de, dizi analizi sonuçları ise EK.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** İzole edilen 8 suşun 16S ribozomal RNA'ya dayalı yapılan tür tayini sonuçları

Suş Kodu	İstasyon Adı ve İzolat Yeri	EMBL/Gen Bank No	Tür Adı
DY1	İstasyon 1 Yaprak	KT720227.1	<i>Bacillus invictae</i>
DY2	İstasyon 2 Yaprak	KJ801578.1	<i>Bacillus cereus</i>
DY3	İstasyon 1 Yaprak	HQ678662.1	<i>Bacillus subtilis</i>
DY4	İstasyon 2 Yaprak	KC117526.1	<i>Cellulosimicrobium</i> <i>sp.</i>

**Çizelge 3.2. (devam)**

DY5	İstasyon 1 Yaprak	KT720017.1	<i>Bacillus subtilis</i>
DY6	İstasyon 1 Yaprak	KT719870.1	<i>Bacillus cereus</i>
DT1	İstasyon 1 Toprak	KT719656.1	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
DT2	İstasyon 1 Toprak	KT720350.1	<i>Bacillus tequilensis</i>

### **3.2 Çalışmada Kullanılan Pestisitlerin Antibakteriyel Etkilerinin Belirlenmesi**

Antibakteriyel etkilerin tespitinde sentetik (Basudin 60 EM, Cupravit OB 21, Dursban 4) biyolojik (Companion (*B. Subtilis* GB03)) ve doğal (Bordo Bulamacı) pestisitlerin test mikroorganizmaları (*P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *B. spizenii* ATCC 6633, *E. coli* KKÜ ve *Salmonella sp.* KKÜ ) üzerine olan etkileri disk ve kuyu yöntemiyle belirlenmiş ve sonuçları karşılaştırılarak Çizelge 3.3’de verilmiştir. Çizelge 3.3’de görüldüğü üzere pestisitlerin konsantrasyonları arttıkça test edilen mikroorganizmaların duyarlılıklarında artış gözlenmiştir. Kuyu ve disk difüzyonuna göre pestisitlerin test mikroorganizmalar üzerine inhibisyonlarının sütun grafikleri Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

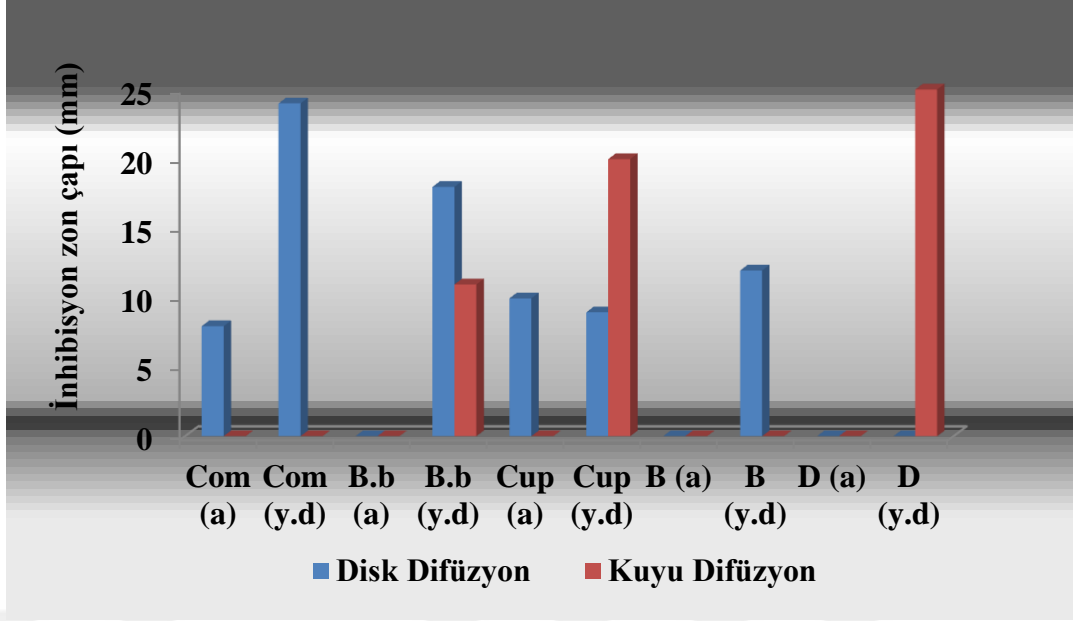
**Çizelge 3.3.** Sentetik, biyolojik ve doğal pestisitlerin test mikroorganizmalarıyla yapılan kuyu ve disk yöntemiyle belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)

Pestisit adı	Test Mikroorganizmaları				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. spizenii</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp</i>
Componion (disk-arazi)	8 ± 0.03	-	10 ± 0.00	-	8 ± 0.03
Componion (disk- yüksek doz)	24 ± 0.02	10 ± 0.01	-	-	10 ± 0.01
Componion (kuyu- arazi)	-	-	-	-	12 ± 0.00
Componion (kuyu- yüksek doz)	-	-	19 ± 0.02	-	-
Bordo Bulamacı (disk-arazi)	-	-	7 ± 0.01	9 ± 0.02	-
Bordo Bulamacı (disk- yüksek doz)	18 ± 0.01	21 ± 0.00	27 ± 0.02	22 ± 0.01	12 ± 0.02
Bordo Bulamacı (kuyu- arazi)	-	12 ± 0.01	-	8 ± 0.03	-
Bordo Bulamacı (kuyu- yüksek doz)	11 ± 0.00	20 ± 0.02	30 ± 0.00	20 ± 0.02	38 ± 0.02
Cupravit OB 21 (disk-arazi)	10 ± 0.04	10 ± 0.02	-	-	-

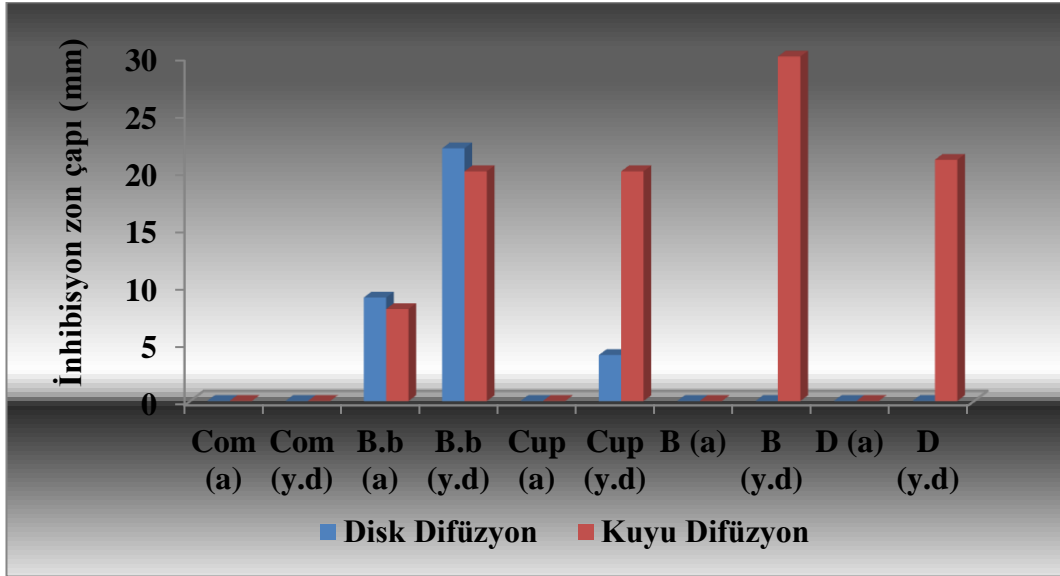
**Çizelge 3.3. (devam)**

Cupravit OB 21 (disk- yüksek doz)	9 ± 0.01	9 ± 0.02	-	4 ± 0.03	-
Cupravit OB 21 (kuyu- arazi)	-	-	-	-	10 ± 0.00
Cupravit OB 21 (kuyu- yüksek doz)	20 ± 0.02	-	10 ± 0.00	20 ± 0.03	21 ± 0.03
Basudin 60 EM (disk- arazi)	-	-	10 ± 0.02	-	-
Basudin 60 EM (disk- yüksek doz)	12 ± 0.01	21 ± 0.01	30 ± 0.02	-	10 ± 0.02
Basudin 60 EM (kuyu- arazi)	-	-	-	-	14 ± 0.01
Basudin 60 EM (kuyu- yüksek doz)	-	24 ± 0.00	40 ± 0.01	30 ± 0.00	12 ± 0.03
Dursban 4 (disk-arazi)	-	14 ± 0.01	-	-	-
Dursban 4 (disk- yüksek doz)	-	14 ± 0.02	29 ± 0.02	-	14 ± 0.02
Dursban 4 (kuyu- arazi)	-	12 ± 0.00	-	-	-
Dursban 4 (kuyu- yüksek doz)	25 ± 0.00	17 ± 0.01	32 ± 0.02	21 ± 0.02	36 0.03

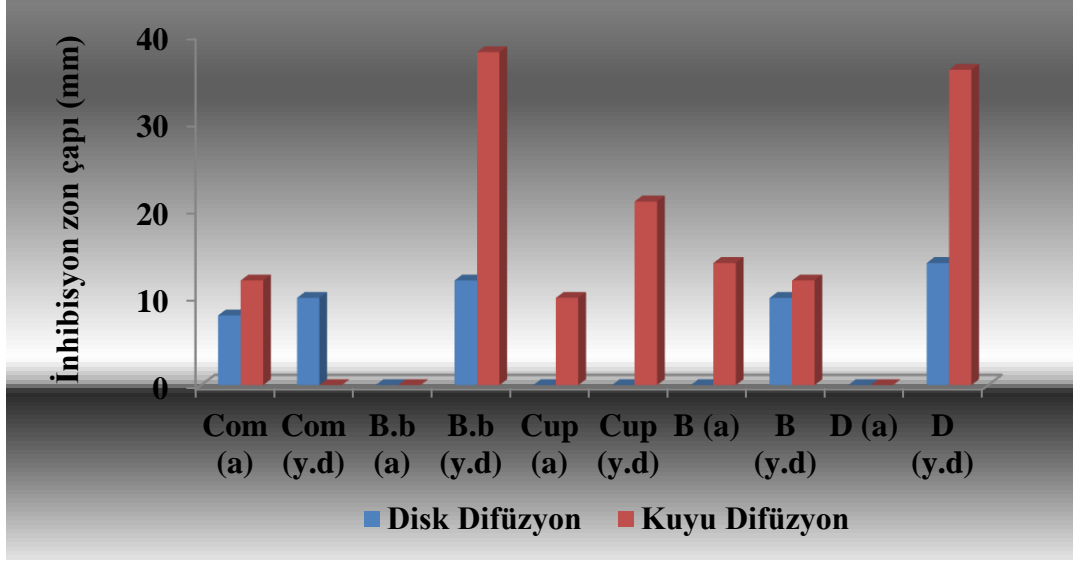
(-): İnhibisyon yok



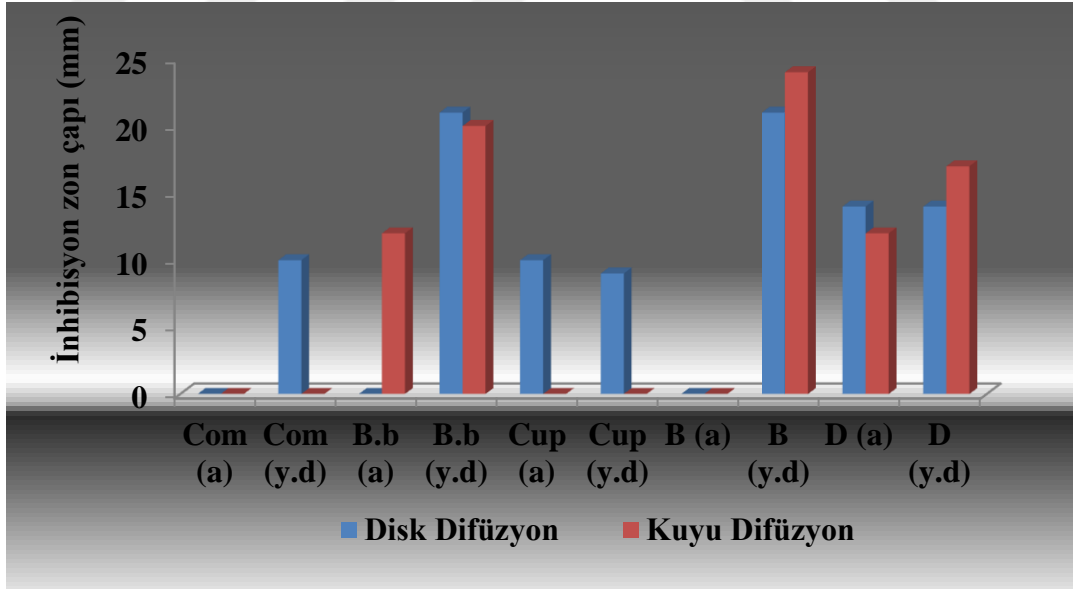
**Şekil 3.2.** Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin *P. aeruginosa* üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği (Com: Companion, B.b: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4, (a): Arazi doz, (y.d): Yüksek doz)



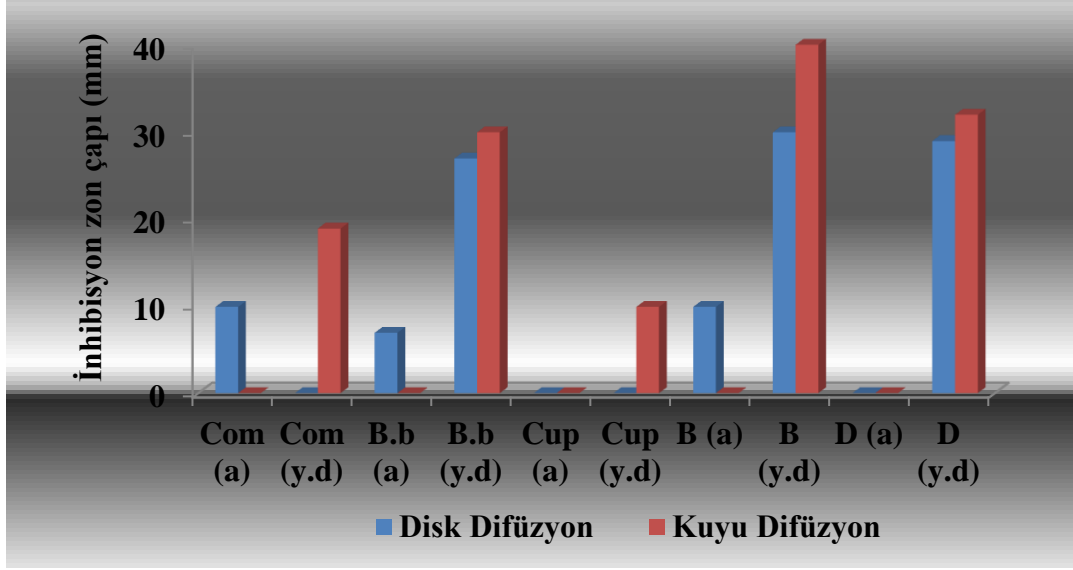
**Şekil 3.3.** Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin *E. coli* üzerine sütun grafiği (Com: Companion, B.b: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4, (a): Arazi doz, (y.d): Yüksek doz)



**Şekil 3.4.** Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin *Salmonella sp.* üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği (Com: Componion, B.b: Bordo bulamacı, Cup: Cupravıt OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4, (a): Arazi doz, (y.d): Yüksek doz)



**Şekil 3.5.** Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin *S. aureus* üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği (Com: Componion, B.b: Bordo bulamacı, Cup: Cupravıt OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4, (a): Arazi doz, (y.d): Yüksek doz)



**Şekil 3.6.** Kuyu ve disk yöntemine göre pestisitlerin *B. spizenii* üzerine inhibisyonlarının sütun grafiği (Com: Companion, B.b: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4, (a): Arazi doz, (y.d): Yüksek doz)

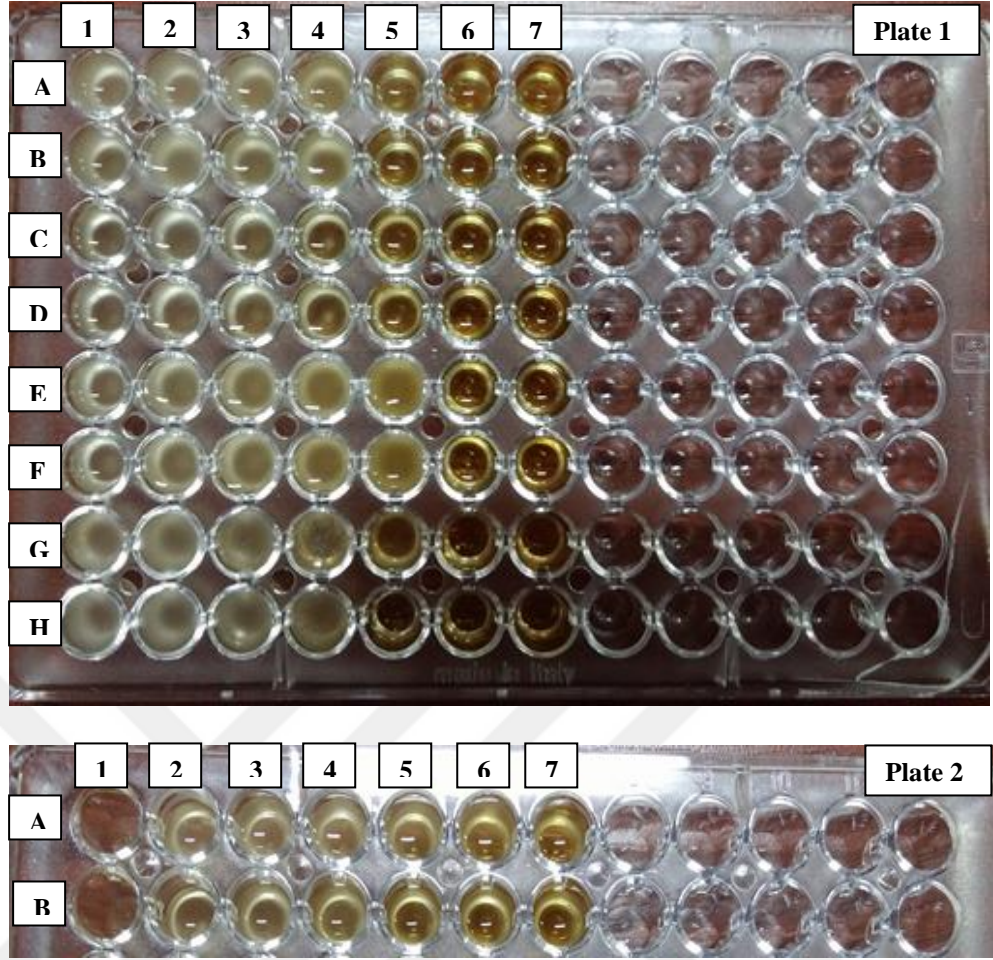
### 3.3 Test Mikroorganizmalarının Pestisitlere Duyarlılıklarının Belirlenmesi: MİK Tayini

Pestisitlerin test mikroorganizmaları üzerindeki Minimum inhibisyon gösterdiği konsantrasyonlar (MİK) Çizelge 3.4’de verilmiş ve Companion’a (biyolojik pestisit) ait MİK görüntüsü ise Şekil 3.7’de verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Pestisitlerin test mikroorganizmaları üzerindeki MİK konsantrasyonları

Test Mikroorganizmaları	Pestisitler				
	Biyolojik Pestisit	Doğal Pestisit	Sentetik Pestisitler		
	Companion	Bordo Bulamacı	Basudin 60 EM	Cupravit OB 21	Dursban 4
<i>Escherichia coli</i> (KKÜ)	12 ml/L	10 mg/ml	3ml/L	128 mg/ml	-
<i>Pseudomonas aeeruginosa</i> ATCC 9027	12 ml/L	13 mg/ml	0.70 ml/L	5 mg/ ml	3 ml/L
<i>Salmonella sp.</i> (KKÜ)	8 ml/L	15 mg/ml	0.65 ml/L	256 mg/ml	24 ml/L
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2 ml/L	15 mg/ml	0.55 ml/L	6.5 mg/ml	3 ml/L
<i>Bacillus spizenii</i> ATCC 6633	12 ml/L	15 mg/ml	3 ml/L	128 mg/ml	24 ml/L





**Şekil 3.7.** Companion (Biyolojik pestisit) konsantrasyonunun MİK görüntüsü

(Plate 1: A-B: *Salmonella sp.*, C-D: *E. coli*, E-F: *P. aeruginosa*,

G-H: *B. spizeni* (1.kuyucuk: 0.5 ml/L; 2.kuyucuk : 1 ml/L;

3.kuyucuk: 2 ml/L; 4.kuyucuk: 4 ml/L; 5. kuyucuk:8 ml/L;

6.kuyucuk: 12 ml/L; 7.kuyucuk: 16 ml/L)

(Plate 2: A-B: *S. aureus* (1.kuyucuk: 0.5 ml/L; 2.kuyucuk : 1 ml/L;

3.kuyucuk: 2 ml/L; 4.kuyucuk: 4 ml/L; 5. kuyucuk:8 ml/L;

6.kuyucuk: 12 ml/L; 7.kuyucuk: 16 ml/L) )

Denemeler sonucunda doğal pestisit olan bordo bulamacının MİK dozunun arazide uygulanan doz olduğu tespit edilirken, sentetik pestisitlerden Dursban'ın MİK değeri arazi dozundan yüksek bulunmuştur.

### **3.4. Toprak ve Yapraktan İzole Edilen Suşların Metabolik Aktiviteleri Üzerine Pestisitlerin Etkisi**

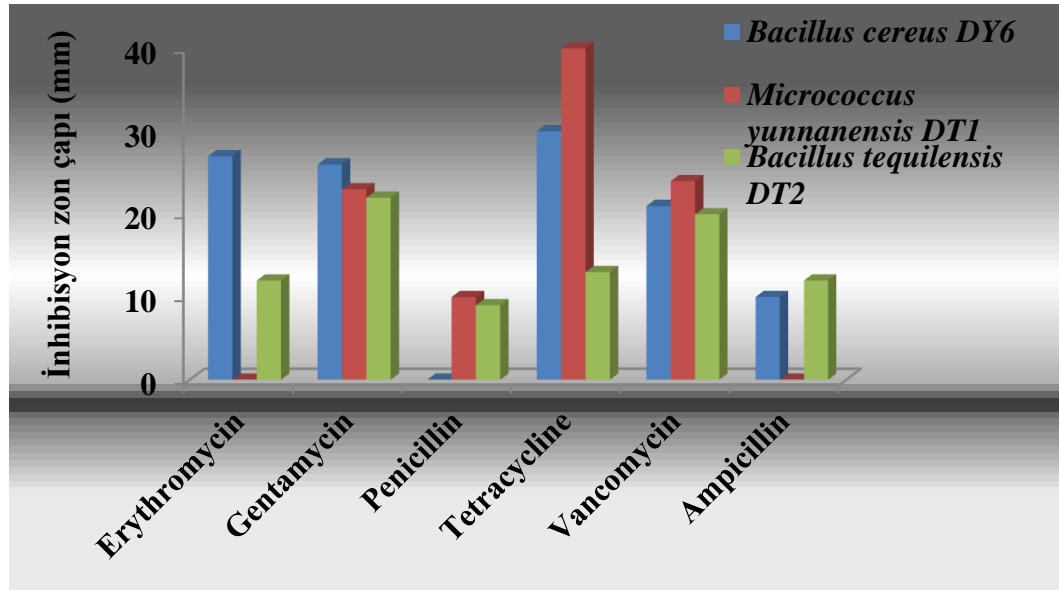
#### **3.4.1. Antibiyotik Duyarlılıklarına Etkisi**

Çalışmamızda mevcut izolatların içinden yaprak-toprak numunelerinin aynı istasyonlardan olmasına dikkat edilerek seçilen *Bacillus cereus* DY6, *Micrococcus yunnanensis* DT1 ve *Bacillus tequilensis* DT2 suşlarının pestisitli ortamlarda hazırlanmış kültürlerine ve kontrol grubuna test edilecek antibiyotik diskleri (Penicillin, Tetracycline, Ampicillin, Gentamycin, Erythromycin ve Vancomycin) yerleştirilmiştir. Elde edilen veriler NCCLS, (2011) ve CA-SFM, (2007)' e göre değerlendirilmiştir. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.8'de kontrol gruplarına ait veriler gösterilirken Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8'de pestisitle kültüre edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları sonuçları verilmiştir. Ayrıca *Bacillus cereus* DY6'un Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14'de; *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20'de ve *Bacillus tequilensis* DT2'in Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26'da kontrole göre değişimleri grafiklerle gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Kontrol grubu olarak *Bacillus cereus* DY6, *Micrococcus yunnanensis* DT1 ve *Bacillus tequilensis* DT2'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı- mm)

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Kontrol Grubu (<i>Bacillus cereus</i> DY6)</b>	<b>Kontrol Grubu (<i>Micrococcus yunnanensis</i> DT1)</b>	<b>Kontrol Grubu (<i>Bacillus tequilensis</i> DT2)</b>
Erythromycin	27 ± 0.02	-	12 ± 0.01
Gentamycin	26 ± 0.03	23 ± 0.02	22 ± 0.03
Penicillin	-	10 ± 0.01	9 ± 0.02
Tetracycline	30 ± 0.02	40 ± 0.00	13 ± 0.02
Vancomycin	21 ± 0.03	24 ± 0.01	20 ± 0.03
Ampicillin	10 ± 0.01	-	12 ± 0.01

(-): İnhibisyon yok



Şekil 3.8. Kontrol grubu olarak *Bacillus cereus* DY6, *Micrococcus yunnanensis* DT1 ve *Bacillus tequilensis* DT2'in antibiyotiklere duyarlılığının sütun grafiği ile gösterimi

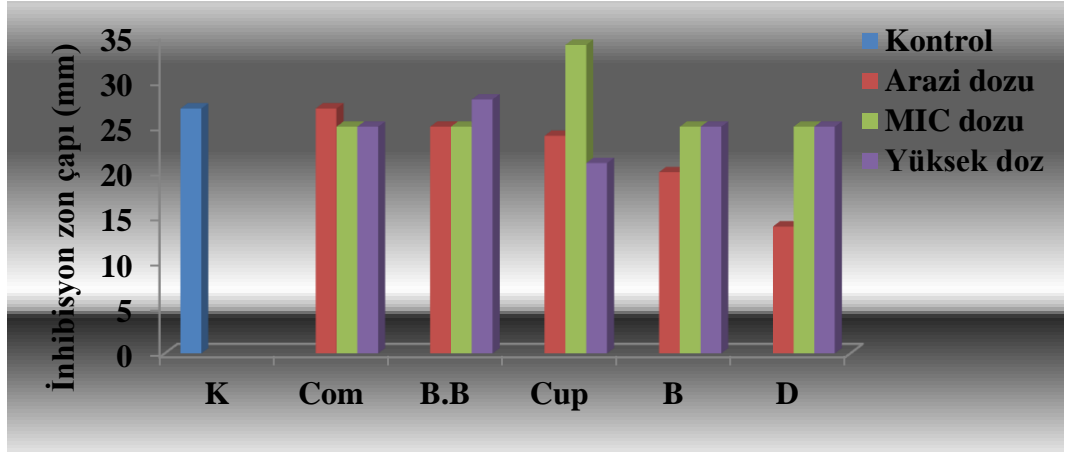
Çizelge 3.6. Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm)

Pestisitler	Antibiyotikler	Arazi dozu	MİK dozu	Yüksek doz
<b>Companion</b> ( <i>Bacillus Subtilis</i> GB03)	Erythromycin	27 ± 0.01	25 ± 0.02	25 ± 0.02
	Gentamycin	24 ± 0.02	28 ± 0.00	25 ± 0.00
	Penicillin	-	-	-
	Tetracycline	27 ± 0.02	32 ± 0.01	30 ± 0.02
	Vancomycin	18 ± 0.03	19 ± 0.02	23 ± 0.00
	Ampicillin	-	9 ± 0.03	8 ± 0.02
<b>Bordo bulamacı</b>	Erythromycin	25 ± 0.02		28 ± 0.00
	Gentamycin	20 ± 0.03		27 ± 0.01
	Penicillin	-		16 ± 0.02
	Tetracycline	29 ± 0.00		37 ± 0.02
	Vancomycin	17 ± 0.01		23 ± 0.01
	Ampicillin	-		15 ± 0.03

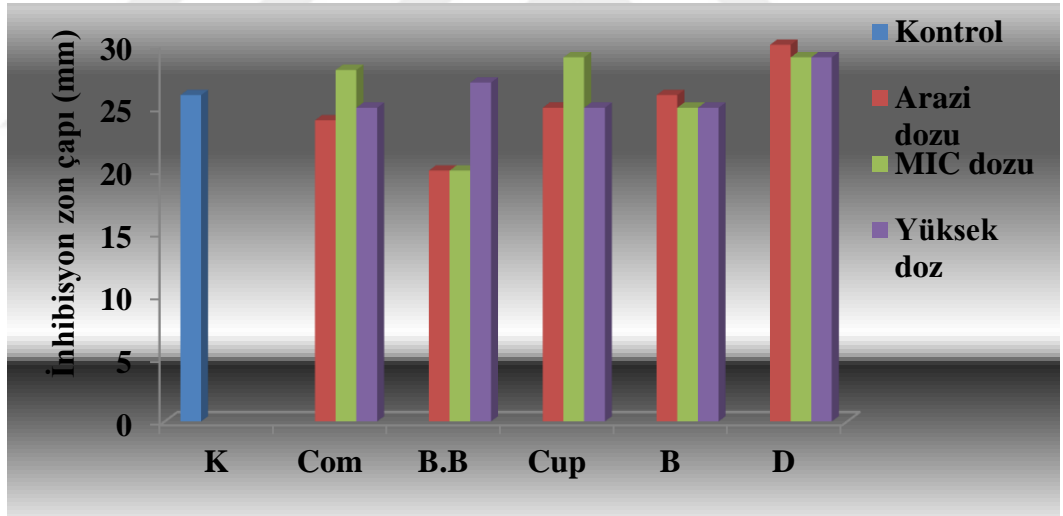
**Çizelge 3.6. (devam)**

<b>Dursban 4</b>	Erythromycin	14 ± 0.01	25 ± 0.01	
	Gentamycin	30 ± 0.00	29 ± 0.02	
	Penicillin	10 ± 0.01	16 ± 0.03	
	Tetracycline	22 ± 0.02	35 ± 0.02	
	Vancomycin	24 ± 0.03	24 ± 0.00	
	Ampicillin	-	14 ± 0.01	
<b>Basudin 60 EM</b>	Erythromycin	20 ± 0.01	25 ± 0.01	25 ± 0.02
	Gentamycin	26 ± 0.02	25 ± 0.01	25 ± 0.00
	Penicillin	-	10 ± 0.03	15 ± 0.02
	Tetracycline	34 ± 0.01	31 ± 0.00	35 ± 0.00
	Vancomycin	27 ± 0.02	20 ± 0.02	24 ± 0.01
	Ampicillin	9 ± 0.01	-	15 ± 0.03
<b>Cupravit OB 21</b>	Erythromycin	24 ± 0.01	34 ± 0.00	21 ± 0.01
	Gentamycin	25 ± 0.02	29 ± 0.01	25 ± 0.03
	Penicillin	-	10 ± 0.02	16 ± 0.02
	Tetracycline	38 ± 0.03	32 ± 0.03	42 ± 0.01
	Vancomycin	29 ± 0.02	22 ± 0.01	22 ± 0.00
	Ampicillin	10 ± 0.03	10 ± 0.02	15 ± 0.01

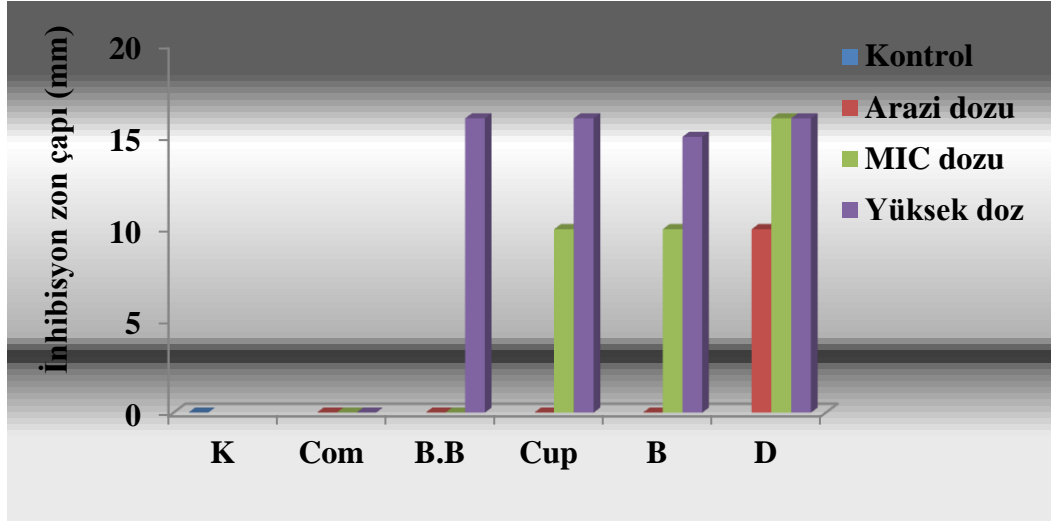
(-): İnhibisyon yok



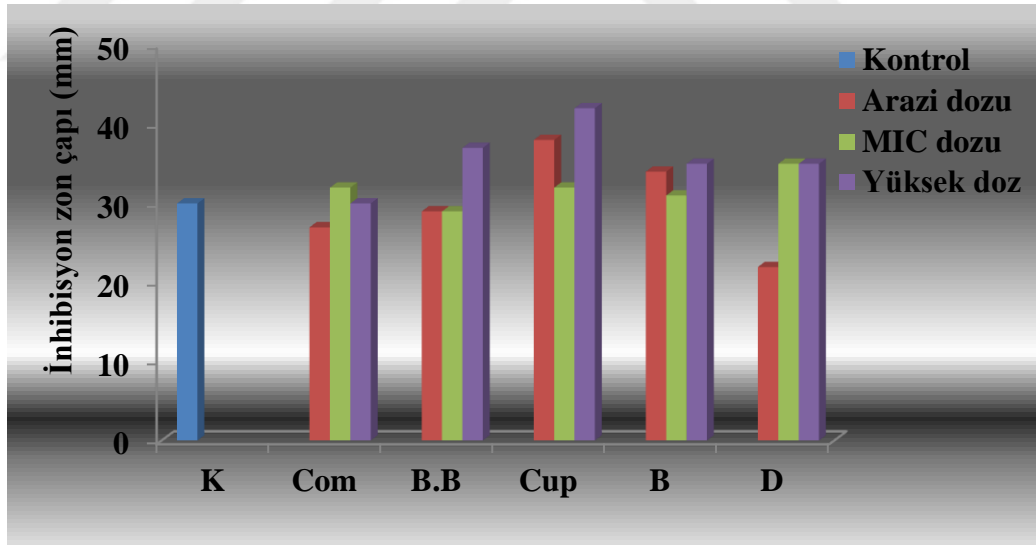
**Şekil 3.9.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



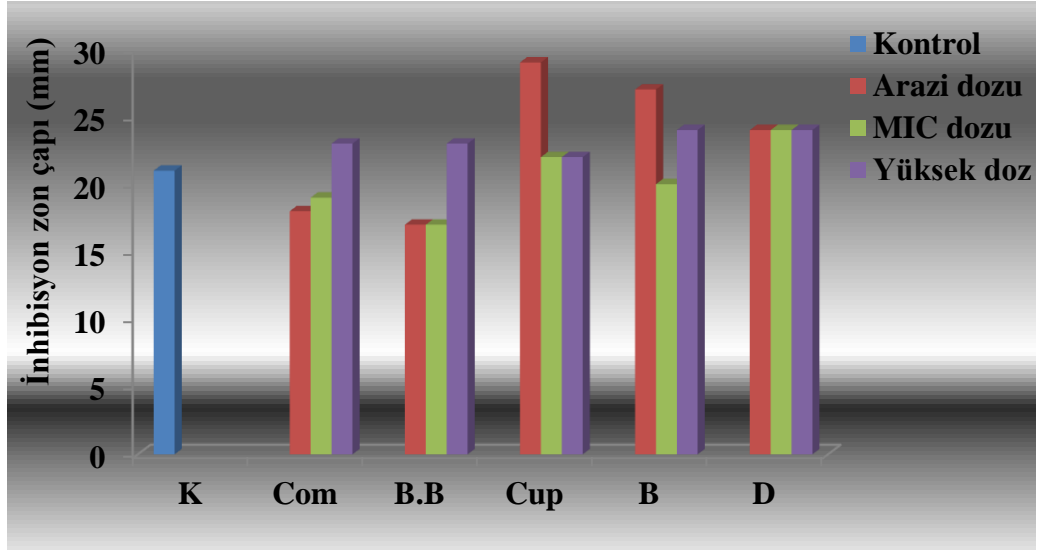
**Şekil 3.10.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



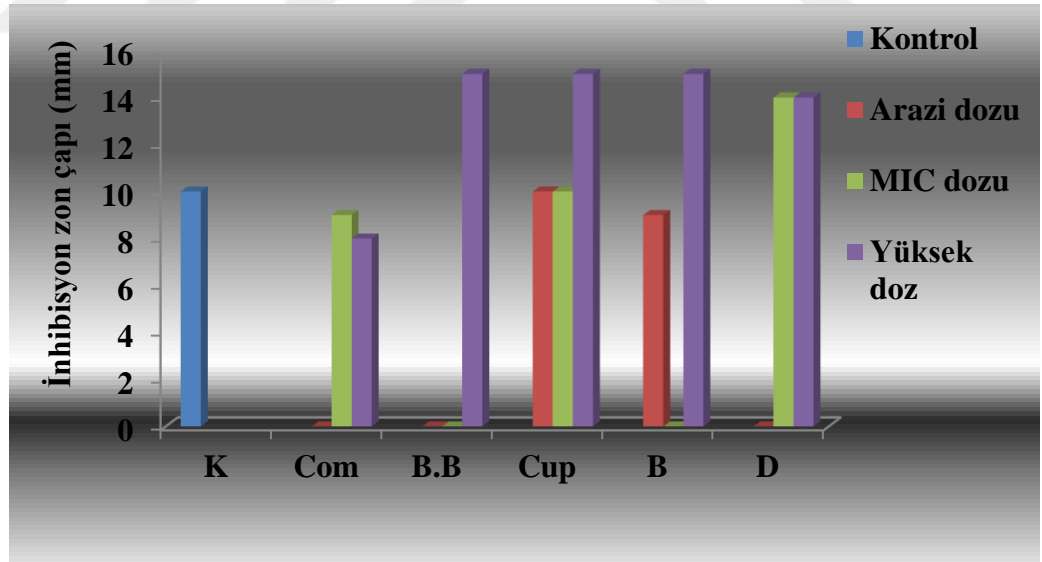
**Şekil 3.11.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.12.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Tetracyclin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.13.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.14.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



*Bacillus cereus* DY6'un pestisitlerle kültürasyonundan sonra Erythromycin'e karşı duyarlılıklarının kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Bununla beraber Cupravit'in yüksek dozu, Basudin'in arazi dozu ve Dursban'ın arazi dozu uygulamalarından sonra ise bu suşun NCCLS (2011) ve CA-SFM (2007) verilerine göre orta dirençli sınıfta yer aldığı anlaşılmış ve Tetracycline, Vancomycin, Gentamycin'e karşı duyarlılıklarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Penicillin'in NCCLS (2011) ve CA-SFM (2007) verilerine göre kontrol grubu dirençli sınıfta iken; Bordo bulamacının yüksek dozu, Dursban'ın MİK=yüksek dozu, Cupravit'in yüksek dozu ve Basudin'in yüksek dozu uygulamalarından sonra duyarlı sınıfta yer aldığı görülmüştür. Ampicillin'e karşı duyarlılıklarının ise kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir.

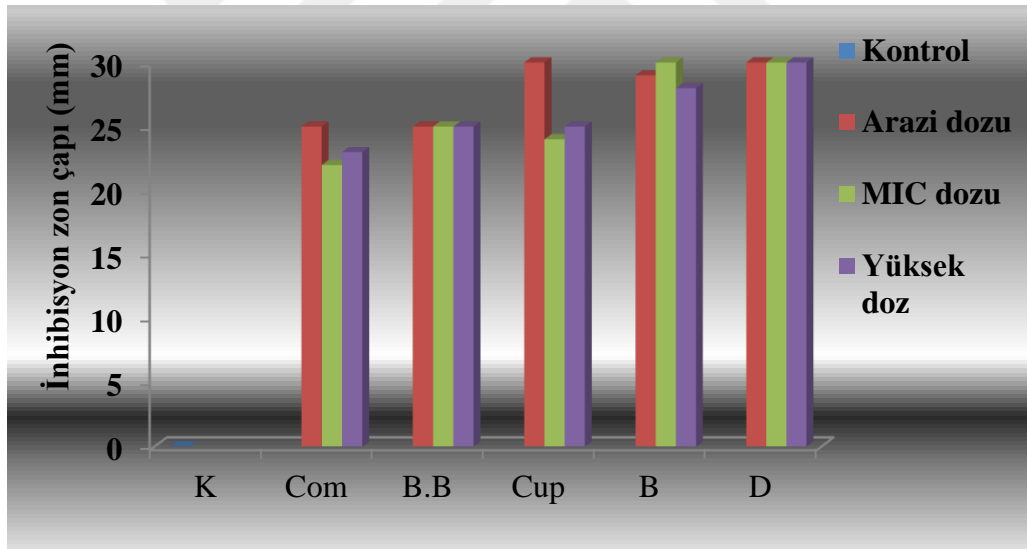
**Çizelge 3.7.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm)

Pestisitler	Antibiyotikler	Arazi dozu	MİK dozu	Yüksek doz
<b>Componion</b> ( <i>Bacillus Subtilis</i> GB03)	Erythromycin	25 ± 0.02	22 ± 0.01	23 ± 0.01
	Gentamycin	22 ± 0.01	42 ± 0.00	26 ± 0.02
	Penicillin	30 ± 0.03	29 ± 0.01	20 ± 0.02
	Tetracycline	45 ± 0.01	26 ± 0.02	40 ± 0.01
	Vancomycin	22 ± 0.01	27 ± 0.01	26 ± 0.02
	Ampicillin	-	15 ± 0.03	25 ± 0.03
<b>Bordo bulamacı</b>	Erythromycin	25 ± 0.01		25 ± 0.01
	Gentamycin	21 ± 0.02		30 ± 0.03
	Penicillin	27 ± 0.02		17 ± 0.01
	Tetracycline	43 ± 0.00		42 ± 0.00
	Vancomycin	27 ± 0.01		27 ± 0.03
	Ampicillin	18 ± 0.03		22 ± 0.01
<b>Dursban 4</b>	Erythromycin	30 ± 0.02	30 ± 0.02	
	Gentamycin	27 ± 0.01	30 ± 0.01	
	Penicillin	41 ± 0.00	33 ± 0.02	
	Tetracycline	42 ± 0.03	48 ± 0.00	
	Vancomycin	28 ± 0.02	25 ± 0.01	
	Ampicillin	43 ± 0.00	22 ± 0.02	

**Çizelge 3.7. (devam)**

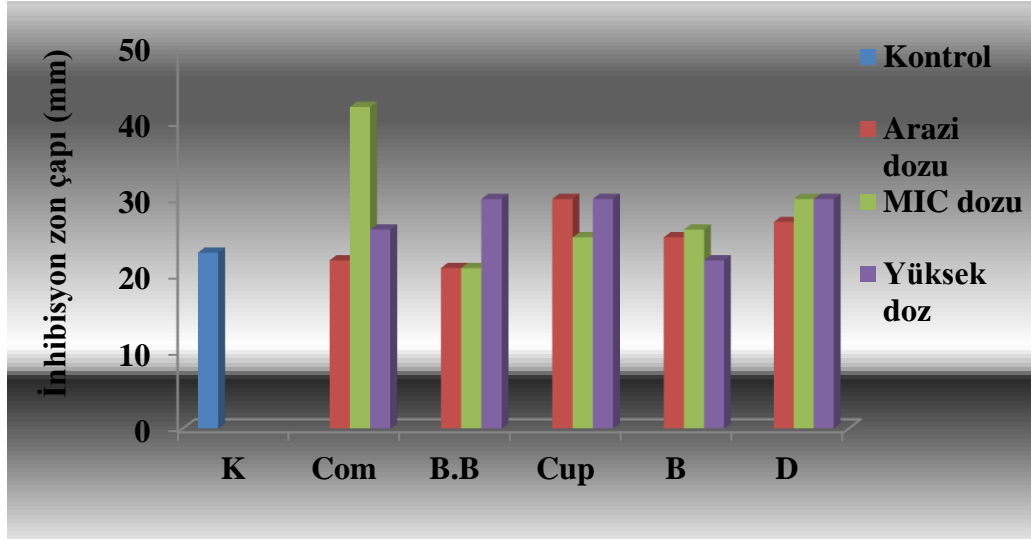
<b>Basudin 60 EM</b>	Erythromycin	29 ± 0.00	30 ± 0.01	28 ± 0.02
	Gentamycin	25 ± 0.01	26 ± 0.02	22 ± 0.01
	Penicillin	48 ± 0.00	49 ± 0.00	29 ± 0.01
	Tetracycline	43 ± 0.02	47 ± 0.02	38 ± 0.00
	Vancomycin	25 ± 0.02	24 ± 0.01	25 ± 0.03
	Ampicillin	36 ± 0.01	40 ± 0.01	18 ± 0.02
<b>Cupravit OB 21</b>	Erythromycin	30 ± 0.00	24 ± 0.01	25 ± 0.02
	Gentamycin	30 ± 0.01	25 ± 0.02	30 ± 0.02
	Penicillin	47 ± 0.00	9 ± 0.03	21 ± 0.03
	Tetracycline	43 ± 0.01	30 ± 0.02	30 ± 0.02
	Vancomycin	28 ± 0.03	20 ± 0.00	26 ± 0.01
	Ampicillin	45 ± 0.03	9 ± 0.01	26 ± 0.03

(-): İnhibisyon yok

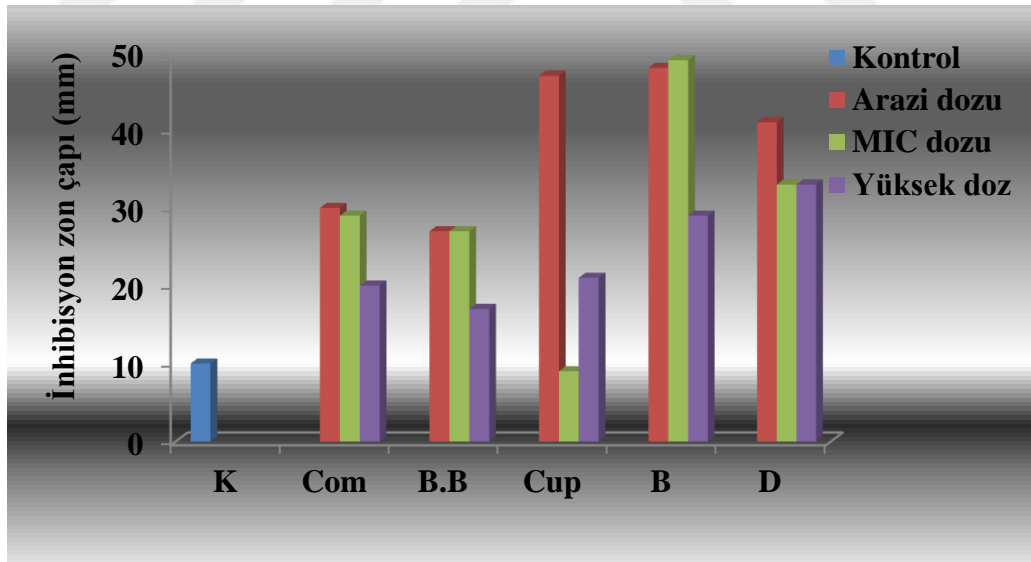


**Şekil 3.15.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in

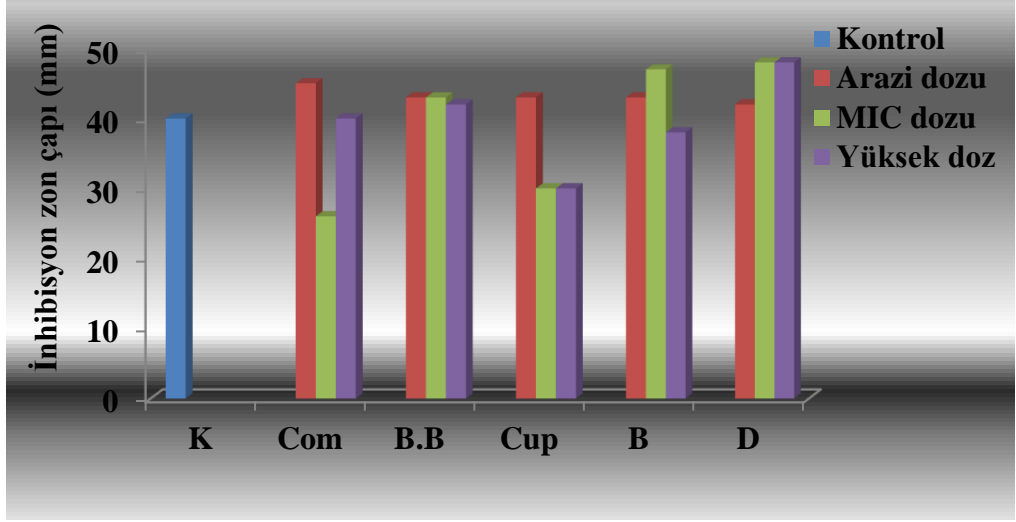
Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



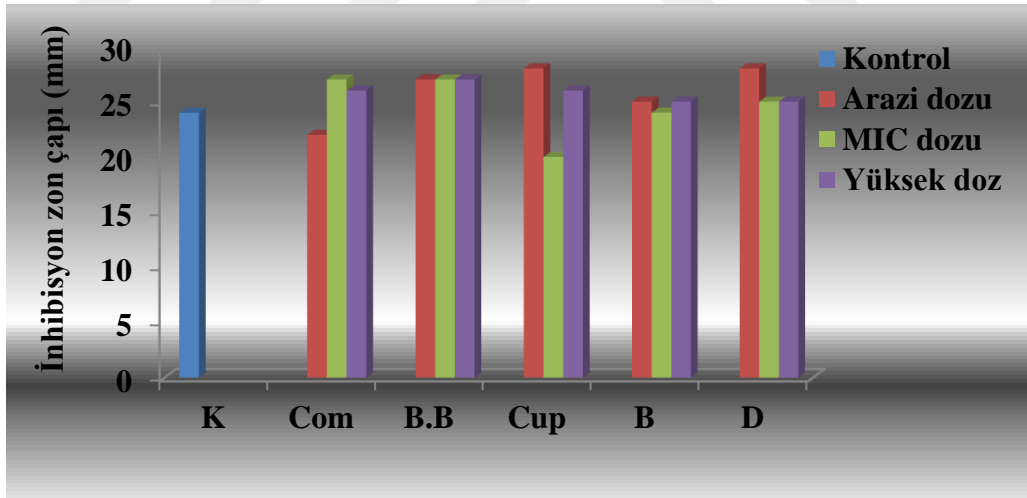
**Şekil 3.16.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



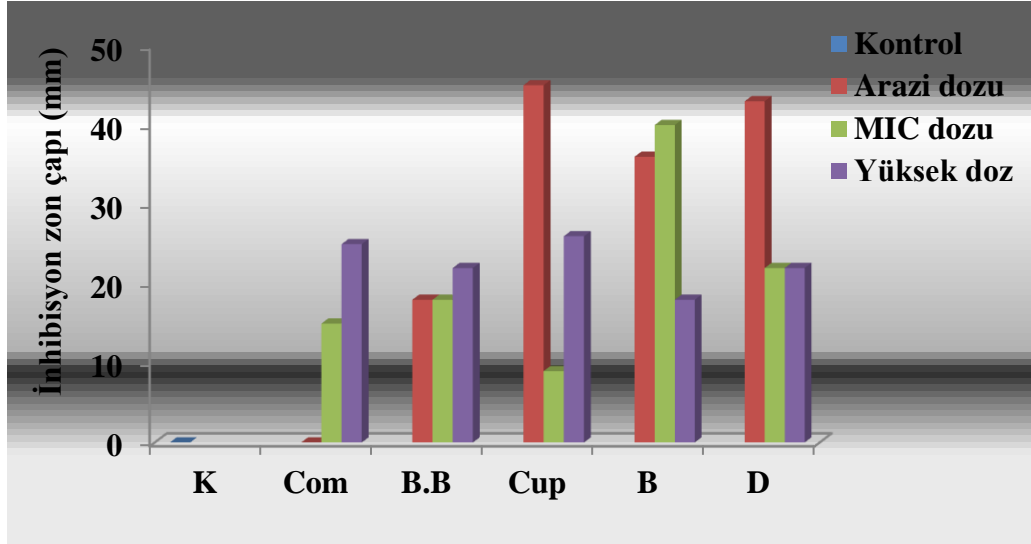
**Şekil 3.17.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.18.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Tetracyclin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravıt OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.19.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Componion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravıt OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



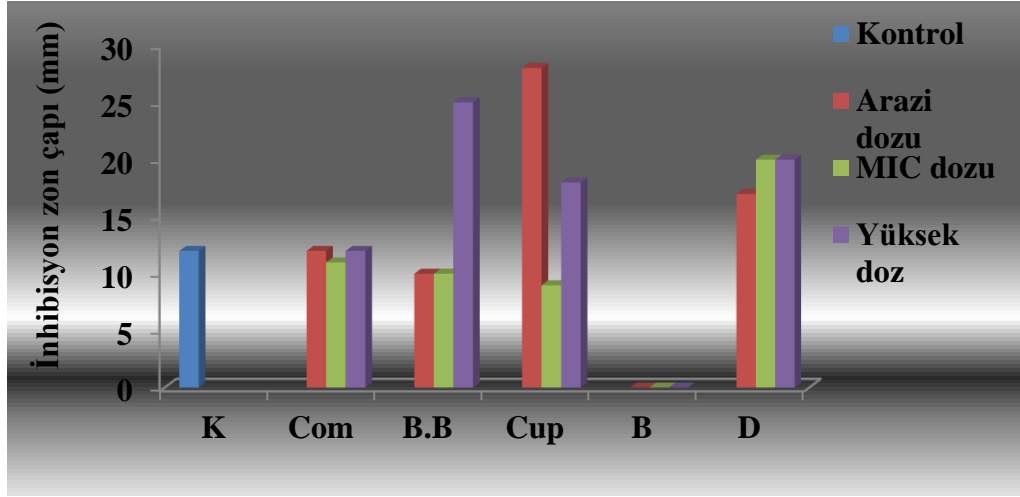
**Şekil 3.20.** Pestisitlerle kültüre edilen *Micrococcus yunnanensis* DT1'in Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravıt OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)

*Micrococcus yunnanensis* DT1'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra Tetracycline, Vancomycin, Gentamycin ve Erythromycin'e karşı duyarlılıklarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. NCCLS (2011) ve CA-SFM (2007) verilerine göre *Micrococcus yunnanensis* DT1 için Penicillin'in kontrol grubu ve Cupravıtın MİK dozu dirençli sınıfında iken, diğer pestisit konsantrasyonları duyarlılık sınıfında tespit edilmiştir. Ampicilin'de ise kontrol grubu, Companion'un arazi dozu, MİK dozu ve Cupravıtın MİK dozu *Micrococcus yunnanensis* DT1 için dirençli sınıfında yer alırken diğer pestisit konsantrasyonları duyarlılık sınıfında yer almıştır.

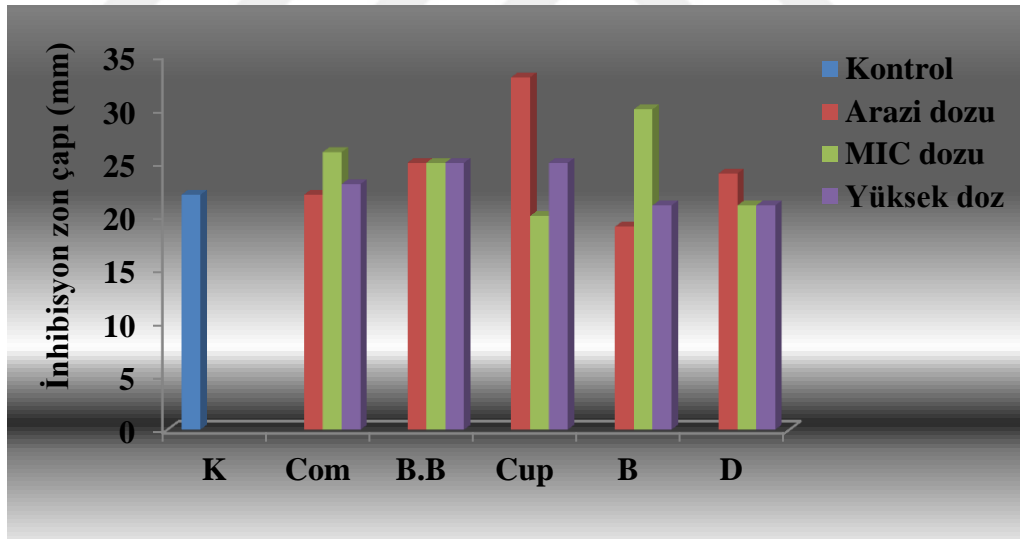
**Çizelge 3.8.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı-mm)

Pestisitler	Antibiyotikler	Arazi dozu	MİK dozu	Yüksek doz
<b>Componion</b> ( <i>Bacillus Subtilis</i> GB03)	Erythromycin	12 ± 0.02	11 ± 0.02	12 ± 0.01
	Gentamycin	22 ± 0.01	26 ± 0.01	23 ± 0.02
	Penicillin	11 ± 0.03	11 ± 0.02	8 ± 0.03
	Tetracycline	14 ± 0.00	12 ± 0.03	13 ± 0.01
	Vancomycin	20 ± 0.01	21 ± 0.01	20 ± 0.01
	Ampicillin	9 ± 0.03	8 ± 0.01	-
<b>Bordo bulamacı</b>	Erythromycin	10 ± 0.01		25 ± 0.03
	Gentamycin	25 ± 0.03		25 ± 0.01
	Penicillin	-		31 ± 0.00
	Tetracycline	15 ± 0.02		40 ± 0.01
	Vancomycin	19 ± 0.01		27 ± 0.03
	Ampicillin	12 ± 0.03		23 ± 0.01
<b>Dursban 4</b>	Erythromycin	17 ± 0.03	20 ± 0.02	
	Gentamycin	24 ± 0.01	21 ± 0.03	
	Penicillin	-	31 ± 0.01	
	Tetracycline	18 ± 0.01	-	
	Vancomycin	21 ± 0.03	22 ± 0.01	
	Ampicillin	-	22 ± 0.02	
<b>Basudin 60 EM</b>	Erythromycin	-	-	-
	Gentamycin	19 ± 0.01	30 ± 0.01	21 ± 0.01
	Penicillin	10 ± 0.03	9 ± 0.02	9 ± 0.03
	Tetracycline	12 ± 0.01	14 ± 0.01	30 ± 0.00
	Vancomycin	20 ± 0.02	21 ± 0.02	20 ± 0.03
	Ampicillin	8 ± 0.01	10 ± 0.03	-
<b>Cupravit OB 21</b>	Erythromycin	28 ± 0.02	9 ± 0.01	18 ± 0.01
	Gentamycin	33 ± 0.01	20 ± 0.02	25 ± 0.03
	Penicillin	-	8 ± 0.03	23 ± 0.01
	Tetracycline	44 ± 0.01	16 ± 0.02	33 ± 0.00
	Vancomycin	27 ± 0.02	18 ± 0.01	22 ± 0.01
	Ampicillin	21 ± 0.01	-	20 ± 0.02

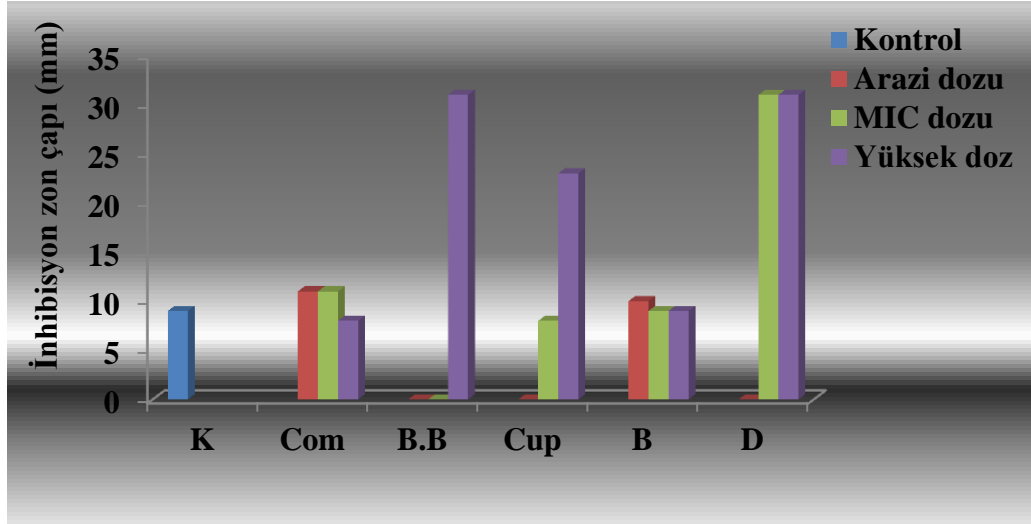
(-): İnhibisyon yok



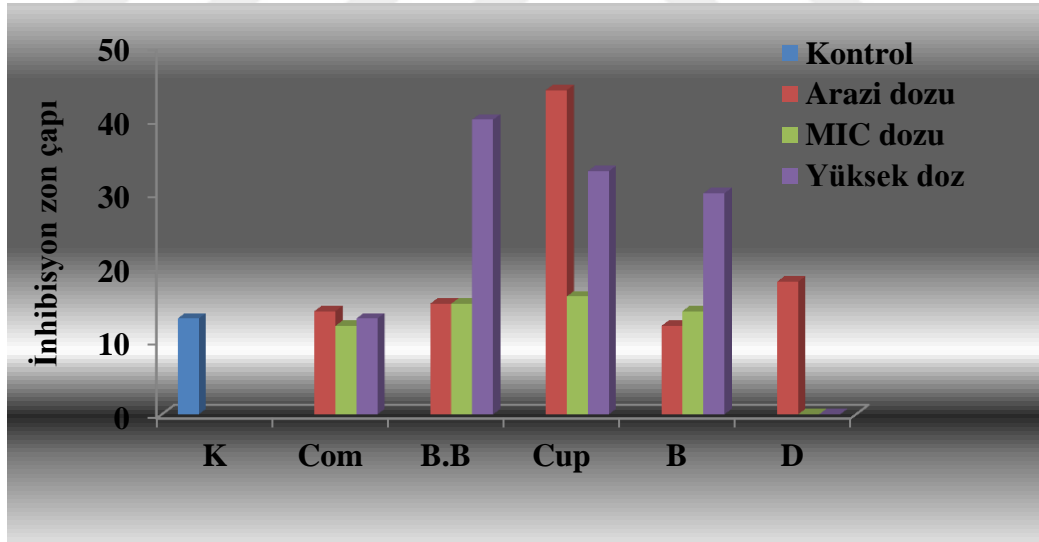
**Şekil 3.21.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Erythromycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.22.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Gentamycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)

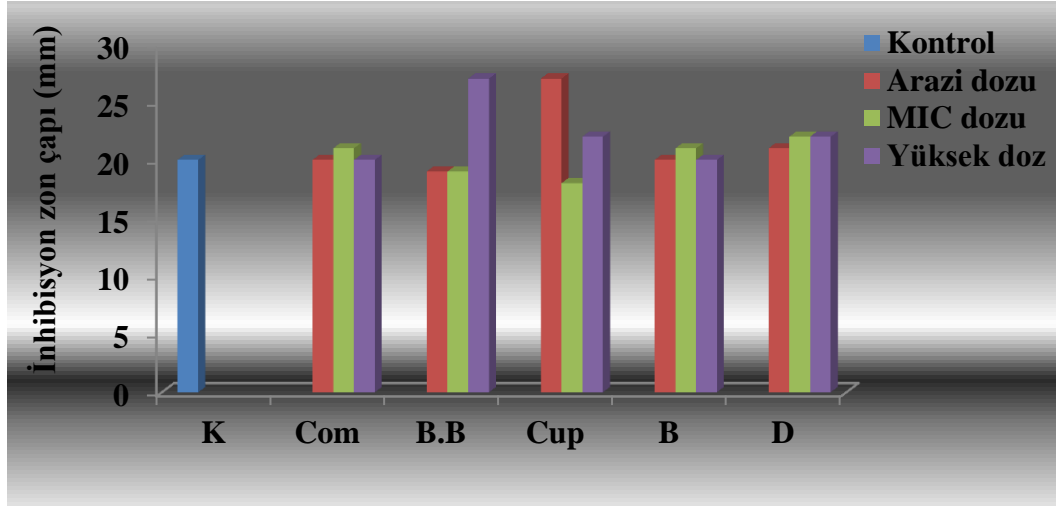


**Şekil 3.23.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Penicillin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)

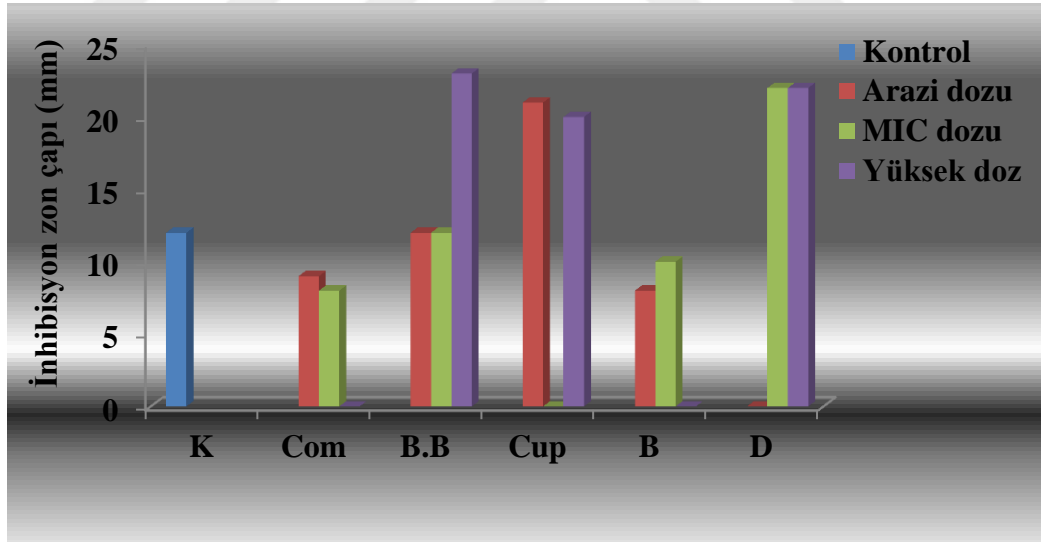


**Şekil 3.24.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Tetracycline'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravit OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)





**Şekil 3.25.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Vancomycin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravat OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)



**Şekil 3.26.** Pestisitlerle kültüre edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in Ampicilin'e ait antibiyotik duyarlılıklarındaki değişim (K: Kontrol, Com: Companion, B.B: Bordo bulamacı, Cup: Cupravat OB 21, B: Basudin 60 EM, D: Dursban 4)

*Bacillus tequilensis* DT2'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra Vancomycin, Gentamycin'e karşı duyarlılıklarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. NCCLS (2011) ve CA-SFM (2007) verilerine göre *Bacillus tequilensis* DT2 için Penicillin ve Ampicilin'in kontrol grubu dirençli sınıfında iken Bordo bulamacının yüksek dozu, Cupravit'in yüksek dozu ve Dursban'ın MİK=yüksek dozu duyarlılık sınıfında yer almıştır. *Bacillus tequilensis* DT2 için ise Erythromycin'in kontrol grubu dirençli sınıfında iken Bordo bulamacının yüksek dozu ve Cupravit'in arazi dozu duyarlılık sınıfında yer almıştır.

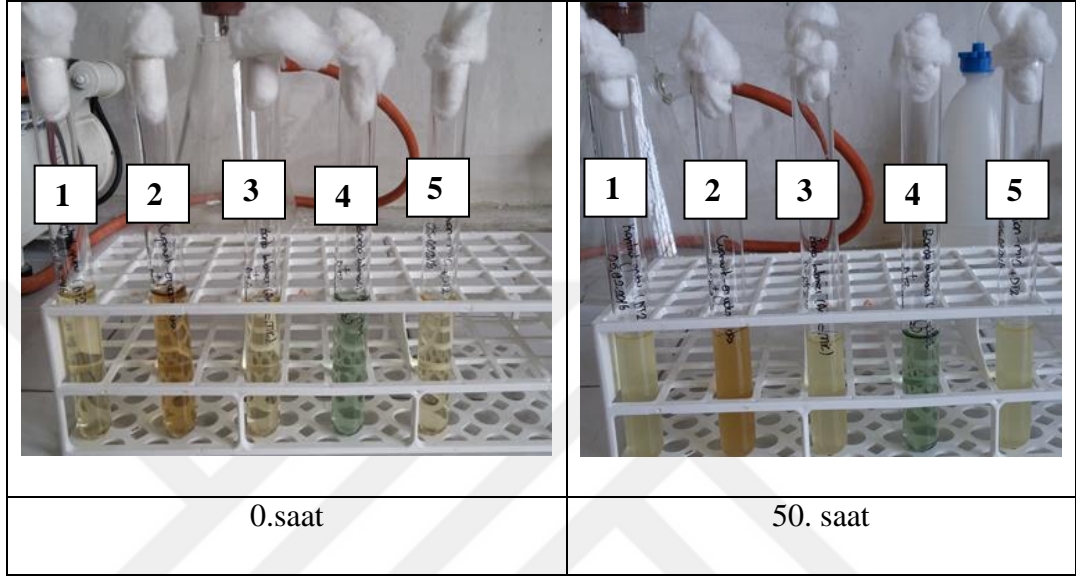
### 3.4.2. Toprak ve Yapraktan İzole Edilen Suşların Üremesine Pestisitlerin Etkisi

Pestisitlerin bakteri üremesine etkisini belirlemek amacıyla, antibiyotik duyarlılıklarında en fazla değişim gösteren suş olan *Bacillus tequilensis* DT2 seçilmiştir. Bu suş sentetik pestisitlerden Cupravit, doğal pestisitlerden Bordo bulamacı ve biyopestisitlerden Componionla kültüre edildikten sonra, generasyon süre ve sayılarının değiştiği tespit edilmiş ve pestisitlerin üremeye etkisi belirlenerek Çizelge 3.9'da verilmiştir.

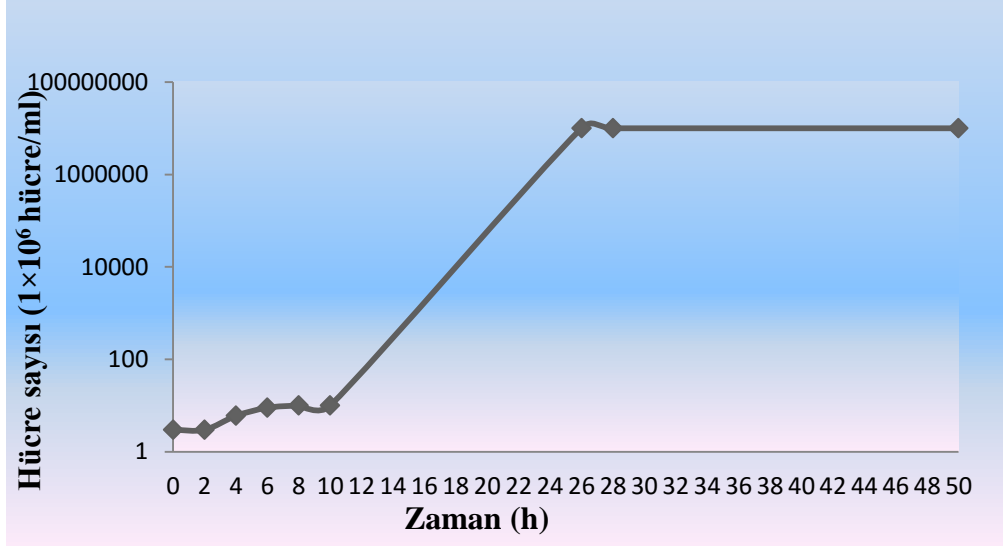
**Çizelge 3.9.** *Bacillus tequilensis* DT2'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra belirlenen generasyon sayıları ve süreleri

	<b>Generasyon sayısı</b>	<b>Generasyon süresi</b>
<b>Kontrol Grubu</b>	20	48 dakika (8/10 saat)
<b>Cupravit-yüksek doz</b>	10	1 saat 36 dakika (16/10 saat)
<b>Componion-MİK dozu</b>	6	2 saat 24 dakika (24/10 saat)
<b>Bordo bulamacı-arazi=MİK dozu</b>	13	1 saat 12 dakika (12/10 saat)

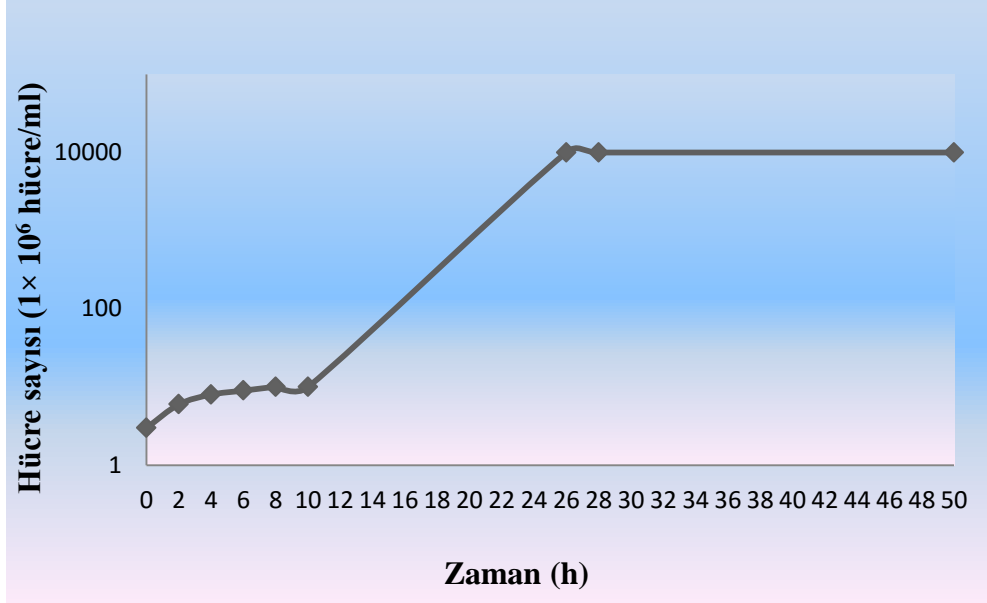
*Bacillus tequilensis* DT2'in pestisitlerle muamelesi sonucunda 0. ve 50. saatlerde tüplerde görülen bulanıklık değişimi Şekil 3.32'de gösterilmiştir (Mac Farland 5). Bordo bulamacının en yüksek dozunda bulanıklık, diğer pestisitlere oranla daha az görülmüştür (Mac Farland 3).



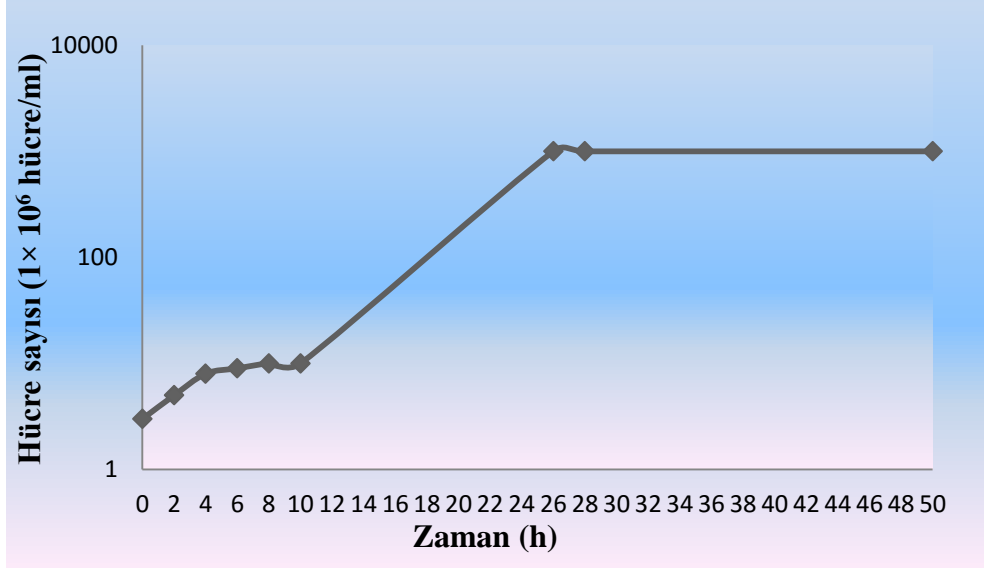
**Şekil 3.27.** *Bacillus tequilensis* DT2'in pestisitlerle kültürasyonundan sonra tüplerde görülen bulanıklık değişimi (1.tüp: Kontrol Grubu, 2.tüp: Cupravit (yüksek doz), 3.tüp: Bordo bulamacı (arazi=MİK), 4.tüp: Bordo bulamacı (yüksek doz), 5.tüp: Companion (MİK))



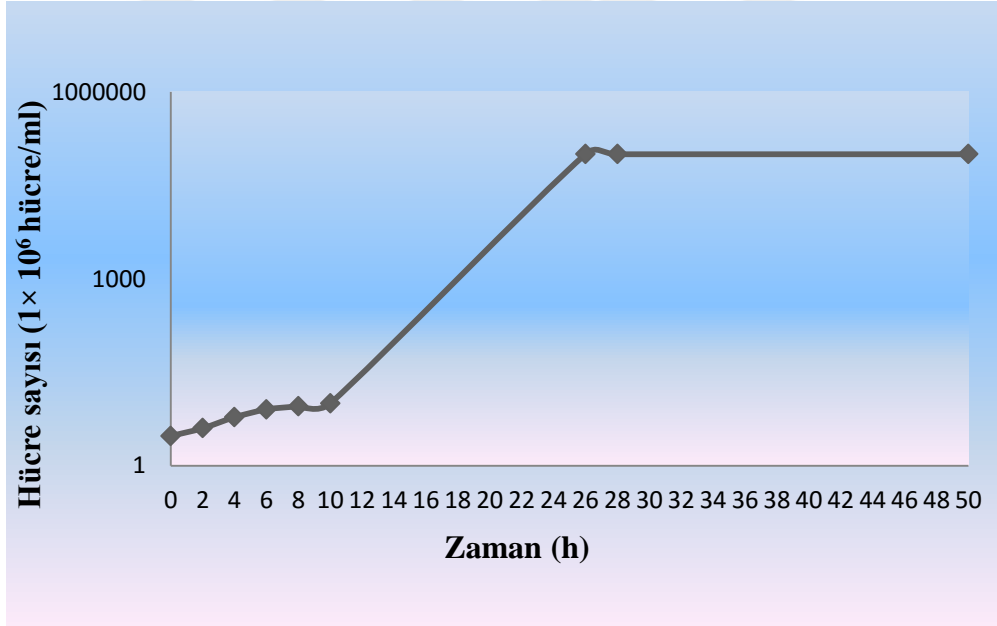
Şekil 3.28. *Bacillus tequilensis* DT2'in (kontrol) üreme eğrisi



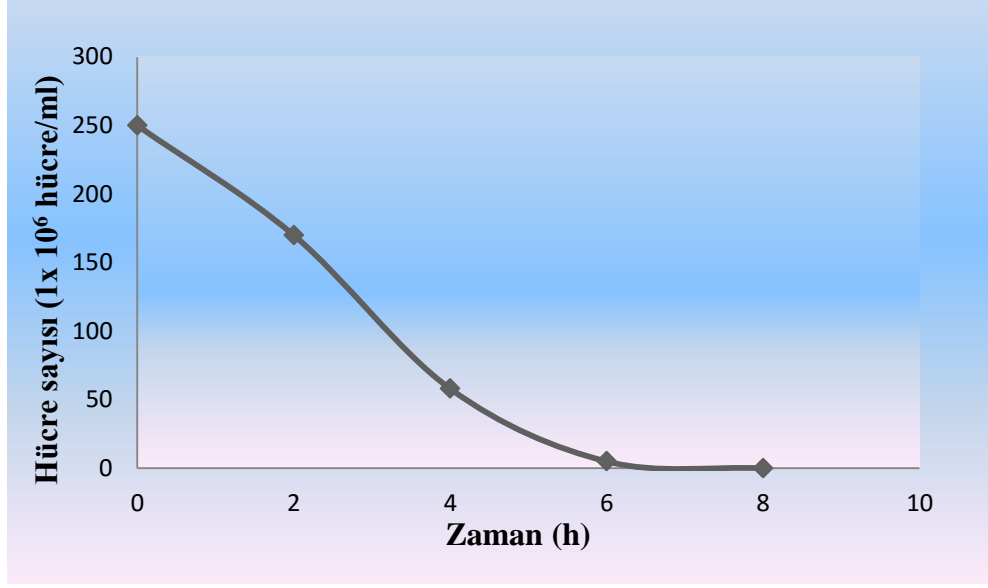
Şekil 3.29. Cupravit (yüksek doz) ile muamele edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in üreme eğrisi



Şekil 3.30. Companion (MİK) ile muamele edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in üreme eğrisi

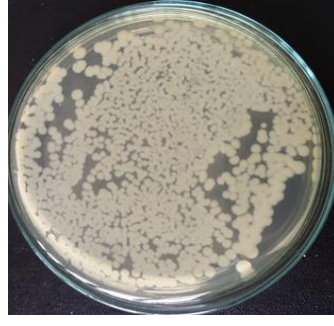


Şekil 3.31. Bordo bulamacı (Arazi=MİK) ile muamele edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in üreme eğrisi



**Şekil 3.32.** Bordo bulamacı (yüksek doz) ile muamele edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in üreme eğrisi

*Bacillus tequilensis* DT2'in kontrol grubundaki üreme eğrisi Şekil 3.28'de, pestisitlerle (Sentetik-Cupravit, Biyolojik-Companion, Doğal-Bordo bulamacı) muamelesi sonucu üreme eğrileri ise Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.31 ve Şekil 3.32' de verilmiştir. Ancak Bordo bulamacının yüksek dozunda, organizmanın direk ölüm fazına geçtiği görülmekte olup 8.saatin sonunda hücre sayısı sıfıra ulaşmıştır. (Şekil 3.33)



**0.saat**



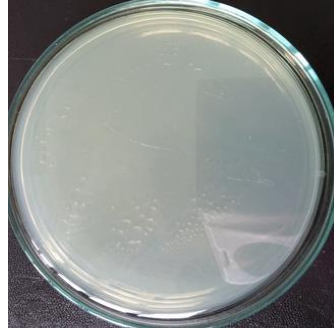
**2.saat**



**4.saat**



**6.saat**



**8.saat**

**Şekil 3.33.** Bordo bulamacı (yüksek doz) ile muamele edilen *Bacillus tequilensis* DT2'in 0- 8.saatlerindeki koloni görüntüleri

### 3.4.3. Genetik Modifikasyonlar

Genetik modifikasyonların tespitinde metabolik aktivitelerden antibiyotiklere karşı duyarlılıkta ve bakteri üremesinde en fazla değişikliğin tespit edildiği pestisit olan Bordo bulamacı, indikatör pestisit olarak seçilmiştir. Bordo bulamacıyla muamele edilen *Bacillus cereus* DY6 'da meydana gelen genetik modifikasyonların tespiti için elde edilen kültürler, Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama Ve Araştırma Merkezi'ne gönderilmiştir. Merkezde standart koşullarda kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6 ile Bordo bulamacı ile kültüre edilen *Bacillus cereus*'un karşılaştırılmasında (Çizelge 3.10) baz dizilimindeki homolojinin %100'den % 99'a düştüğü tespit edilirken, 126. kodonunda GTC dizisinin üçüncü nükleotidinin GTG'ye dönüştüğü görülmüştür. (Çizelge 3.11, Çizelge 3.12- Şekil 3.34, Şekil 3.35)

**Çizelge 3.10.** Pestisitle muamele öncesi ve sonrası *Bacillus cereus* DY6'un 16S ribozomal RNA'ya dayalı tür tayini sonucu

Suş Kodu	İstasyon Adı	EMBL/Gen Bank No	Tür Adı	Homoloji
DY6	İstasyon A Yaprak	KT719870.1	<i>Bacillus cereus</i>	%100
Bordo bulamacılı DY6	İstasyon A Yaprak	KT719870.1	<i>Bacillus cereus</i>	%99

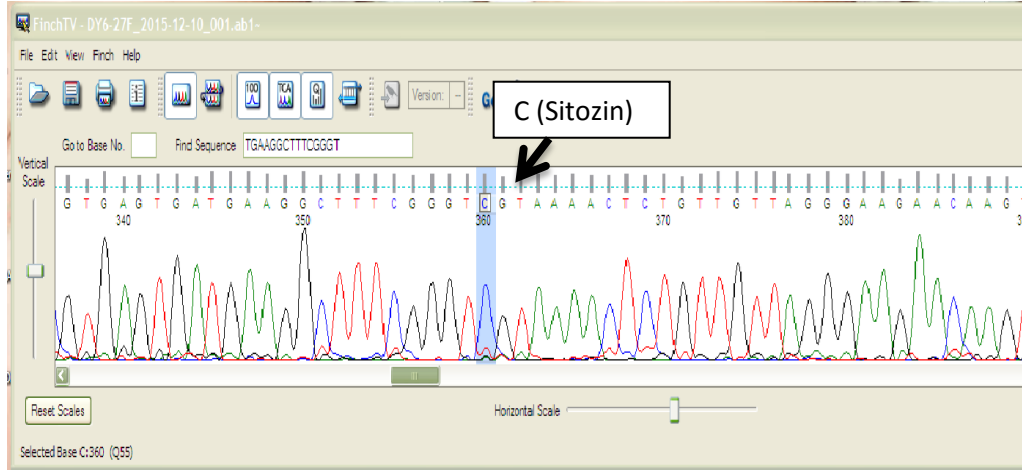


**Çizelge 3.11.** *Bacillus cereus* DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı

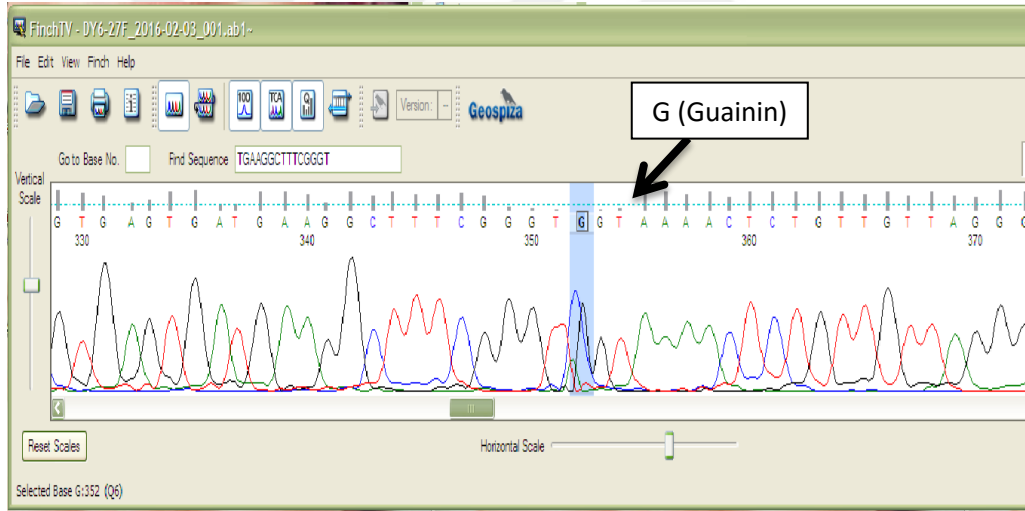
```
CAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG
CTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTT
CGGGTGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTG
GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTC
TGGTCTGTAAGTACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
CCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGA
GCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTC
GGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAA
```

**Çizelge 3.12.** Bordo bulamacıyla kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansı

```
CAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG
CTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTT
CGGGTGTGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTG
GCACCTTGACGGTACCTAATAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGGCGAAGGCGACTT
TCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGCGGAAAGCGTGGGGGAGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGCAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
CCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCG CACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGA
GCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTC
GGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAA
```



**Şekil 3.34.** *Bacillus cereus* DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansının elektrogramı



**Şekil 3.35.** Bordo bulamacıyla kültüre edilen *Bacillus cereus* DY6'un analizi sonucunda elde edilen DNA sekansının elektrogramı

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya nüfusunun beslenme ihtiyacının karşılanması; tarımda birim alandan alınan ürün miktarının artması, iyi tohum kullanımı, gübreleme, sulama, toprak hazırlama gibi faktörlerin yanında hastalık ve zararlılarla mücadele ile mümkün olmaktadır [9]. Dünyada ve ülkemizde tarım alanındaki zararlıları yok etmek ve kaliteli ürün elde etmek amacıyla pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Tarımsal savaşta kullanılan pestisitler, hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olabildikleri gibi, hedef olmayan canlılarda da hasarlara yol açmaktadırlar [72, 73]. Uygulama kolaylığı ve iyi sonuç alınması nedeniyle ülkemizde ve dünyada daha çok kimyasal savaşa başvurulmaktadır. Bu amaçla kullanılan kimyasallar (sentetik, doğal ve biyopestisit), bitki koruma ürünleri olarak ulusal mevzuata göre kullanılmaktadır. [10]. Bu kimyasalların; özellikle sentetik pestisitlerin bilimsel denetimden yoksun, gelişi güzel ve aşırı dozda kullanılmaları sonunda, zararlılar dışındaki yararlı canlılar ve çevrenin diğer unsurları üzerindeki olumsuz etkileri birçok araştırmada belirtilmiştir [74].

Ülkemizde tarımın hızlı artışına paralel olarak tarım ilacı kullanımının (özellikle sentetik pestisitler) giderek artması sonucu, pestisit uygulanmış ürünlerden insanların ve hedef alınmayan diğer canlıların zarar görmemesi için, pestisitlerin mutajenik etkilerinin de test edilmesi gerekmektedir [3-6]. Kimyasalların mutajenik ve genotoksik etkilerinin araştırılmasında prokaryotik ve ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Ancak prokaryotik ve ökaryotik canlılarda genel hücre metabolizması birbirinden büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle kimyasalların prokaryotik bakteri sistemleri ile test sonuçları, ökaryotik canlılarda aynı kimyasalların olası etkileri konusunda güvenilir bilgiler veremez [75].

Çalışmamızda kullanılan; sentetik, doğal ve biyopestisit olarak sınıflandırılan pestisitlerden en yaygın olarak kullanılanı da sentetik pestisitlerdir. Yapılan çalışmalara bakıldığında da canlılar üzerine etkisine dair çalışmaların, sentetik pestisitler üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. [76-85].

Bilaloğlu (1989), seştikleri 6 sentetik pestisit *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerindeki mitotik aktiviteye etkilerini, oluşturdukları mitotik anormallikleri ve kromozom değişimlerini incelemiş ve mitotik aktivitenin engellenmesinin, uygulama dozu ve uygulama süresine bağlı olduğunu belirtmiştir [76]. elik ve arkadaşları (2003) da soğan kök hücreleri üzerine uyguladıkları sentetik pestisit sitogenetik etkilerini ortaya koymuş ve toksik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir [77].

Pestisit uygulamalarının bitkilerde meydana getirdiği morfolojik ve anatomik farklılıklar yanında bitkinin geliştiği topraklarda bakteri, aktinomiset ve fungusları da etkilemesi söz konusudur. Pestisitler doğrudan toprağa uygulandığı gibi, dolaylı olarak bitkilere püskürtülürken bir miktarı da toprağa karışmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu bazı organik klorlu pestisitlerin toprağa tatbik edilmesi halinde, %50'den fazlasının 15-16 yıl toprakta kalabileceği tespit edilmiştir [86]. Ayrıca, bitkinin yeşil kısımlarındaki pestisitler de sulama ve yağmur suları ile toprağa gecebilmektedir. Böylece toprak için faydalı olan pekçok mikroorganizma grubu da pestisitlerden etkilenmektedir [87-89].

Pestisitlerin mikroorganizmalar üzerine etkilerini belirlemek için bazı çalışmalar yapılmıştır ve çalışmaların tamamı toprağa uygulama sonucu elde edilen verileri içermektedir. Odeyeni ve arkadaşları (1977) bazı fungusitlerin (Phygon, Spergon ve Thram), bezelyede nodül oluşturan *Rhizobium* suşlarına etkisini araştırmış, ve fungusit konsantrasyonunun fazla bulunduğu ortamlarda hassas *Rhizobium* suşlarının çoğaldığını tespit etmiştir [90]. Yine birçok pestisit yararlı mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkilerine bakıldığında yararlı mikroorganizmaların pestisite toleranslarının olduğu, ancak amonifikasyon ve denitrifikasyonu engellediği belirtilmiştir [91, 92]. Yine sentetik pestisit uygulanmış toprakta kontrole oranla gram negatif bakterilerin sayılarında azalma olduğu vurgulanmıştır [92]. Tütünde mavi kf hastalığına karşı kullanılan sentetik pestisit de toprak mikrofunguslarının sayısını azalttığı belirtilmiştir [89]. Ancak Diğrak ve arkadaşları (1996) ile Kaçkar ve arkadaşları (1998); sentetik pestisit uygulanan toprakta, toplam mikroorganizma sayısının değişmediğini bildirmişlerdir [93,94]. Sentetik pestisitlerin toprak ve epifitik floraya etkisine dair yapılan bu çalışmada, test edilen pestisitlerin genel inhibisyonlarının yüksek olduğu tespit edilirken, bakterilerin metabolik

aktivitelerinde de ( antibiyotik duyarlılık, generasyon süresi, generasyon sayısı) yüksek oranda değişimler tespit edilmiştir.

Doğal (Bordo bulamacı, bitki ve hayvan yağları, bazı bitki ekstraktları vb.) ve biyopestisitlerin (*Bacillus thuringiensis* preparatları vb) mikroorganizmalar üzerine etkisine dair çalışmalara bakıldığında, çok sınırlı literatüre rastlanmıştır [95-98]. Türkiye’de ekolojik tarım yapılan bölgelerde kullanılan bitki ekstraktlarından bazıları; ısırgan otu ekstresi, acı ağaç ekstresi, pelin otu ekstresi, kara turp ekstresi, soğan ekstresi, nane, çam, kimyon yağları ve kullanılan biyopestisitler ise *Bacillus thuringiensis* preparatlarıdır.

Biyopestisitler, çevre ve insan sağlığı üzerinde çoğunlukla hiçbir olumsuz etki yaratmamakta, besin zincirine zarar vermemekte ve gıdalar üzerinde toksik kalıntı bırakmamaktadır [99]. Biyopestisitler içerisinde yer alan bakterilerin, bitki hastalık ve zararlılarıyla olan mücadelede etken olduğu mekanizmalara bakıldığında bu bakterilerin antimikrobiyal özellikleri ve oluşturduğu toksinler ön plana çıkmaktadır. Bu antimikrobiyal bileşik ve toksinlerin, mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizmaları da farklılıklar göstermektedir. Bugüne kadar birçok çalışmada mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkilerine yönelik çalışmalar mevcut iken [100], biyopestisitlerin ve doğal pestisitlerin mevcut bitki ve toprak florası üzerindeki etkisine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Pestisitlerin mutajenik ve genotoksik etkilerine dair araştırmalarda, prokaryotik ve ökaryotik sistemler kullanılmaktadır. Prokaryotik canlılarda genel hücre metabolizması, birbirinden büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle kimyasalların prokaryotik bakteri sistemleri üzerine etkileri, daha fazla araştırma gerektirmektedir. Pestisitlerin çoğu, mikroorganizmalar için yeni bileşiklerdir. Bu nedenle, mikroflorada yer alan mikroorganizmalar pestisitlere yönelik olarak başlangıçta yavaş bir adaptasyon süreci geçirirler. Bu süreç sonunda uygulanan pestisit konsantrasyonlarına mikroorganizmalar, çeşitli genetik modifikasyonlarla direnç kazanabildikleri gibi biyolojik ayrışma yetenekleri ile toprak ve epifitik florada yararlı organizmalar haline dönüşebilirler.

Reed ve arkadaşları (1987), pestisitlerin parçalanmasının hızlı olduğu anda topraktaki mikroorganizmaların özelliklerini incelemişler ve pestisit uygulanmış toprakta sayısı en çok değişenlerin bakteri, en az değişenlerin ise fungus olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla beraber topraktan izole edilen bakterilerin çoğunun pestisiti substrat olarak kullanarak gelişme gösterdiği çalışmalarda mevcuttur [101].

Çalışmamızda kullanılan pestisitlerin (sentetik, doğal ve biyopestisit) her birine mikroorganizmaların duyarlılıkları tespit edilmiş olup özellikle günümüzde yoğun olarak kullanılan doğal pestisitlerden Bordo bulamacının metabolik aktivitedeki değişimleri tespit edilmiştir. Bununla beraber indikatör suş olarak seçilen *Bacillus cereus* DY6'da genetik modifikasyon taraması yapılmış ve modifikasyonun gerçekleştiği görülmüştür.

Günümüzde kullanılan sentetik pestisitlerin canlılar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son derece toksik olduğu bilinen sentetik pestisitlerin zorunlu kullanımları durumunda konsantrasyonlarının ve hedef organizmaların çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Biyopestisitler hedef olmayan faydalı organizmalara karşı düşük toksisiteli, çabuk parçalanan, mutajen olmayan, seçici görünen ve ekosistemde minimum zarara yol açan maddeler olarak bilinmektedir [102]. Daha az zararlı olduğu bilinen doğal ve biyopestisitlerin kullanımı yaygınlaştırılmalı, ancak bu biyomateryallerin toksik bileşikler olabileceği de düşünülerek bu tür çalışmalara daha fazla ağırlık verilmelidir. Bu anlamda çalışmamız, pestisitlerin bakteriyel etkisini farklı bir açıdan değerlendirmiş olup özellikle ekosistemi olumsuz etkilediği düşünülen kimyasal pestisitlerin yanı sıra, herhangi bir zararı olmadığı düşünülen doğal ve biyopestisitlerin, bakterilerin ürettiği metabolik ürünler üzerine etkisi ile bu alana yeni bir bakış açısı kazandırarak, literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Heming, J.C., Davis, A. C., Robinson, W. B. Flavor and color evaluation of canning crops grown in soil treated with insecticides. *J.of. Food Tech.* 8, 227, 1954.
- [2] Ağar S., Aydınoglu H., Temel O., İkizunal K., Ece H., Pestisit kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceği, *Türk. Entomol. Derg.*, 15 (4) : 247 – 256, 1991.
- [3] Badr A., *Cytologia*, effects of the S-Triazine herbicide Turbutryn on mitosis, chromosomes and nucleic acids in root of *Vicia faba*, 51: 571- 577, 1986.
- [4] Kumar M., Kumar M. Prasad. H., Cytotoxic effects of two herbicides on meiosis, *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 69: 25, 1995.
- [5] Ashour S. A., Abdou R. F., Effect of weed control treatments on weeds, seed yield, yield components and nodulation in winter lentil *Fabis Newsltter*, 26: 1014, 1990.
- [6] Kligerman A.D., Doerr C.L., Tennant A.H., Peng B., genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutation Research*, 471:107, 2000.
- [7] Ögüt S., Seçilmiş H., Tarım İlaçlarının (Pestisitler) Olası Çevresel Etkileri, Uluslararası Davraz Kongresi, 24-27 Eylül 2009.
- [8] Ataman, R, Petek. Tarımsal İlaç Kullanımının Gıda Güvenliği Açısından Önemi ve Gıda Sanayine Etkileri. I. Çukurova' da Sanayileşme ve Çevre Sempozyumu. ISBN: 978-9944-89-420-3, Kasım 2007.
- [9] Öncüer, C., Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçları. 259:117-125. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova- İzmir, 1995.



- [10] Anonim, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/03/20100323-2.htm>. (Erişim Tarihi: 15.04.2016)
- [11] Haktanır, K., Arcak, S., Çevre Kirliliği Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. (457): 1503, 1998.
- [12] I. Çukurova'da Sanayileşme ve Çevre Sempozyumu Bildiriler Kitabı, ISBN: 978-9944-89-420-3, Ankara, Kasım 2007.
- [13] Öztürk, İ., Tosun, N., Famoxadone ve Cymoxanil etkili maddeli bir fungusitin domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisi üzerine fizyolojik etkisi, Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 41 : 77– 87, 2004.
- [14] Treshow M., environment and plant response, New York: Mc Graw-Hill Book Company, p. 380-381, 1970.
- [15] Tort N., Öztürk İ., Tosun N., metalaxyl uygulamasının domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.)'in anatomik yapısı üzerine etkisi Ege.Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 41 (2): 111-122, 2004.
- [16] Van Iersel M., Bugbee B., effects of benzimidazole fungicides on bedding plants, J. Am. Soc. Hortic. Science, 121: 1095-1102, 1996.
- [17] Şevken, S., Halk Sağlığı Amaçlı Kullanılan Pestisitlerin (Biyosidal) Güvenilirlik Standartlarının Karşılaştırılması. Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi. 20 (1): 11-18, ISSN: 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651, 2009.
- [18] Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C., Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards, University of California Pres, 1991.

- [19] N. Kalkan, Ames Test Yöntemi ile Dört Ayrı Sentetik Quinoxalin Türevinin Farklı Dozlardaki Mutajenik Aktivitesinin ve Mutajenliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1996.
- [20] Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. ve Toman, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mut. Res.* 368, 171-179, 1996.
- [21] Rank, J. and Nielsen, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mut. Res.* 418, 113-119, 1998.
- [22] Steinkellner, H., Kong, M.S., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Horak, O., Kundi, M. ve Knasmüller, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 183-191, 1998.
- [23] Kong, M.S. ve Ma, T.H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mut. Res.* 426, 221-228, 1999.
- [24] Pavlica, P., Besendorfer, V., Rosa, J. ve Papes, D. The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*). *Chemosphere* 41, 1519-1527, 2000.
- [25] El-Shahaby, O.A., Abdel Migid, H.M., Soliman, M.I. ve Mashaly, I.A. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6, 23-28, 2003.
- [26] Evseeva, T.I., Geras'kin, S.A. ve Shuktomova, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *J. Environ. Radioact.* 68, 235-248, 2003.

- [27] Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N. ve Gupta, S.K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* 347, 46-52, 2005.
- [28] Bolognesi, C. ve Morasso, G. Genotoxicity of pesticides: Potential risk for consumers. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 182-187, 2000.
- [29] Anonim, [tisit.org.tr/pdf\\_dosya/pestisit\\_ve\\_pestisitlerin\\_siniflandirilmesi.pdf](http://tisit.org.tr/pdf_dosya/pestisit_ve_pestisitlerin_siniflandirilmesi.pdf). (Erişim tarihi: 20.01.2016)
- [30] Tarım İlaçları (Pestisit) Kullanımı ve Sorunları. <http://www.frmtr.com/muhendislik-mimarlik-peyzaj-mimarligi/777523> [tarimilaclari-pestisid-kullanimi-ve sorunlari.html-88k](http://www.frmtr.com/muhendislik-mimarlik-peyzaj-mimarligi/777523). (Erişim tarihi: 24.01.2009)
- [31] D.N. Denizeri, Yuvacık Barajını Besleyen Derelerdeki Pestisitler, GC-MS Analizleri İleri Arıtım Prosesleri. Yüksek Lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2001.
- [32] Anonim, Nükleer ve Kromatografik Tekniklerle Pestisit Kalıntılarının Analiz Edilmesi. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Ankara Nükleer Tarım ve Hayvancılık Araştırma Merkezi, Nükleer Tarım Bölümü. Ankara, 2005. [http://kutuphane.taek.gov.tr/internet\\_tarama/dosyalar/cd/4115/pdf/135.pdf](http://kutuphane.taek.gov.tr/internet_tarama/dosyalar/cd/4115/pdf/135.pdf). (Erişim tarihi: 17.10.2010).
- [33] Anonim, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara, 2008. <http://www.tarim.gov.tr/arayuz/10/haberayrintisi.asp?ay=6&yil=2008&ID=1505>. [Erişim tarihi: 08.11.2010].

- [34] Anonim, Anonymous, 1996. Türkiye’ de tarım ilaçları tüketim miktarları. <http://images.google.com.tr/imgres?imgurl> (Erişim tarihi: 26.07.2008)
- [35] Cord, JM. Mc.,Friderich, I., I. Superoxide dismutase.An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry. 244, 6049-6055, 1969.
- [36] Sharples, C.R., Hull, M.R., Cobb, A.H., multiple resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Resistance to herbicides in groups A/1, B/2, C1/5, C2/7, and K1/3) *Annals of Botany*. 79, 455-4461, 1997.
- [37] Iersel, M. Van, Bugbee, B., effects of benzimidazole fungicides on bedding plants, *J. Am. Soc. Hortic. Science*. 121, 1095-1102, 1996.
- [38] Yücel, Ü., Pestisitlerin insan ve çevre üzerine etkileri. Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi. <http://www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc>. (Erişim tarihi: 04.07.2008).
- [39] Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi. Cilt-2, s: 629-648, Ocak, 2005.
- [40] Anonim, [http://www.agri.ankara.edu.tr/soil\\_sciences/1250\\_Karaca-ArcakCevre-Bolum-7.pdf-50k](http://www.agri.ankara.edu.tr/soil_sciences/1250_Karaca-ArcakCevre-Bolum-7.pdf-50k). (Erişim tarihi: 01.06.2005)
- [41] Ögüt, S., Seçilmiş, H., Tarım İlaçlarının (Pestisitler) Olası Çevre Etkileri. Süleyman Demirel University, Faculty of Engineering Architecture Department of Food Engineering, Turkey, 2003.
- [42] Öztürk, S., Tarım ilaçları. 2. Baskı, Ak Basımevi. s: 127-132. İstanbul, 1997.

- [43] Haktanır, K., Arcak, S. Toprak Biyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 1486. Ankara, 1997.
- [44] Duvigneaud, P., La synthese ecologique. Population, communautes, ecosystemes, biosphere, Noosphere. Doin, Paris, 296 s, 1974.
- [45] Nesime Cebel, Toprak Kalitesinin Korunması ve Geliştirilmesi, Bilim ve Aklın Aydınlığında Eğitim, S. 134, ss. 34-38, Nisan 2011.
- [46] Yıldırım, E., Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve Kullanılan İlaçlar. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No:219, Erzurum, 350 s., 2008.
- [47] Çengel, M., Toprak Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası, Ders Teksiri. E.Ü. Ziraat Fak. No. 78, Bornova, 1983.
- [48] Metting, B. Microalgae in Agriculture. In M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka [eds.] Microalgal Biotechnology Camb. Univ. Press, P. 288-304, 1989.
- [49] Soyöz M, Özçelik N (2003) Zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 10, 6- 9.
- [50] Fokkema, N. J., Naturally Occurring Biological Control in the Phyllosphere Microbial Antagonism .INRA Publ., No 8: 71 -79, 1983.
- [51] Blakeman. J. P., The Chemical Environment of leaf surfaces with special reference to spore germination of pathogenic fungi. Pestic. Sci. 4: 575 – 588, 1973.
- [52] Dickinson, C. H., Interaction of Fungicides and Leaf Saprophytes, Pestic. Sci. 4. 563, 1973.

- [53] Hislop, E. C. Some Effects of Fungicides and Other Agrochemicals on the Microbiology of the Aerial Surfaces of Plants, In: Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Dickinson, C. H. and Preece, T. F., Eds. Academic Press. New York. 41, 1976.
- [54] Vyas, S. C., Nontarget Effects of Agricultural Fungicides. CRS Press, Inc, 1988.
- [55] Andrews. J. H. and C. M. Kenerley. The Effect of a Pesticide Program on Non-Target Epiphytic Microbial Population of Apple Leaves. Can. J. Microbiology, 24: 1058 1072, 1978.
- [56] Hislop, E. C., and T. W. Cox, Effects of Captan on the Non-Parasitic Microflora of Apple Leaves. Trans. Br. Mycol. Soc., 52: 223 ·235, 1969.
- [57] Öztürk, S., Tarım İlaçları, Hasat Yayıncılık, İstanbul, 552s., 1990.
- [58] A. Fidan. Bazı Pestisitlerin Turunçgillerin Fizyolojik ve Anatomik Özellikleri Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Adana, 2007.
- [59] Anonim, <http://www.haritatr.com/demirisik-koyu-haritasi-m548b>. (Erişim tarihi:15.04.2016).
- [60] Anonim, <http://www.haritamap.com/yer/kuyuluk-mezitli>. (Erişim tarihi: 15.04.2016).
- [61] GÜLÇUR, F. Mersin Mıntıkasında (Akdeniz Bölgesi) mevcut bazı terra rosa topraklarının fizik ve şimik özellikleri ile bu toprakların kil fraksiyonlarının mineralojisi üzerine araştırmalar. İst.Üni. Orman Fakültesi Dergisi seri A, cilt 14, sayı 1 (1-37)-İstanbul. 67, 1964-1

- [62] GÜLÇUR, F. Bazı terra rosa topraklarının toz fraksiyonlarının mineralojik tabiatı ve kimyasal terkibi üzerine araştırmalar. İst. Üni. Orman Fakültesi Dergisi seri A, cilt 14, sayı 1 (101-110)-İstanbul, 1964-2.
- [63] Anonim,  
[http:// www.kgm.gov.tr/SiteCollectionImages/KGMImages/Haritalar/b5.jpg](http://www.kgm.gov.tr/SiteCollectionImages/KGMImages/Haritalar/b5.jpg).  
(Erişim tarihi: 11.03.2016).
- [64] Anonim, <http://www.biyotar.com.tr/icerik.aspx?cID=58> (Erişim tarihi: 15.04.2016)
- [65] Temiz, A. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 4. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 2008.
- [66] Anonim,[http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/uamdss/06\\_AMD-TP-03-CLSI-Kirby-Bauer-disk-difuzyon-yontemi.pdf](http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/uamdss/06_AMD-TP-03-CLSI-Kirby-Bauer-disk-difuzyon-yontemi.pdf). (Erişim Tarihi: 15.04.2016)
- [67] Azaz A.D., H.A.Irtem., M.Kurukcuoğlu and K.H. Can Baser Composition and the in vitro Antimicrobial Activities of the Essential oils of some Tymus Species. Z. Naturforsch. 59c, 75-80, 2004.
- [68] Bektaş T., D.Faferera, M.Sökmen, M.Polissiou and A. Sökmen. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origannum syriacum* L var *bevanii*. J.Sci. Food. Agric.84: 1389-1396, 1984.
- [69] Eom, S., Park, J., Yu, D., Choi, J., Choi, J., Lee, M., & Kim, Y., antimicrobial activity of brown alga *eisenia bicyclis* aganist methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 251-256, 2011.
- [70] Sasidharan, S., Darah, I., Noordin, M. K. M. J. Ivitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *New Biotechnology*. 27 (4): 390-396, 2010.

- [71] Arda, M., Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı. Medisan Yayınevi. Ankara, 80-92, 2000.
- [72] Vural N: Toksikoloji. , Ankara, A.Ü. Basımevi, 1984.
- [73] MacMahon B: Pesticide residues and breast cancer. J Natl Cancer Inst 86: 572-573,1994.
- [74] Dığrak, M., Çolak, F. “Chlorsulfuron ve Metolachlor’un toprak mikroorganizmaları üzerine etkisi”, 2000 GAP Çevre Kongresi, Bildiriler Kitabı, 1. Cilt, Sayfa 295-304, Şanlıurfa, 16-18 Ekim 2000.
- [75] Çakır, Ş., Sarıkaya, R., Bazı Organik Fosforlu İnektisitlerin *Drosophila melanogaster*’in Yaşama Yüzdesi Üzerine Etkisi. GÜ, Gazi Eğitim Fak. Derg., 24 (3): 71-80, 2004.
- [76] R. Bilaloğlu, Bazı Pestisitlerin *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Oluşturdukları Sitolojik Sapmalar Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1982.
- [77] M. Çelik, Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferel lenfositlerinde sitogenetik etkileri. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. Ph.D. Thesis., 2003.
- [78] Pandey, R. M., Cytotoxic Effects of Pesticides in Somatic Cells of *Vicia faba* L., Cytogenetics Section, National Botanical Research Institute, Cytology and Genetics, Allerton Press, Inc., Published in Russian in Tsitologiya i Genetika, Lucknow-226001, India, Vol. 42, No. 6, pp. 373–377., ISSN 0095-4527, 2008.
- [79] Aydemir, N., Çelikler, S., Sumak, Ş., Yılmaz, D., Evaluation of Clastogenicity of 4, 6-Dinitro-o-cresol (DNOC) in *Allium* Root Tip Test, Uludag University, Science and Arts Faculty, Biology Department 16059 Görükle, Bursa/Turkey, J. Biol. Environ. Sci., 2(5), 59-63, 2008.



- [80] Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, S. Paola., Evandri, M. G., Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test, Department of Pharmacology of Natural Substances and General Physiology, University of Rome La Sapienza, P.le A. Moro 5, 00185 Rome, Italy. Environmental and Molecular Mutagenesis, 43:137–141, 2004.
- [81] Koca, S., The cytogenetic effects of Sheffer A, A Liquid fertilizer and growth regulator in root tip cells of *Vicia faba* L., Department of Biology, Science and Art Faculty, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey, C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi., ISSN 1305-1385, C.B.U. Journal of Science4.1, 121-126, 2008.
- [82] G. Kara, Kirli Suların Bazı Sebze Bitkileri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 1998.
- [83] R. Kırımlı, Bazı Fungisit ve İnsektisitlerin *Vicia faba* L. ve *Capsicum annum* L. Türlerinin Kök Ucu Mitozu Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Ağustos 2007.
- [84] Gill. S. A., Shaukat. S. S., Genotoxic effects of Captan fungicide on root meristems of *Allium cepa* L. In vivoRufus., 2000.
- [85] Özörgücü, B., Türkan, Oğuz, G., Gönüz, A., Acar, O., 1994. Endüstriyel bölge yeraltı sularının *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme üzerine etkileri. XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Çevre Biyolojisi Seksiyonu, S: 1-7, Edirne, 52, Tarım ve Köy işleri \_ 1 Müdürlüğü, 1995.
- [86] Chisholm D, Macphee AW: Persistence and effects of some pesticides in soil. Econ J Ent 65: 1010-1013,1972.
- [87] Oorschot, J.İ.P., Types of Selective Action by Herbicides Which Inhibit Photosynthesis 2. Naturforsch, 34 C: 900-904.1979.

- [88] Özörgücü, B., Tort, N., Türkan, İ., Demiray, H., Antrakol'ün Tütün Üzerindeki Etkileri. X.Ulusal Biyoloji Kongresi, Cilt 2: 43-53, 1990.
- [89] Özörgücü, B., Tort, N., Gönüz, A., Antrakol'ün Tütünde Stomalar Üzerine Etkileri. Milli Tütün Komitesi. Bilimsel Araştırma Alt Komitesi. 10. Toplantısı 1991.
- [90] Odeyeni, O. ve M. Alexander, Resistance of *Rhizobium* strain to phygon, spergon and thiram. *Applied and Environmental Microbiology*, 784-790, 1977.
- [91] Sato, K., Pentachlorophenol (PCP) Tolerance of Bacteria Isolated From Soil Percolated with PCP. *J. Pesticide Sci.*12, 582-598.1987.
- [92] Sato, K., Effect of Pesticide Pentachlorophenol (PCP) on Soil Microflora. *Plant and Soil* 75, 417-426, 1983.
- [93] Dığrak, M., Kırbağ, S., Özçelik, S. “Bazı pestisitlerin toprak mikroorganizmaları üzerine etkisi”, *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 20, 165-173, 1996.
- [94] Dığrak, M., Kaçar, N., Sönmez, A. “Trifluralin, Cupravit ve DDVP'nin toprak mikroflorası üzerine etkilerinin Araştırılması”, *Doğu Anadolu Tarım Kongresi, Bildiriler Kitabı*, 2. Cilt, Sayfa 1337-1345. 26 Eylül, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 1998.
- [95] Kotan R., Kordali Ş., Çakır A., Kestek M., Kaya Y., Kılıç H. "Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth."360-368, 2008.
- [96] Kotan R., Mohammadi P., Karagöz K., Dadaşoğlu F., Tozlu E. "Tarımda biyopestisit ve biyogübre olarak kullanılabilcek geniş spektrumlu bakteri izolatlarının belirlenmesi"313-, 2014.

- [97] Kotan R., akmakçı R., Şahin F., Karagöz K., Dadaşoğlu F., Kantar F. "Türkiye’de bakteriyel biyoajanlar kullanılarak hastalık ve zararlıların kontrolüne yönelik yapılan biyolojik mücadele alışmaları "Türkiye 4. Organik Tarım Sempozyumu, 711-723, 2010.
- [98] Tozlu E., Dadaşoğlu F., Kotan R., Tozlu G. "Insecticidal effect of some bacteria on *Bruchus dentipes* Baudi (Coleoptera: Bruchidae)"*Fresenius Environmental Bulletin*, 918-923, 2011.
- [99] akmakçı, R., Erdogan, Ü., Organik Tarım \_spir Hamza Polat Meslek Yüksek Okulu Ders Yyayınları No: 2, 121-124, 2005.
- [100] N. GÖĞÜSGEREN, *Trichoderma* Spp.’E Etkili Antibiyotik Üreten *Bacillus* Spp. Suşlarının Saptanması Ve Bunların *Ganoderma Lucidum* Misel Kùltürlerinde İn Situ Kullanılma Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, ADANA, 2009.
- [101] Reed, J.P., Kremer, R.J., Keaster, J.A., Characterization of Microorganisms in Soils Exhibiting Accelerate Pesticide Degradation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 776-782, 1987.
- [102] Raizada, R.B., Srivastava, M.K., Kaushal, R.A. ve Singh, R.P. Azadirachtin, a neem biopesticide: Subchronic toxicity assessment in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39: 477-483, 2001.

## EKLER

### EK. 1.

<b>A. ANALİZİ İSTENEN ÖRNEK</b>		
<b>Adı, cinsi:</b> Bakteri kültürü		
<b>Numune sayısı :</b> 8		
1. DY1		
2. DY2		
3. DY3		
4. DY4		
5. DY5		
6. DT1		
7. DT2		
<b>B. KULLANILAN PRİMERLER</b>		
Bakteri tanımlamasında PCR ve DNA dizi analizi çalışmalarında kullanılan primer çiftleri		
<b>Primer</b>	<b>5'→ 3'</b>	<b>Kaynak</b>
27F	AGAGTTTGATCCTGG CTCAG	Singh, V., Chaudhary, D. K., Mani, I. 2012. Molecular Characterization and Modeling of Secondary Structure of 16S rRNA from <i>Aeromonas Veronii</i> . International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 3 (1), 253-260.
1492R	TACGGTTACCTTGTT ACGACTT	

### C. SONUÇ

Örneklerin sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçları ile blastlanması sonrası elde edilen % benzerlikleri aşağıdaki çizelelerde belirtildiği gibidir.

DY1 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY1	<a href="#">KT720227.1</a>	<i>Bacillus invictae strain T2.22D</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY1	<a href="#">KT719907.1</a>	<i>Bacillus invictae strain</i> AMY 17.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY1	<a href="#">KT719885.1</a>	<i>Bacillus invictae strain</i> MSL 3055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY1	<a href="#">KT719882.1</a>	<i>Bacillus invictae strain</i> MSL 3051 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY1	<a href="#">KT719858.1</a>	<i>Bacillus invictae strain</i> MSL 3007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

DY2 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY2	<a href="#">KJ801578.1</a>	<i>Bacillus cereus strain ZAP009 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY2	<a href="#">KJ722471.1</a>	<i>Bacillus cereus strain 3PIK2 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY2	<a href="#">HE716942.1</a>	<i>Bacillus anthracis partial 16S</i> rRNA gene, strain JPR-02	99%
DY2	<a href="#">KF835391.1</a>	<i>Bacillus cereus strain BC-2 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY2	<a href="#">KF054993.1</a>	<i>Bacillus mycoides strain IARI-JR-</i> 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

DY3 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY3	<a href="#">HQ678662.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> strain PARZ9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY3	<a href="#">KT720350.1</a>	<i>Bacillus tequilensis</i> strain V48.19f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY3	<a href="#">KT720339.1</a>	<i>Bacillus tequilensis</i> strain V44.28fa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY3	<a href="#">KT720333.1</a>	<i>Bacillus tequilensis</i> strain V44.17b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DY3	<a href="#">KT720331.1</a>	<i>Bacillus mojavensis</i> strain V44.14fff 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

DY4 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY4	<a href="#">KC117526.1</a>	<i>Cellulosimicrobium sp.</i> NS3-4 B <u>16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	99%
DY4	<a href="#">EU287931.2</a>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> F16 <u>16S ribosomal RNA gene, complete sequence</u>	99%
DY4	<a href="#">JQ659856.1</a>	<i>Cellulosimicrobium funkei strain</i> <u>R6-437 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	99%
DY4	<a href="#">GU012422.1</a>	<i>Cellulosimicrobium cellulans strain</i> <u>YB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	99%
DY4	<a href="#">EU233269.1</a>	<i>Cellulosimicrobium cellulans strain</i> <u>XZ-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	99%



DY5 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY5	<u>KT720017.1</u>	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain PF9-10.2.3</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY5	<u>KT719957.1</u>	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain Ph_01B1.1</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY5	<u>KT719946.1</u>	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain RA_14A7.4</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY5	<u>KT719883.1</u>	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain MSL_3052</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY5	<u>KT719880.1</u>	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain MSL_3046</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

DY6 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DY6	<a href="#">KT719870.1</a>	<i>Bacillus cereus strain MSL_3028</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY6	<a href="#">KT719800.1</a>	<i>Bacillus cereus strain MPF_58 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY6	<a href="#">KT719731.1</a>	<i>Bacillus cereus strain MER_150 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY6	<a href="#">KT719720.1</a>	<i>Bacillus cereus strain MER_142 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DY6	<a href="#">KT719719.1</a>	<i>Bacillus cereus strain MER_141 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

DT1 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DT1	<a href="#">KT719656.1</a>	<i>Micrococcus yunnanensis strain</i> MER_80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DT1	<a href="#">KT200430.1</a>	<i>Micrococcus yunnanensis strain</i> KP018f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DT1	<a href="#">KP209425.1</a>	<i>Micrococcus yunnanensis strain</i> EB115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DT1	<a href="#">KP860523.1</a>	<i>Micrococcus yunnanensis strain</i> EAS4C22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DT1	<a href="#">LN774758.1</a>	<i>Micrococcus yunnanensis partial</i> 16S rRNA gene, isolate <a href="#">0312MAR27A6</a>	99%

DT2 kodlu örneğin 27F/1492R primeri ile sekanslarının NCBI Gen bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri

Örnek kodu	EMBL / Gen Bank No	Bakteri Türleri	% Homoloji
DT2	<u>KT720350.1</u>	<u><i>Bacillus tequilensis</i> strain V48.19f</u> <u>16S ribosomal RNA gene, partial</u> <u>sequence</u>	100%
DT2	<u>KT720339.1</u>	<u><i>Bacillus tequilensis</i> strain V44.28fa</u> <u>16S ribosomal RNA gene, partial</u> <u>sequence</u>	100%
DT2	<u>KT720333.1</u>	<u><i>Bacillus tequilensis</i> strain V44.17b</u> <u>16S ribosomal RNA gene, partial</u> <u>sequence</u>	100%
DT2	<u>KT720331.1</u>	<u><i>Bacillus mojavensis</i> strain</u> <u>V44.14fff 16S ribosomal RNA</u> <u>gene, partial sequence</u>	100%
DT2	<u>KT720314.1</u>	<u><i>Bacillus subtilis</i> subsp.</u> <u>inaquosorum strain V43.21 16S</u> <u>ribosomal RNA gene, partial</u> <u>sequence</u>	100%

**Sekans analizi sonucunda elde edilen DNA sekansları**

**DY1 kodlu örnek**

CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG  
TACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTA  
GCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGA  
ACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTG  
TCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGA  
CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCC  
CAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA  
CTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCA  
AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTAC  
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAA  
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG  
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGC  
TACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCA  
ATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC  
GCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTAC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTA  
CCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAG  
AGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG  
ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG  
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACG  
CATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCG  
GGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGC  
GGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGT  
CTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCC  
GGGAGCAAGCT

**DY2 kodlu örnek**

TAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG  
GTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC  
GGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG  
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT  
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAAGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGG  
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGA  
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAA  
CCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATG  
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT  
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTG  
CAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATT  
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT  
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA  
CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGG

**DY3 kodlu örnek**

TCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTA  
CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC  
GATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAAC  
AGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTC  
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG  
TCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCA  
ACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACT  
CTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAG  
ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC  
TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTC  
CCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAAC  
CCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTGCTCCCCACGTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA  
GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCG  
CTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCC  
AATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAAC  
CGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTA  
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGT  
ACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACACA  
GAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCA  
GACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT  
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTAC  
GCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGC  
GGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATG  
CGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA  
GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATC  
AGGGAGCAAGCTCCC

**DY4 kodlu örnek**

TTGGGCCATGGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACTTGACGGGCGGT  
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATT  
ACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT  
GAGACCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCACCTTGCGGTATCGCAGCCCTTGT  
ACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGA  
TTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCATGA  
GTCCCCGGCATAACCCGCTGGCAACATGGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA  
CCTGTGCACGAGTGTCAAAGAGACCACCATCTCTGGTGGCTTCCCGTGC  
ATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGC  
TCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGG  
CCGTACTCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTTGCTGCGGCACGGAACTC  
GTGGAATGAGCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCA  
GGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTG  
CGGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCAT  
TCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCC  
CGTACCCGATGCAAGCTCGAGGTTGAGCCTCGAGTTTTACACCAGACGC  
GACAAACCGCCTACGAGCTCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTG  
CGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTC  
TGCAGGTACCGTCACTTGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCC  
GAAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTG  
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT  
CCCAGTGTGGCCGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGT  
AGGCCATCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCTGACC  
GAAAACTTTCCAACCACCCCATGCGAGGGTAGCTCATATCCGGTATTA  
GCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCGAAGTCAAGGGCAGGTTACTCACGTG  
TACTCACCCGTTTCGCCACTAATCCACCCAGCAAGCT



**DY5 kodlu örnek**

CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG  
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTA  
GCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGA  
ACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTG  
TCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGA  
CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCC  
CAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA  
CTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCA  
AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTAC  
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAA  
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG  
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGC  
TACACGTGGAATTCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCA  
ATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC  
GCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTAC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTA  
CCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTCCCTAACAAACAG  
AGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG  
ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG  
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATACCCTCTCAGGTCGGCTACG  
CATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCG  
GGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGC  
GGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG  
TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCA  
GGGAGCAAGCTCCCAT

**DT1 kodlu örnek**

GTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTG  
AGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACT  
GGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAG  
ATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAA  
TGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG  
ATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGT  
GACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT  
CGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGA  
TCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATT  
CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCG  
AAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGG  
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCAC  
TAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTAAG  
TGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGC  
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGG  
TTTCCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCAT  
GTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACT  
CGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGG  
CTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGT  
GGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC  
GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGG  
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTC  
GGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGG

**DT2 kodlu örnek**

CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTG  
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTA  
GCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGA  
ACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTG  
TCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGA  
CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCC  
CAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA  
CTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCA  
AGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACC  
GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTAC  
TCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAA  
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG  
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGC  
TACACGTGGAATTCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCA  
ATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACC  
GCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTAC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTA  
CCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTCCCTAACAAACAG  
AGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGGCGTTGCTCCGTCAG  
ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG  
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATACCCTCTCAGGTCGGCTACG  
CATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCG  
GGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGC  
GGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG  
TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCA  
GGGAGCAAGCTCCCATC