

# TEKNOFEST

## HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

### ÇEVRE VE ENERJİ TEKNOLOJİLERİ YARIŞMASI

#### PROJE DETAY RAPORU

**TAKIM ADI:** ROBİGO

**PROJE ADI:** PESTİSİTLERİN BİYOREMİDASYONU

**BAŞVURU ID:** 349361



# İçindekiler

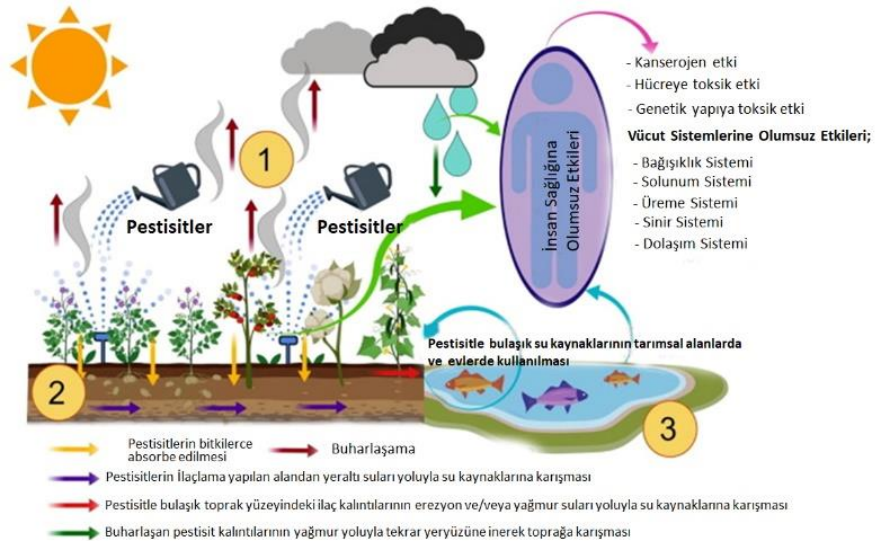
1. Proje Özeti (Proje Tanımı) .....	3
2. Problem/Sorun.....	3
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem .....	4
4.1 Bakteri izolasyonu .....	5
4.2. Pestisit ve Bakteriyel İzolat Seçimi .....	5
4.3. Bakteriyel izolatların tanısı .....	5
4.3.1. Biyokimyasal testler .....	5
4.3.1.1. Gram boyama testi .....	5
4.3.1.2. KOH testi .....	6
4.3.1.3. Katalaz testi .....	6
4.3.1.4. Oksidasyon - fermantasyon testi .....	7
4.3.1.5. Karbon kaynaklarının kullanımı testi .....	7
4.3.1.6. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi .....	7
4.3.2. Moleküler Tanılama .....	8
4.4. <i>Bacillus megaterium</i> 'un Pestisit Bozunum Etkinliğinin Belirlenmesi .....	8
4.4.1. Minimal Besi Ortamında Pestisit Bozunumunun Belirlenmesi .....	8
4.4.2. <i>Bacillus megaterium</i> ÇD9 izolatının Saksı Ortamında Pestisit Bozunum Etkinliğinin Belirlenmesi .....	9
5.Yenilikçi (İnovatif) Yönü .....	10
6.Uygulanabilirlik.....	11
7.Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması .....	11
8.Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) .....	12
9.Riskler .....	12
10.KAYNAKÇA .....	12

## 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Kültür bitkisi yetiştirilen alanlarda bitkilerin kalitesine ve verimine olumsuz yönde etki eden faktörler arasında bitki hastalık, zararlı ve yabancı otlar gelmektedir. Bitki hastalık, zararlı ve yabancı otların kültür bitkilerine olumsuz etkilerini engellemek veya ortadan kaldırmak amacıyla en yaygın kullanılan mücadele yöntemlerinin başında kimyasal mücadele yer almaktadır. Kimyasal mücadelede kullanılan pestisitler, her ne kadar tarımsal verimliliği arttırmak amacıyla kullanılsa da çevre ve insan sağlığına zararlı etkileri oldukça fazladır. Pestisitlerin zararlı etkilerinin çevredeki doğal bozunma sürecine ve/veya bunlardan kaynaklanan olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılmasına biyoremediasyon denir. Bir diğer ifadeyle biyoremediasyon, kimyasal kirleticileri zararsız formlara dönüştürerek toksik etkilerinin ortadan kaldırılması amacıyla mikroorganizmaların kullanıldığı bir işlemdir. Bu çalışmada da tarımsal alanlarda kullanılan bazı pestisitlerin biyoremediasyonunu (biyolojik bozunmasını) sağlayan bakteriyel izolatların izolasyonu, biyokimyasal-moleküler tanısı ile bu bakteriyel izolatların fungusit, insektisit ve herbisit grubu pestisitlerin bozunması üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; izole edilen *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının farklı pestisit gruplarında yer alan Fungisit [(Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS)], Herbisiti [(Pendimethalin (Cinder 400 CS)] ve İnsektisiti [(Deltamethrin (Decis 2.5 EC)] karbon kaynağı olarak kullanıp, söz konusu pestisitlerin biyoremediasyonuna (biyolojik bozunumuna) neden olduğu hem cansız hem de canlı ortamlardaki denemelerle belirlenmiştir.

## 2. Problem/Sorun

Günümüzde tarımsal üretimde kalite ve verimi artırmak amacıyla bitkileri hastalık ve zararlılardan korumak için bilinçsiz ve aşırı derecede pestisit kullanımı söz konusudur. Özellikle pestisitlerin yüksek dozda ve bilinçsizce kullanımı çevrede pestisit kalıntısına neden olmaktadır. Bunun sonucunda; pestisit kalıntısından kaynaklı çevre kirliliği, insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Şekil 1). Bu olumsuz etkilerin başında pestisit kalıntılı tarımsal ürünlerin tüketilmesi sonucu kanser ve/veya benzeri hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Devletin bu konuda yeterli denetim yapamaması ve üreticinin de hastalık ve zararlılardan kaynaklanan ürün kaybını göze alamaması sonucu pestisit kaynaklı çevre kirliliği problemi çözümsüz hale gelmektedir. Pestisit kalıntısından kaynaklanan sorunlara ileriki yıllarda kalıcı önlem ve çözüm yolları bulunmadığı takdirde, bu problemin daha da katlanarak artacağı düşünülmektedir.



Şekil 1. Modern tarım uygulamalarında aşırı pestisit kullanımını sonucu farklı ortamlardaki pestisit hareketliliği ve yol açabileceği olumsuz sonuçları; (1) Hava, (2) Kara ve (3) Su ortamı (Liu ve ark., 2019).

### 3. Çözüm

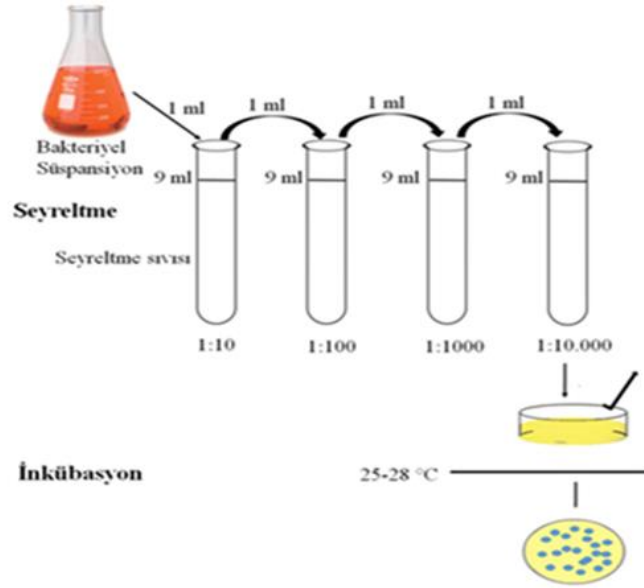
Pestisit kaynaklı çevre kirliliğinin önüne geçebilmek için pestisit kullanımını konusunda devlet denetiminin artırılması ve cezai işlemlerin sağlanması, pestisitler kadar etkili biyolojik mücadele ajanlarının preparat haline getirilip kullanılması, gerekiyorsa çevre dostu pestisitlerin (kullanıldığı zaman kısa sürede parçalanma özelliğindeki pestisitler) kullanımını çevre kirliliğini en aza indirgeyecek çözümler arasında yer alabilir. Bu çalışmada pestisitlerin kalıntı problemini ortadan kaldıracak çevre dostu, biyolojik bir ajanın kullanımını hedeflenmiştir. Bu amaçla; pestisitlerin bozunmasını sağlayacak bakteriyel izolatlar (ÇD1, ÇD2, ÇD8, ÇD9), tarımın yoğun olarak yapıldığı Çarşamba İlçesi Damlataş Köyü'nden toplanan toprak örneklerinden elde edilmiştir. Elde edilen bakteriyel izolatların pestisitlerin bozunmasını sağlayıp sağlamadığını belirlemek için farklı grupta yer alan organizmaları öldüren 3 adet kimyasal ilaç seçilmiştir. Buna göre; fungusları (mantarları) öldürücü etkiye sahip fungusitlerden 25g Fludioxonil +10g MetalaxylM (Maxim XL 035 FS), zararlı böcekleri öldürücü etkiye sahip insektisitlerden 25 g/l Deltamethrin (Decis 2.5 EC) ve yabancı otları öldürücü etkiye sahip herbisitlerden Pendimethalin (Cinder 400 CS) seçilmiştir. Minimal besi ve saksı ortamlarında pestisit bozunum etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan ön denemeler sonucunda; elde edilen 4 bakteriyel izolattan en etkili bulunan *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatı çalışmalarda kullanılmıştır.

Bakteriyel izolatların tanısında biyokimyasal testler ve moleküler tanılama işlemleri yapılmıştır. Pestisit bozunum etkinliğinin belirlenmesinde ise seçilen izolatın minimal besi ortamında ve saksı ortamında pestisit bozunum etkinliği belirlenmiştir. Bu amaçla; minimal besi ortamında *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının gelişimini sağlayabilmek amacıyla karbon kaynağı olarak kimyasal pestisitler kullanılmıştır. Saksı ortamında pestisit bozunum etkinliğinin belirlenmesinde ise hazırlanan bakteriyel süspansiyon püskürtme şişesi yardımıyla domates tohumlarının bulunduğu toprak yüzeyine püskürtülmüştür. Daha sonra aynı toprak yüzeyine herbisit püskürtülmüş ve domates tohumlarının çimlenme oranları belirlenmiştir. Deneme sonucunda söz konusu bakteriyel izolatın, herbisit biyolojik bozunumuna neden olduğu için herbisit domatese olan öldürücü etkisinin ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.

### 4. Yöntem

#### 4.1 Bakteri izolasyonu

Çalışmada; pestisitlerin bozunmasını sağlayacak bakteriyel izolatların elde edilmesi amacıyla tarım alanlarından toprak örnekleri elde edilmiştir. Bu amaçla tarımın yoğun olarak yapıldığı Çarşamba İlçesi'ne ait Damlataş Köyü'ndeki domates yetiştirilen 5 farklı yerden birer kg olacak şekilde toplam 10 adet örnek alınmıştır. Toplanan her bir toprak örneğinden 3 adet olmak üzere, içerisinde 10 ml steril saf su bulunan falkon tüplere 1 g olacak şekilde konulmuş, 24 - 26 °C'de 185 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Elde edilen süspansiyonların  $1 \times 10^{-2}$  -  $1 \times 10^{-4}$  seri seyreltmeleri hazırlanmış ve seyreltilen süspansiyonlardan mikropipet yardımıyla 50 µl alınarak bakterilerin gelişmesi için genel besi ortamı olan NGA'ya damlatılmış ve baget yardımıyla besi ortamı yüzeyine yayılmıştır. Ekim yapılan petriyeler, 25 - 28 °C sıcaklıkta 24 - 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler koloni yapılarına göre ayrılarak saflaştırılmış ve %50'lik steril gliserin içerisine konularak -20 °C'de saklanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Bakteriyel izolasyon aşamaları.

Besi ortamı NGA'nın hazırlanışı; 1 litre su içerisine Peptone 5 g, Beef ekstrakt 3 g, glukoz 2.5 g, agar 15 g konularak pH 7.2 ayarlanıp 121 °C'de 20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiş ve petrilere dökülmüştür.

#### 4.2. Pestisit ve Bakteriyel İzolat Seçimi

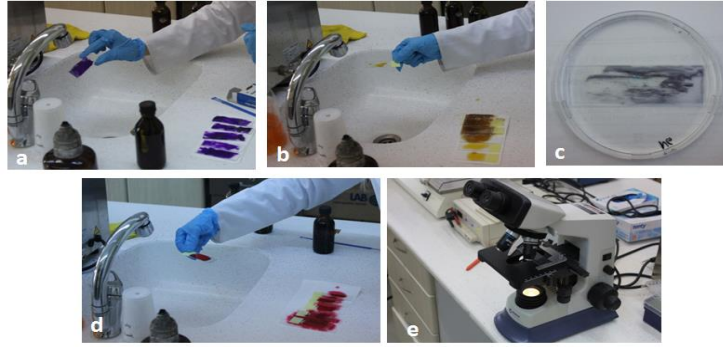
Elde edilen bakteriyel izolatların pestisitlerin bozunmasını sağlayıp sağlamadığını belirlemek için farklı grupta yer alan organizmaları öldüren 3 adet kimyasal ilaç seçilmiştir. Buna göre; fungusları (mantarları) öldürücü etkiye sahip fungisitlerden 25g Fludioxonil+10g Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS), zararlı böcekleri öldürücü etkiye sahip insektisitlerden 25 g/l Deltamethrin (Decis 2.5 EC) ve yabancı otları öldürücü etkiye sahip herbisitlerden Pendimethalin (Cinder 400 CS) seçilmiştir. Minimal besi ve saksı ortamlarında pestisit bozunum etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan ön denemeler sonucunda; elde edilen *Bacillus megaterium*'a ait ÇD1, ÇD2, ÇD8 ve CD9 izolatları arasında en etkili *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatı olmuştur. Bu nedenle tüm çalışmalarda bu izolat kullanılmıştır.

#### 4.3. Bakteriyel izolatların tanısı

##### 4.3.1. Biyokimyasal testler

##### 4.3.1.1. Gram boyama testi

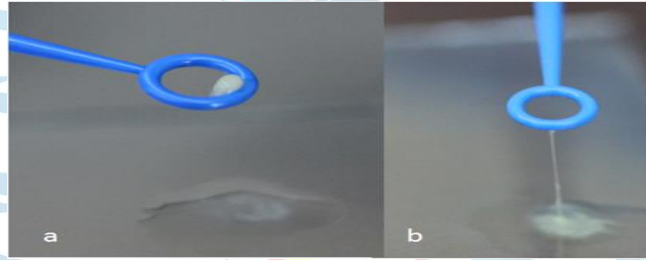
Gram boya işlemleri sonucunda; Kırmızımsı - pembe görünen izolatlar Gram negatif, morumsu - mavi olarak görünen izolatlar ise Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3). Bu test sonucunda 4 izolatın Gram pozitif olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. Gram boyama aşamaları: a) Kristal viole çözeltisi ile boyama; b) Lugol çözeltisi ile boyama; c) %96'lık etil alkolde bekletme; d) Safranin çözeltisi ile boyama; e) Mikroskopta inceleme.

#### 4.3.1.2. KOH testi

Hazırlanan % 3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 25 - 28 °C'de geliştirilen izolatların 24 - 48 saatlik kolonileri, özeyle alınarak solüsyonda dairesel hareketlerle karıştırılmış ve 15 - 20 saniye sonra öze yukarı hafifçe kaldırılmıştır. İpliğimsi bir uzamanın meydana gelmesi pozitif reaksiyon - (izolatın Gram (-), uzamanın meydana gelmemesi ise negatif reaksiyon (izolatın (Gram (+) olduğunu göstermiştir (Şekil 4). Bu testte 4 izolat da negatif reaksiyon göstermiştir. Böylece, izolatların tamamının Gram pozitif olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4. KOH testi; a) *Bacillus megaterium* ÇD9'un negatif reaksiyonu b) *Xanthomonas vesicatoria* türünün pozitif reaksiyonu

#### 4.3.1.3. Katalaz testi

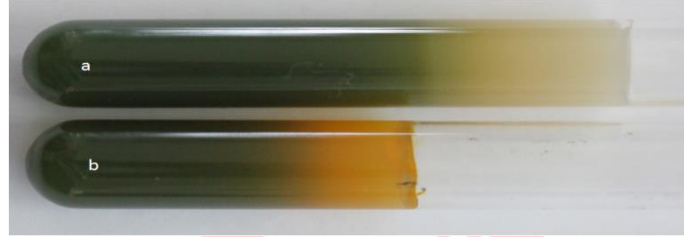
Lam üzerine % 3'lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'ten 1 ml damlatılıp, daha sonra NGA'da 25 - 28 °C'de 24 - 48 saat süreyle geliştirilen izolatlardan bir öze dolusu alınarak çözeltiliye batırılmıştır. Reaksiyon sonucunda hava kabarcıklarının çıkması izolatın pozitif reaksiyon verdiğini göstermiştir (Şekil 5). Bu testte 4 izolatın pozitif reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 5. Katalaz testi; a) Negatif reaksiyon ( $H_2O_2$ ) b) *Bacillus megaterium* ÇD9'un pozitif reaksiyonu.

#### 4.3.1.4. Oksidasyon - fermentasyon testi

Ortam (1 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.2g KCl, 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g bromtimol mavisi, glukoz 10 g, agar 3 g 1 litre saf su) deney tüplerinde sterilize edilmiş ve her izolat için iki tüp kullanılmıştır. Her iki tüpe bir öze dolusu aynı bakteriyel izolattan bulaştırılmış, daha sonra bu tüplerden bir tanesinin üzeri %3'lük agar eklenerek hava ile teması kesilmiştir. İzolatlar 25 - 28 °C'de inkübe edilmiştir. Tüplerdeki ortam renginin zeytin yeşili renkten portakal - sarı renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6). Bu testte 4 izolatın aerobik gelişme gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 6. Oksidatif / fermentatif testi; a) *Bacillus megaterium* ÇD9'un anaerobik ortamda gelişmemesi b) *Bacillus megaterium* ÇD9'un aerobik gelişimi.

#### 4.3.1.5. Karbon kaynaklarının kullanımı testi

İçerisinde karbon kaynaklarının bulunduğu tüplere aday izolatlar aşılanarak 25 - 28 °C'de inkübe edilmiştir. Ortamın mor renginin, krem - sarı renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bu testte 4 izolatın Glukoz, Maltoz ve Riboz karbon kaynaklarını kullandığı belirlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. a) *Bacillus megaterium* ÇD9'un maltoz varlığında negatif reaksiyonu b) *Bacillus megaterium* ÇD9'un glukoz varlığında pozitif reaksiyonu.

#### 4.3.1.6. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

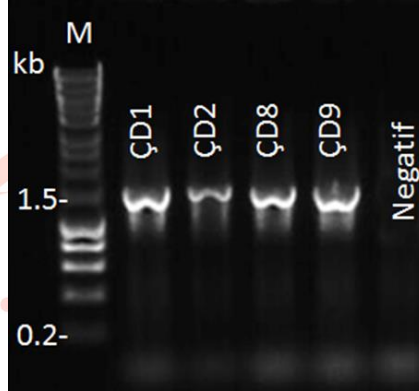
Tütünde aşırı duyarlılık testi tüm izolatların patojen olup olmadığını anlamak amacıyla yapılmıştır. Bu testte, 4 izolatın da tütün yapraklarında ölü - kurumuş alanlar oluşturmadığı görülmüştür. Diğer bir ifade ile bitki patojeni olmadıkları belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu; a) *Bacillus megaterium* izolatlarının negatif reaksiyonu; b) Bitkide patojen olan *Xanthomonas vesicatoria* izolatının aşırı duyarlılık reaksiyonu (pozitif kontrol).

### 4.3.2. Moleküler Tanılama

Elde edilen izolatların moleküler tanılarını yapmak amacıyla 16S RNA sekans analizi için 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 ve 1492R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' primer çifti (Weisburg ve ark., 1991), primer çifti kullanılmıştır. 27F/1492R primer çifti ile yapılan PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Elde edilen izolatların moleküler tanılarını yapmak amacıyla 16S ribozomal RNA sekans analizi için 27F/1492R primer çifti ile yapılan PCR analizi yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. 16S ribozomal RNA sekans analizi sonuçlarının <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinde BLAST değerlendirmesi sonucunda; elde edilen ÇD1, ÇD2, ÇD8 ve ÇD9 izolatları *Bacillus megaterium* olarak tanılanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. 27F/1492R primer çifti ile yapılan %1'lik agaroz jeldeki *Bacillus megaterium* izolatlarının PCR ürünleri.

### 4.4. *Bacillus megaterium*'un Pestisit Bozunum Etkinliğinin Belirlenmesi

*Bacillus megaterium* izolatlarının pestisitlerin bozunması üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar sırasında en etkili olan *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatı için iki farklı deneme kurulmuştur:

#### 4.4.1. Minimal Besi Ortamında Pestisit Bozunumunun Belirlenmesi

Minimal besi yerinde bakteriyel gelişimi sağlayacak hiçbir karbon kaynağı bulunmamaktadır. Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak 3 farklı organizmayı öldürücü etkisi olan Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS), Deltamethrin (Decis 2.5 EC) ve Pendimethalin (Cinder 400 CS) isimli 3 farklı kimyasal ilaç seçilmiştir. Denemede, kimyasal ilaçların kullanma dozları dikkate alınmıştır. Buna göre; Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS) 30 µl, Deltamethrin (Decis 2.5 EC) 3 µl ve Pendimethalin (Cinder 400 CS) 30 µl miktarında her bir tüpe eklenmiştir. Deneme deseni:

1. Negatif Kontrol (karbon kaynağı olmayan minimal besi ortamı)
2. Minimal Besi Ortamı + Karbon Kaynağı + Bakteriyel İzolat

Deneme deseninde yer alan her bir uygulama 5 kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

İçerisinde karbon kaynağı olan falkon tüplerine *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının  $10^8$  hücre/ml'lik süspansiyonundan 10 µl ilave edildikten sonra 5 gün süreyle 28 °C'de 185 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Günlük olarak tüplerdeki bakteriyel gelişimin konsantrasyonu, spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de ölçülmüştür. Deneme sonucunda elde edilen bulgulara göre; en fazla bakteriyel gelişim  $13.78 \times 10^7$  hücre / ml ile Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS) etkili maddeli karışımda görülmüş, bunu sırasıyla  $6.85 \times 10^7$  hücre / ml ile Pendimethalin (Cinder 400 CS) ve  $0.59 \times 10^7$  hücre / ml ile Deltamethrin (Decis 2.5 EC) izlemiştir. Kontrol grubunda ise herhangi bir bakteriyel gelişme olmamıştır (Şekil 10), (Çizelge 1). Deneme



sonucunda; *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatu, farklı pestisit gruplarında yer alan Fungisiti [(Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS)], Herbisiti [(Pendimethalin (Cinder 400 CS)] ve İnsektisiti [(Deltamethrin (Decis 2.5 EC)] karbon kaynağı olarak kullandığı ve bunun sonucunda pestisit bozunumuna neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 10. *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının; a) Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS), b) Pendimethalin (Cinder 400 CS), c) Deltamethrin (Decis 2.5 EC) ve etkili maddeli minimal besi ortamındaki gelişimi.

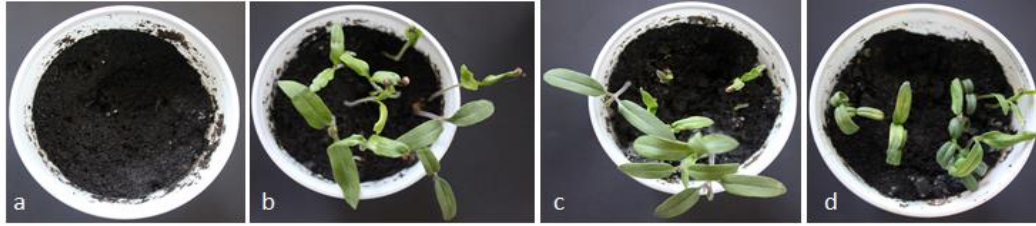
Çizelge 1. *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının içerisinde farklı pestisit bulunan minimal besi ortamındaki gelişimi

İlaç Adı	Uygulama	Ortalama Spektrofotometre OD <sub>600</sub> Değerleri					Ort. OD <sub>600</sub> Değeri	Ortalama Bakteriyel Konsantrasyon $\cong$ (hücre / ml)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün		
Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS) (Fungisit)	Kontrol	0.064	0.064	0.063	0.063	0.063	0.063	$\cong 0.32 \times 10^7$
	İlaç +Bakteri	2.628	2.631	2.726	2.774	2.802	2.712	$\cong 13.78 \times 10^7$
Deltamethrin (Decis 2.5 EC) (İnsektisit)	Kontrol	0.062	0.062	0.062	0.062	0.063	0.062	$\cong 0.31 \times 10^7$
	İlaç +Bakteri	0.109	0.112	0.117	0.121	0.127	0.116	$\cong 0.59 \times 10^7$
Pendimethalin (Cinder 400 CS) (Herbisit)	Kontrol	0.061	0.061	0.061	0.061	0.062	0.061	$\cong 0.31 \times 10^7$
	İlaç +Bakteri	0.929	1.040	1.354	1.694	1.726	1.349	$\cong 6.85 \times 10^7$

#### 4.4.2. *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının Saksı Ortamında Pestisit Bozunum Etkinliğinin Belirlenmesi

*Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının saksı ortamında pestisit bozunumuna neden olup olmadığını belirlemek amacıyla toprağa uygulaması yapılan Pendimethalin (Cinder 400 CS) etkili maddeli herbisit ile domates bitkisi seçilmiştir. Her bardağa 10'ar adet olacak şekilde domates tohumları ekilmiştir. *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının  $10^8$  hücre/ml'lik süspansiyonu püskürtme şişesi yardımıyla domates tohumlarının bulunduğu toprak yüzeyine püskürtülmüştür. Daha sonra aynı toprak yüzeyine Pendimethalin (Cinder 400 CS) etkili maddeli herbisit, kullanma dozunda (3 ml/l) püskürtülmüştür. Kontrol grubu olarak 3 farklı uygulama yapılmıştır. Buna göre; domates tohumları ekildikten sonra toprak yüzeyine sadece; a) Steril su b) Bakteriyel süspansiyon ve c) Pendimethalin (Cinder 400 CS) etkili maddeli herbisit püskürtülmüştür. Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuştur.

Uygulama yapılan plastik bardaklar, 24 - 26 °C’de, 8 saat karanlık ve 16 saat aydınlık ışıklanma periyodu ve % 70 orantılı nemin olduğu ortamda 2 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Bardaklardaki tohumların çimlenme oranları belirlenmiştir. Deneme sonucunda; Kontrol grubundan sadece Pendimethalin uygulaması hariç, diğer uygulamalarda tohum çıkışı %100 olmuştur. Ancak *Bacillus megaterium* ÇD9 + Pendimethalin (Cinder 400 CS) uygulamasında yapraklarda hafif sararmalar meydana gelmiştir (Şekil 11). *Bacillus megaterium* ÇD9 + Pendimethalin (Cinder 400 CS) uygulamasında tohumların tamamının çıkması, bakteriyel izolatın Pendimethalin karbon kaynağı olarak kullanması sonucunda Pendimethalinin bozunumuna neden olduğu ve bu nedenle tohumların çıkışı yaptığı düşünülmektedir.



Şekil 11. *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının Saksı Ortamında Pestisit Bozunum Etkinliğinin belirlenmesi; a) Kontrol (sadece Pendimethalin (Cinder 400 CS) uygulaması), b) Kontrol (sadece steril saf su uygulaması), c) Kontrol (sadece *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatı uygulaması), d) *Bacillus megaterium* ÇD9 + Pendimethalin (Cinder 400 CS) uygulaması.

Türkiye’de bulunan tarım arazilerinde, tarımsal faaliyetlerde rutin olarak kullanılan pestisitler çevreye yayılmaktadır. Çevreye yayılan pestisitlerdeki aktif maddeler çevre için toksik olduğundan canlı organizmalar üzerinde oldukça zararlı etkiye sahiptir. Bu çalışmada, tek karbon kaynağı olarak, pestisiti kullanabilen bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine odaklanılmıştır. Elde edilen *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının farklı pestisi gruplarında yer alan Fungisiti [(Fludioxonil + Metalaxyl-M (Maxim XL 035 FS)], Herbisiti [(Pendimethalin (Cinder 400 CS))] ve İnsektisiti [(Deltamethrin (Decis 2.5 EC)] karbon kaynağı olarak kullandığı ve bu nedenle pestisit bozunumuna neden olduğu hem cansız hem de canlı ortamlardaki denemelerle belirlenmiştir.

##### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Çevre sağlığına önem verildikçe, kimyasal ilaçların bozunma süreci ve bozunma mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalardan biri, insektisit olan Chlorpyrifos etkili maddeli kimyasal ilacın bozunumu için *Achromobacter xylosoxidans* (JCp4) ve *Ochrobactrum sp.* isimli bakteri türlerinin kullanılmasıdır (Akbar ve Sultan, 2016). Ayrıca *Sphingobacterium sp.* isimli bakteri türünün Dichlorobenzen etkili maddeli insektisit bozunumuna (Fang et al., 2010) ve *Streptomyces sp.* isimli bakteri türünün ise Lindane etkili maddeli insektisit bozunumuna neden olduğu belirlenmiştir (Benimeli ve ark., 2008). Pestisit bozunumuyla ilgili yapılan çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir. Bu çalışmada, diğer çalışmalardan farklı olarak; herhangi bir kültür koleksiyonundan değil, topraktan doğrudan bu çalışmaya özgü olarak izole edilen *Bacillus megaterium* türünün pestisit bozunumuna olan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak; elde edilen *Bacillus megaterium* türünün sadece insektisit değil, aynı zamanda fungusit ve herbisit de biyolojik bozunmasına olan etkisi başarılı bulunmuştur. Çalışmamızdaki diğer bir farklılık da izole edilen *Bacillus megaterium* türünün diğer çalışmalarda kullanılan bakteri türlerinden farklılık göstermesidir.

## 6. Uygulanabilirlik

Bu çalışmada elde edilen *Bacillus megaterium* ÇD9 izolatının, pestisit birikimi olan tarım arazilerindeki biyoremediasyonunda düşük maliyetli ve süreklilik arz eden çevre dostu bir araç olarak kullanılması ihtimali oldukça yüksektir. Bu nedenle söz konusu izolatın preparat haline getirilip pestisit kalıntısı yüksek olan ortamlarda kullanılması önerilmektedir. Bu amaçla ticari bir ilaç firmasıyla anlaşılıp, biyolojik ajanın preparat haline getirilmesi düşünülmektedir. Ürün preparat haline getirildikten sonra, pülverizatör yardımıyla toprak yüzeyine püskürtülerek; tarım yapılan alanlarda pestisit kalıntılarının giderilmesi amacıyla bu ürün kullanılabilir. Bu çalışmada elde edilen biyolojik ajanın tütünde aşırı duyarlılık testi sonucuna göre kültür bitkilerine herhangi bir olumsuz etkisi bulunmadığı düşünüldüğünden kültürü yapılan özellikle Fludioxonil + Metalaxyl-M Pendimethalin, Deltamethrin kullanılmış tüm tarım alanlarında kullanılabilir.

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Çizelge 2. Tahmini Maliyet Bütçesi

Kategori – Ürün Adı	Adet	Fiyatı
Bakteriyel izolatların tanısı için kimyasal maddeler ve moleküler tanıda hizmet alımı	4 izolat	5000 TL
Besi ortamları için petri kapları	100 adet	2000 TL
Saksı ve toprak	100 adet / 20 litre	250 TL
Domates bitkisi tohumu	1 Paket	250 TL
<b>Toplam Fiyat</b>		<b>7500 TL</b>

Çizelge 3. Proje Zaman Planlaması

Görevler	AYLAR					
	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran
Konu ile ilgili literatür çalışmaları						
İzolat elde etmek amacıyla toprak örneklerinin toplanması ve izolasyon						
Pestisitlerin biyoremediasyonunu sağlayan izolatların tanı çalışmaları						
Saksı ortamında pestisit bozunum etkinliğinin belirlenmesi						
Sonuçların değerlendirilmesi ve proje detay raporunun yazılması ve yüklenmesi						
Proje detay raporunun açıklanması ve sergi hazırlıklarının tamamlanması						

## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Son yıllarda artan bir nüfusun gıda talebini karşılamak amacıyla tarımsal üretim faaliyetleri önemli derecede artış göstermiştir. Tarımsal ürünlerin kalitesine ve verimine olumsuz yönde etki eden faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla pestisitler kullanılmaktadır. Kimyasal mücadelede kullanılan pestisitler, her ne kadar tarımsal verimliliği arttırmak amacıyla kullanılsa da çevre ve insan sağlığına zararlı etkileri oldukça fazladır. Tarımda verim ve kaliteyi arttırmak amacıyla kullanılan pestisitlerin ortaya çıkardığı çevre kirliliği problemini kaldırmak projemizin esas hedefi olmuştur. Bu nedenle çiftçiler, organik tarım üreticileri, çevre mühendisleri, ziraat mühendisleri bu projenin hedef kitleleri olmuştur.

## 9. Riskler

Risk No	Riskler	B Planı
1	Biyolojik mücadele ajanının etkinlik ömrünün kısa olması	Biyolojik ajanının kullanılmadan hemen önce hazırlanarak etkinliği arttırılacaktır.
2	Biyolojik mücadele ajanının formülize edilememesi - preparat haline getirilememesi	Biyolojik mücadele ajanının formülize edilmesi – preparat haline getirilmesi için ticari bir firmadan destek alınacaktır.
3	Üreticilerin alışageldikleri pestisitleri kullanmaları, preparat haline getirilecek biyolojik ajanımızı kullanmamaları	Preparat haline getirilecek biyolojik ajanımızın pazarda yerini alabilmesi için reklam ve tanıtım çalışmaları yapılacaktır.

## 10. KAYNAKÇA

- Abdallah, O. I., Hanafi, A., Ghani, S. B. A., Ghisoni, S. ve Lucini, L. (2017). Pesticides Contamination in Egyptian Honey Samples. *J. Consum. Prot. Food Saf.* 12: 317–327.
- Akbar, S. ve Sultan, S. (2016). *Soil Bacteria Showing a Potential of Chlorpyrifos Degradation and Plant Growth Enhancement.* *Braz. J. Microbiol.* 47: 563–570.
- Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M. ve Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of Lindane-Contaminated Soil by *Streptomyces* sp. M7 and its Effects on *Zea mays* Growth, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 61, 233-239.
- Chen, S., Sun, D. ve Chung, J. S. (2007). Treatment of Pesticide Wastewater by Moving-Bed Biofilm Reactor Combined with Fenton-Coagulation Pretreatment. *J. Hazard. Mater.* 144: 577–584.
- Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F. ve Yunlong, Y. (2010). Characterization of a Bacterial Strain Capable of Degrading DDT Congeners and its Use in Bioremediation of Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Material*, 184(1), 281-289.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P. ve Elsner, M. (2013). Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. *Science*. 341, 752–758.
- Lehmann, E., Fargues, M., Dibié, J. J. N., Konaté, Y. ve de Alencastro L. F. (2018). Assessment of Water Resource Contamination by Pesticides in Vegetable-Producing Areas in Burkina Faso. *Environ. Sci. Pollut.* 25, 3681–3694.
- Liu, L., Bilal, M., Duan, X., Iqbal, H.M., 2019. Mitigation of environmental pollution by genetically

- engineered bacteria—current challenges and future perspectives. *Sci. Total Environ.* 667, 444–454.
- Nayak, S. K., Dash, B. ve Baliyarsingh, B., (2018). Microbial Remediation of Persistent Agrochemicals by Soil Bacteria: An Overview. *Microb. Biotechnol.* 275–301.
- Singh, B. K. ve Walker A. (2006). Microbial Degradation of Organophosphorus Compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 428–471.
- Tosi, S., Costa, C., Vesco, U., Quaglia, G. ve Guido, G. (2018). A 3-Year Survey of Italian Honey Bee-Collected Pollen Reveals Widespread Contamination by Agricultural Pesticides. *Sci. Total Environ.* 615, 208–218.
- Walter, G. H., Chandrasekaran, S., Collins, P. J., Jagadeesan, R., Mohankumar, S., Alagusundaram, K., Ebert, P. R., Daglish, G. J., Nayak, M. K. ve Mohan, S. (2016). The Grand Challenge of Food Security: General Lessons from A Comprehensive Approach to Protecting Stored Grain from Insect Pests in Australia and India. *Indian J. Entomol.* 78, 7–16.
- Wang, B., Ma, Y. ve Zhou, W. (2011). Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. *World J Microbiol Biotechnol.* 27: 2315–2324.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173 (2), 697-703.
- Zhai, Y., Li, K., Song, J., Shi, Y. ve Yan, Y. (2012). Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *J Hazard Mater.* 221–222.
- Zhang, R., Cui, Z., Jiang, J., He, J., Gu, X. ve Li, S. (2005). Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes. *Can J Microbiol.* 51, 337–343.

