



Determination of herbicide degradation potentials of bacteria isolated from glyphosate applied soil

Cemal KURTOĞLU ^{*1}, Faik CEYLAN ², Sabahattin CÖMERTPAY ¹, İsmail AKYOL ³
ORCID: 0000-0001-5690-5739; 0000-0001-6740-3259; 0000-0003-4850-6927; 0000-0001-8856-0018

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fak., Tarımsal Biyoteknoloji Böl., 46050 Kahramanmaraş, Turkey

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fak., Orman Mühendisliği Böl., 46050 Kahramanmaraş, Turkey

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Ankara, 06110 Turkey

Abstract

Glyphosate (N-phosphonomethylglycine) is a synthetic and non-selective herbicide carrying a stable carbon-phosphate bond (C-P). Although glyphosate residues in the soil are known to have harmful effects on the environment and human health, soil bacteria that use and break down herbicides as a food source are used to reduce these harmful effects. In this study, it was aimed to identify the bacteria isolated from glyphosate-treated agricultural land, belonging to Kahramanmaraş Sütçü İmam University, and to determine their potential to degrade this herbicide. The bacterial colonies to be used for this purpose were obtained by serial selections and the species were identified by using region sequencing and/or protein-based identification through MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) methods. Afterwards, these bacteria were grown in medium containing no carbon source other than 0.1g/L, 0.5g/L and 1g/L of glyphosate, and their absorbance at 600 nm was measured on the 14. day to determine their growth rate. Besides, in order to determine the glyphosate degradation capabilities of these bacteria; the amount of glyphosate remaining in the medium was determined by measuring the absorbance at 570 nm at the end of the same period. Obtained results revealed that none of the isolated bacteria could degrade glyphosate, that glyphosate negatively affected the growth of some bacteria, and that bacteria with the highest growth in the glyphosate-containing medium were *Klebsiella variicola* and *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: glyphosate, soil bacteria, molecular identification, degradation

----- * -----

Glifosat uygulanmış topraktan izole edilen bakterilerin herbisit degradasyon potansiyellerinin belirlenmesi

Özet

Glifosat (N-fosfonometilglisin), kararlı karbon-fosfat (C-P) bağlı, sentetik ve seçici olmayan bir herbisittir. Topraktaki glifosat kalıntılarının çevre ve insan sağlığına zararlı etkileri olduğu bilinmekle birlikte, herbisitleri besin olarak kullanıp parçalanmasını sağlayan toprak bakterilerinden bu zararlı etkileri azaltmak için yararlanılmaktadır. Bu çalışmada, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne ait, glifosat ile muamele edilmiş tarım arazisinden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve bu herbisiti degrade etme potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kullanılacak bakteri kolonileri seri seçimlerle elde edilmiş ve gen bölgesi sekanslaması ve/veya proteine dayalı tanımlama yapan MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) yöntemleri kullanılarak elde edilen bakterilerin tür tanımlanması yapılmıştır. Sonrasında, bu bakteriler 0.1g/L, 0.5g/L ve 1g/L glifosat dışında başka karbon kaynağı içermeyen besiyeri içerisinde yetiştirilmiş ve büyüme hızlarının belirlenmesi için 14. günde 600 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ayrıca, bakterilerin glifosat degradasyon yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla; besiyerlerinde kalan glifosat miktarları, aynı süre sonunda 570 nm'de absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar; izole edilen bakterilerin hiçbirinin glifosatu degrade edemediğini, glifosatın bazı bakterilerin büyümesini olumsuz yönde etkilediğini ve glifosat içeren ortamda büyüme miktarı en yüksek olan bakterilerin *Klebsiella variicola* ve *Klebsiella pneumoniae* olduğunu ortaya koymuştur.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905533818267; Fax.: +905533818267; E-mail: cemalkurtoglu93@hotmail.com

Anahtar kelimeler: glifosat, toprak bakterileri, moleküler tanımlama, degradasyon

1. Giriş

Tarımsal ürünlerde verim kaybı, artan dünya nüfusunun yeterli beslenebilmesi için üstesinden gelinmesi gereken önemli sorunlardan birisidir. Bu sorunun çözümünde kullanılan zirai mücadele yöntemlerinden en yaygın olanı tarım ilacı kullanımıdır. Tarım ilaçlarından dünya genelinde en çok kullanılanı ise herbisitlerdir [1]. Tarımsal olarak yetiştirilen bitkiler ile su, ışık, bitki besin elementleri ve alan bakımından rekabet eden ve bu sebeple verim kayıplarına neden olan yabancı otlar çeşitli herbisitlerin kullanımıyla alandan uzaklaştırılmaktadırlar [2]. Ancak herbisitler, kullanım amaçlarının dışında pek çok soruna neden olabilmektedir. Bu sorunlar ile baş etmedeki etkili yöntemlerden birisi herbisitlerin mikrobiyal parçalanması yaklaşımıdır [3].

Toprağın büyük bir kısmını algler, funguslar ve bakterilerin bulunduğu çeşitli mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmaların topraktaki bazı herbisitleri besin kaynağı olarak kullanabildikleri ve böylece bu herbisitleri parçaladıkları bilinmektedir [4]. Kararlı karbon-fosfat (C-P) bağlı, sentetik ve seçici olmayan sistemik bir herbisit bileşiği olan glifosat [N-(fosfonometil) glisin] [5], tarım, silvikültür, kentsel alanlar ve bahçelerdeki yıllık ve çok yıllık yabancı otlara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır [6, 7, 8].

Glifosatın, diğer herbisitler ile kıyaslandığında daha güvenli olduğu düşünülmeyle birlikte yaygın kullanımının insanlar ve ekolojik çevre için tehlikeli olabileceği belirtilmektedir [9,10]. Bu bağlamda, insan idrar örneklerinde glifosat kalıntısının saptanması, insanların glifosat birikimine maruz kaldıklarının bir göstergesidir [11]. Örneğin, bazı çiftçiler ve aile bireyleri üzerinde yapılan bir çalışmada çiftçilerin %62'sinde, eşlerinin %4'ünde ve çocuklarının %12'sinde glifosata rastlandığı belirtilmiştir [12]. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Başkanlığı'nın 2017 yılı raporuna göre analiz edilen mısır örneklerinin %18'inde ve soya örneklerinin ise %40'ında glifosat kalıntısına rastlanmıştır [13]. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından glifosatın kanserojenik kontaminantlar içerdiği ve muhtemel kansere sebep olduğunu belirten "2A carcinogen" kategorisinde değerlendirilen bir kimyasal olduğu rapor edilmiştir [14]. Öte yandan, glifosatın uygun olmayan aşırı kullanımı sonucunda su ve toprakta birikmelerin meydana geldiği bildirilmektedir [15]. Bu nedenle, genellikle yer altı suları, yüzey suları ve erozyon ile taşınan topraklarda glifosat varlığı tespit edilebilmektedir [16]. Ayrıca, yüzey suları, sediment ve yeraltı sularında glifosatın ana metaboliti olan aminometil fosfonik asite (AMPA) de rastlanmaktadır [17], ve AMPA'nın insan eritrositlerini etkilediği *in vitro* çalışmalar ile ortaya konulmuştur [18].

Glifosatın biyotik veya abiyotik (sıcaklık, ışık degradasyonu) yaklaşımlarla bozunabileceği bilinmektedir. Ancak, glifosatın insan sağlığına olan etkilerini ve çevresel riskleri ortadan kaldırmak için özellikle çevre dostu, biyolojik iyileştirme stratejileri üzerinde durulmaktadır [19]. Bunlardan en önemlisi ise glifosat bozunumunu gerçekleştiren mikroorganizmaların kullanılmasıdır [20]. Bu amaçla yapılan pek çok çalışmada optimum şartlar sağlandığında, verimli glifosat bozunumu kabiliyeti sergileyebilen bakteriler tanımlanmıştır [21, 22].

Bu çalışmada; glifosat uygulanmış Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Avşar Kampüsü tarım arazisinden izole edilen bakterilerde glifosatu degrade etme yeteneğinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Buradan elde edilen sonuçların, glifosatın yarattığı çevresel kirliliğin önlenmesine katkı sunacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Biyolojik materyal

Bakteri izolasyonu için glifosat ile muamele edilmiş toprak örnekleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne (37°35'29.3"N 36°49'27.6"E) ait tarım arazisinden, toprak yüzeyi yaklaşık 5 cm temizlenerek steril şartlarda alınmıştır.

2.2. MSM ve LB besiyeri hazırlanması

Mineral tuz besi ortamı (MSM, mineral salt medium) hazırlamak için 2 g amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), 0.625 g potasyum fosfat (K₂HPO₄), 0.6 g sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄ 2H₂O), 0.2 g magnezyum sülfat (MgSO₄ 7H₂O) ve 0.15 g kalsiyum klorür (CaCl₂ 6H₂O) tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH'sı 7.0 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan besi ortamı 0.22 µm por çapında steril filtre kullanılarak sterilize edilmiştir.

LB besiyeri hazırlamak için 10 g triptofan, 5 g NaCl, ve 5 g maya özütü tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve 10 mL'lik tüplere paylaştırılmıştır. Agarlı besiyeri için MSM besiyerine % (w/v) 1.5 oranında agar ilave edilmiş ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon yapılmıştır.

2.3. Toprakta bakteri izolasyonu

Herbisit uygulandığı bilinen arazilerin farklı yerlerinden toplamda 10 g kadar toprak alınmış ve bu örneğin 5 g'ı 50 mL sterilize edilmiş MSM içerisine konulmuştur. Bu karışıma, ayrıca, son derişimi 0.5 g/L olacak şekilde glifosat ilave edilmiş ve karışım 37°C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, 0.5 g/L glifosat içeren agarlı

MSM petrilere hazırlanmış ve inkübe edilen karışımdaki bakteriler bu petrilere üzerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Gelişen koloniler koloni morfolojileri dikkate alınarak seçilmiş, sonrasında çizme yöntemi yapılarak saf koloniler elde edilmiştir. Koloni saflaştırma işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen saf bakteriler, alınan toprak örneği (X) ve elde edilen bakteri sayısı (Y) bilgilerini yansıtacak şekilde GPKX-Y olarak adlandırılmışlardır.

2. 4. Sanger yöntemi ile nükleotid dizileme

Bakterilerin 16S bölgeleri, evrensel olan 27F (TCCTACGGGAGGCAGCAGT) ve 519R (GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT) primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri dizilim için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ) Sanayi Kamu İşbirliği Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (ÜSKİM) gönderilmiştir. Elde edilen diziler Blast programı kullanılarak Gen-Bank veri tabanındaki (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) diziler ile karşılaştırılarak türlerin tanımlaması gerçekleştirilmiştir.

2. 5. MALDI-TOF yöntemi ile tanımlama

Bakteri örneklerinden elde edilen taze koloniler, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) ile tanımlama yapılmak üzere Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne gönderilmiştir.

2. 6. Glifosatlı ortamda bakterilerin yetiştirilmesi ve büyüme miktarlarının spektrofotometre ile belirlenmesi

0.5 g glifosat tartılarak 10 mL saf su ile çözülmüş ve por çapı 0.22 µm olan steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

10 mL MSM besiyerine stoktan 100 µL (~3.8x10⁷tane) bakteri örneği ve glifosat kimyasalından 0.1 g/L, 0.5 g/L ve 1 g/L derişiminde olacak şekilde ilave edilerek kapaklar sıkıca kapatılmış ve vorteks ile karıştırılmıştır. 14 gün boyunca inkübasyona bırakılan bakterilerin süre sonundaki canlılıklarına LB besiyerine ekim yapılarak bakılmıştır. Bu işlemin uygulanmasında Zhao ve ark. (2015) yöntemi takip edilmiştir [23].

14 gün boyunca inkübe edilen örneklerden 1 mL alınarak spektrofotometre kuvetine koyulmuş ve 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Kör olarak MSM besiyeri kullanılmıştır.

2. 7. Spektrofotometre kullanılarak glifosatin miktar tayini yapılması

İnkübasyonu tamamlanan glifosatlı besin ortamından 1 mL alınarak 5000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantın 100 µL'si 500 µL %96'lık etanol içerisinde hazırlanmış 5 g/100mL ninhidrin ve 500 µL saf su içerisinde hazırlanmış 5 g/100mL sodyum molibdat ile karıştırılmıştır. Karışım 75 °C'de 7 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre kuvetlerine alınarak 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Bu ölçüm metodu Carneiro ve ark. (2015)'ten uyarlanmıştır [24].

2. 8. İstatistiksel analiz

Her bir grup için elde edilen tekrarlı değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının bilinmesi için GraphPad Prism programı (CA, ABD) içerisinde yer alan "unpaired t testi" kullanılmıştır. Karşılaştırma yapılan gruplar için hesaplanan P değerinin 0.05'e eşit ya da ondan küçük olması durumunda, fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve "*" ile işaretlenmiştir. P değerinin sırasıyla 0.01, 0.001 ve 0.0001'den küçük olması durumunda "***, ***, ****" işaretlemeleri kullanılmıştır.

3. Bulgular

3. 1. Tanımlanan bakteriler

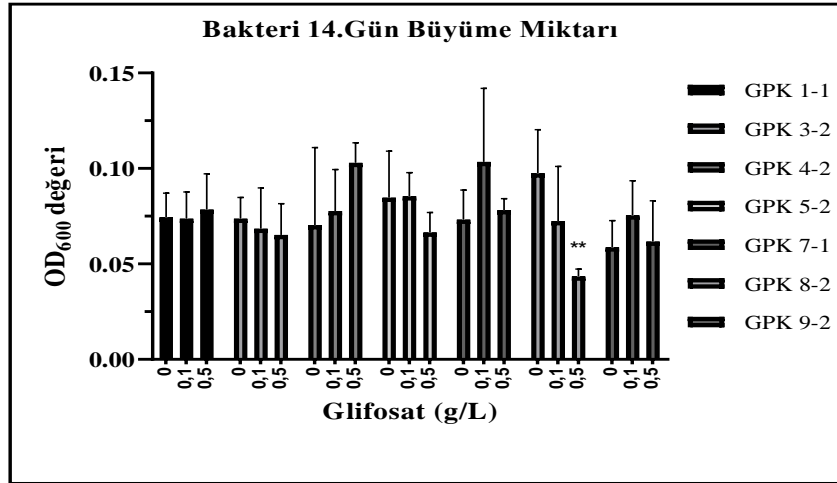
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi sınırları içindeki tarım arazilerinden glifosat kimyasalına maruz kalan topraklardan izole edilerek Sanger ve MALDI-TOF yöntemleri ile tanımlanan bakteriler Tablo 1'de verilmiştir. Hem Sanger dizileme yöntemi hem de MALDI-TOF yöntemi kullanılarak tüm izole edilen bakteri kolonilerinde *Klebsiella variicola* veya *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin varlığı tespit edilmiştir. 0.5 g/L derişiminde glifosat içeren besiyerlerinde tanımlanan bakterilerin, 0.1 g/L glifosat içeren besiyerinde de yetiştiği, 1 g/L derişimindeki besiyerinde ise hiç yetişme göstermediği gözlemlenmiştir.

Tablo 1. Sanger ve MALDI-TOF yöntemi ile tanımlanan bakteriler

Kullanılan yöntem	Bakterinin kodu	Bakterinin türü
Sanger yöntemi	GPK3-2	<i>Klebsiella variicola</i>
	GPK8-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MALDI-TOF	GPK1-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	GPK3-2	<i>Klebsiella variicola</i>
	GPK5-1	<i>Klebsiella variicola</i>
	GPK7-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	GPK8-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

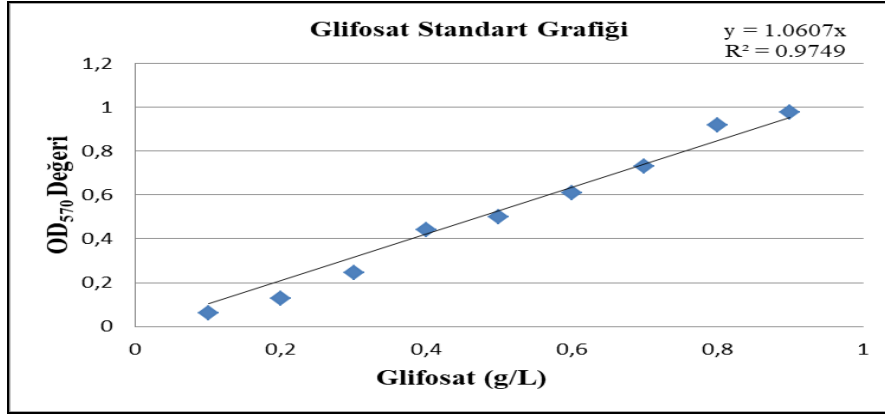
3. 2. Glifosatlı ortamda bakterilerin büyüme miktarlarının spektrofotometre kullanılarak belirlenmesi

MSM besi ortamında 0.1 ve 0.5 g/L glifosat içeren tüplere ekim yapılan bakterilerin 14. gün sonunda büyüme miktarları spektrofotometre cihazı ile 600 nm dalga boyundaki absorbansları aracılığıyla ölçülmüştür. GraphPad Prism programında “unpaired t test” analizi ile 0-0.1 g/L, 0-0.5 g/L ve 0.1-0.5 g/L 14. gün sonu büyüme kolonları kullanılarak istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır (Şekil 1). GPK8-2 kolonisinde bulunan bakterilerden, 0.5 g/L glifosat içeren besiyerindeki bakteri büyüme miktarının hiç glifosat içermeyen (kontrol) besiyerindeki bakteri büyüme miktarına göre anlamlı bir azalma gösterdiği ($P < 0.01$), 0.1 g/L glifosat içeren besiyerindeki bakteri büyümesinin ise kontrole göre önemli bir değişim göstermediği görülmüştür. GPK8-2 kolonisi dışında bu çalışmada tespit edilen tüm diğer GPK serisi kolonilerin bakteri miktarlarında kontrole oranla 0.1 ve 0.5 g/L glifosat içeren besiyerlerinde önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. Glifosat içeren MSM besi ortamdaki GPK serisi bakterilerin 14. gün büyüme miktarları. Her bir bakteri suşu için 0.1 ve 0.5 g/L için elde edilen değerler kendi kontrol grubu (0 g/L) ile karşılaştırılmıştır. **: $P < 0.01$

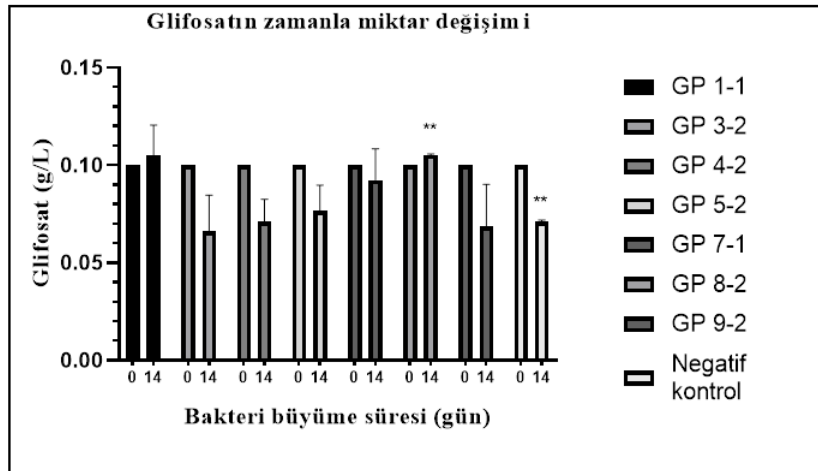
Glifosat standart grafiği çizmek için 0 ile 1 g/L arasında değişen miktarlarda glifosat içeren MSM besiyeri çözeltilerinin 570 nm’de yaptığı absorbans değerleri, sadece MSM içeren kör çözeltilisine karşı okunmuş ve elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 2).

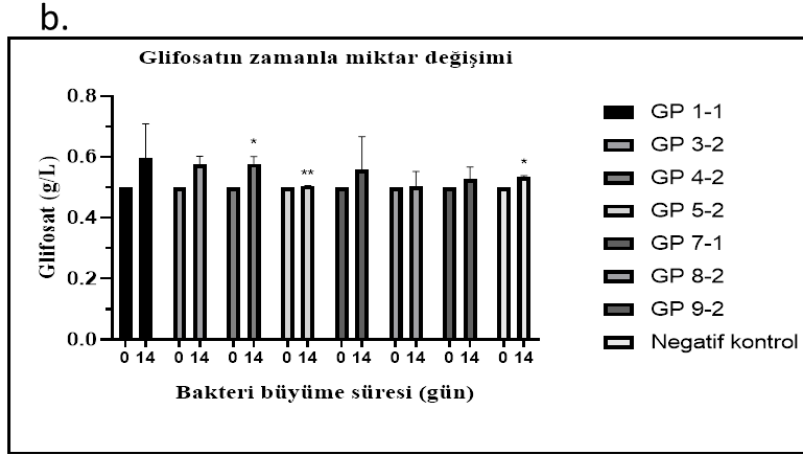


Şekil 2. Glifosat standart grafiği. X: glifosat derişimi (G/L), Y: absorbans değeri, R²: belirleme katsayısı

MSM besi ortamında 0.1 g/L ve 0.5 g/L glifosat içeren tüplere ekim yapılan bakteriler 14. gün sonunda uzaklaştırılarak, çözeltinin 570 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüş ve standart grafik formülü ($y = 1.0607x$) aracılığıyla glifosat derişimi hesaplanmıştır. GraphPad Prism programı kullanılarak “unpaired t test” analizi ile 14. gün sonundaki besiyerlerindeki glifosat miktarının ilk ekim yapılan güne göre değışimleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 3.a ve 3.b). 0.1 g/L glifosat içeren besiyerinde büyütülen GPK8-2 kolonisinin besiyerinde 14. gün sonunda kontrole oranla glifosat miktarında anlamlı bir değışim belirlenirken ($P < 0.01$) GPK1-1 kolonisinin besiyerinde ise anlamlı olmayan bir artış görülmüştür ($P > 0.05$). Bu iki koloni dışındaki kolonilerin 0.1 g/L glifosat içeren besiyerlerinde yetiştirilen bakterilerin besiyerlerinde kontrole kıyasla 14. gün sonundaki glifosat miktarlarında azalmaların anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 3a). Aynı kolonilerin 0.5 g/L glifosat içeren besiyerlerinde yetiştirme sonucunda 0. güne göre 14. günde GPK4-2 kolonisinin besiyerinde istatistiksel olarak $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı bir artış olduğu, GPK5-2 kolonisinin besiyerinde ise istatistiksel olarak $P < 0.01$ düzeyinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu iki koloni dışındaki tüm kolonilerde ise artışın anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 3b).

a.





Şekil 3.a. 0.1 g/L glifosat içeren bakterilerin zamanla değişimi b. 0.5 g/L glifosat içeren bakterilerin zamanla değişimi. Negatif kontrol: bakteri içermeyen ortam. *: P<0.05, **: P<0.01

4. Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Avşar Yerleşkesi içerisinde bulunan, glifosat uygulanmış tarım arazisinden alınan toprak örneklerindeki bakteriler tanımlanmış ve bu bakterilerin glifosatu degrade etme potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Çalışmanın başında, izole edilen iki koloni, GPK3-2 ve GPK8-2, hem sanger metoduna dayalı sekanslama hem de protein analizine dayalı MALDI-TOF yöntemi ile tanımlanmış ve her iki analiz metodu da bu canlıları sırasıyla *Klebsiella variicola* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak belirlemiştir. Bu veriye dayanarak; MALDI-TOF'un sekanslamadan daha hızlı ve daha ekonomik bir metod olması nedeniyle, sonraki tanımlamalarda yalnızca MALDI-TOF metodu kullanılmıştır.

Çalışmamız sonunda glifosatlı ortamda büyüeyebilen iki tür bakteri türü de (*Klebsiella variicola* ve *Klebsiella pneumoniae*) gram-negatif, basil şeklinde, ve hareketsizdir. Bu bakteriler üzerinde yapılan önceki çalışmalarda *K. pneumoniae* türüne ait PL1 suşunun palisiklik aromatik hidrokarbonlardan olan piren ve benzo [a] – piren kimyasallarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı [25], herbisit, insektisit ve boyama sanayisinde kullanılan, birçok organizma için toksik olduğu bilinen tiyosiyanat kimyasalını azot ve karbon kaynağı olarak kullanabildiği [26], metal ve elektro kaplama sanayisinde kullanılan siyanürün biyolojik olarak uzaklaştırılmasında kullanılabileceği [27] belirtilmiştir. Ayrıca, tarım arazilerinde bir insektisit olarak kullanılan endosülfan kimyasalının da bu bakteri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı bildirilmiştir [28]. Öte yandan, *K. variicola* FH-1 suşunun bir herbisit olan atrazin kimyasalını azot kaynağı olarak kullanabildiği bildirilmiştir [29]. Buna ilaveten *K. variicola* bakterisinin endüstriyel boya olarak kullanılan, reaktif kırmızı 198 boyasını bozma kabiliyeti olduğu da gösterilmiştir [30].

Her ne kadar çalışmamız, glifosatu degrade edebilen bir bakteri türünün tanımlanması ile sonuçlanmamışsa da, daha önceki çalışmalarda *Achromobacter* sp. MPK 7A, *Comamonas odontotermitis* P2, *Ochrobactrum intermedium* Sq20 ve *Pseudomonas* sp. 4ASW'nın listelendiği birçok bakteri suşunun glifosatu büyüme besini olarak kullandığı belirtilmiştir [31]. Diğer taraftan, bu çalışmadaki bakteri türleri ile aynı cinste olan *Klebsiella oxytoca* Saw-5 suşunun da molibden indirgemenin yanı sıra topraktaki glifosatu degrade edebilme kabiliyetinin olduğu gösterilmiştir [32]. Bu sebeple, yaygın karbon ve azot kaynağı dışında, yukarıda sayıldığı gibi toksik maddeleri kullanabildiği gösterilen *Klebsiella variicola* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin glifosatu da kullanabilecekleri varsayılmıştır. Ancak çalışmamızdaki sonuçları incelediğimizde; bu kimyasalın bakteriler tarafından kullanılmadığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak; bakterilerin izole edildiği alanların önceki çalışmalardan farklı olması dolayısıyla farklı suşların izole edilmesi ihtimali olarak düşünülmektedir.

Ayrıca, bakterilerde glifosat degradasyon kabiliyetinin gözlenememesinin bir diğer nedeni; çalışılan glifosat dozlarının ilgili bakteriler için toksik olması olabilir. Nitekim önceki çalışmalarda, glifosat degrade edebilen mikroorganizmaların potansiyellerini belirlemek için inkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı ve başlangıç pH'sının yanı sıra glifosat konsantrasyonunun da önemli rol aldığı bildirilmiştir [31]. Bu düşünceyle çalışmamızdaki veriler incelendiğinde Şekil 1'deki GPK3-2, GPK5-2 ve GPK8-2 örneklerinde görülen büyüme miktarlarından 0.1 ve 0.5 g/L glifosat derişimi içeren besiyerlerindeki bakteri büyüme ortalama miktarlarının kontrol grubuna göre azalma gösterdiği görülmektedir. Büyüme miktarlarındaki bu azalma glifosatu 0.1 ve 0.5 g/L derişimlerde *Klebsiella variicola* ve *K. pneumoniae* bakterileri için toksik olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Öte yandan, GPK4-2, GPK7-1 ve GPK9-2 kolonilerinde 0.1 ve 0.5 g/L glifosat derişimlerde yetiştirilen bakterilerin ortalama büyüme miktarlarında artış gözlemlenmiştir. GPK3-2, GPK5-2 VE GPK8-2 kolonilerinde kıyasla bu kolonilerde görülen artış *Klebsiella*

variicola ve *K. pneumoniae* türlerinin olası farklı suşlarının glifosatu karbon kaynağı olarak kullanmada farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

Bakteri büyümesi sonrasında glifosat miktarının ölçümü için Carneiro ve ark (2015)'nin spektrofotometrik yöntemi en uygun yöntem olarak bulunmuştur. Bu yöntem ile Şekil 2'de görülen standart grafik oluşturulmasına rağmen, kimyasalın ölçümü sırasında, bakterilerin ürettiği ürünlerin ve/veya atıkların ölçümler üzerinde belirli bir miktar etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu düşüncenin nedeni; Şekil 3b'de görüldüğü gibi, 14. gün sonunda yapılan ölçümlerde, glifosat miktarının artıyor görünmesidir. Ancak, düşüncemizi test etmeye yönelik deneyler yapılmadığından yorumumuzun bir spekülasyondan öte anlam taşımadığının bilinmesi gerekir.

Sonuç olarak; glifosat uygulanmış Kahramanmaraş tarım arazisi toprağından izole edilen bakteriler *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella variicola* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bakteriler tarafından, bu kimyasalın kullanılma yeteneğinin olmadığı düşünülmüştür. Aksine, bu kimyasalın bakterilere toksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Toksik etkisine rağmen 0.1 g/L glifosat içeren ortamda en iyi büyüme gösteren bakterinin *Klebsiella pneumoniae* suşu olduğu belirlenmiştir.

5. Teşekkür

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

Kaynaklar

- [1] Kitiş, Y. E., Yazır, B., Özgönen Özkaya, H. (2016). The effects of some soil herbicides on root colonization and spore number of mycorrhizal fungi *Glomus intraradices*. *Biological Diversity and Conservation*, 9(2), 1-7.
- [2] Demirkan, H. (2009). Herbisitlere dayanıklılık konusunda dünyada yapılmış bildirimlerin değerlendirilmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 46(1), 71-77.
- [3] Başaran, M. S., Serim, A. T. (2010). Herbisitlerin Toprakta Parçalanması. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24(2), 54-61.
- [4] Kanissery, R. (2018). Herbicide - Nutrient Interactions in Soil: A Short Review. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 15(2). doi: 10.19080/artoaj.2018.15.555951
- [5] Li, H., Joshi, S. R., Jaisi, D. P. (2016). Degradation and isotope source tracking of glyphosate and aminomethylphosphonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), 529-538. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04838
- [6] Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J., Bickerton, G. (2014) Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. *Chemosphere*, 95, 455-463.
- [7] Waiman, C. V., Avena, M. J., Garrido, M., Fernández Band, B., Zanini, G. P. (2012). A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. *Geoderma*, 170, 154-158. doi: 10.1016/j.geoderma.2011.11.027
- [8] Zhang, C., Hu X., Luo, J., Wu, Z., Wang, L., Li, B., Wang, Y., Sun. G. (2015). Degradation dynamics of glyphosate in different types of citrus orchard soils in China. *Molecules*, 20(1), 1161-1175. doi: 10.3390/molecules20011161
- [9] Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., Kahru, A. (2013) Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, 72, 215-224. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.07.005
- [10] Wang, S., Seiwert, B., Kastner, M., Miltner, A., Schaffer, A., Reemtsma, T., Yang Q, Nowak K. M. (2016). Biodegradation of glyphosate in watersediment microcosms a stable isotope co-labeling approach. *Water Research*, 99, 91-100. doi: 10.1016/j.watres.2016.04.041
- [11] Niemann, L., Sieke, C., Pfeil, R., Solecki, R. (2015). A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 10, 3-12. doi: 10.1007/s00003-014-0927-3.
- [12] Campbell, A. W. (2014). Glyphosate: Its Effects on Humans. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 20(3), 9-11.
- [13] Pesticide Residue Monitoring Program Fiscal Year 2017 Pesticide Report. (2017). USA, U.S. Food and Drug Administration.
- [14] Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, doi: 10.1007/s13412-018-0517-2.
- [15] Hanke, I., Wittmer, I., Bischofberger, S., Stamm, C., Singer, H. (2010). Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, 81(3),422-429. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.067
- [16] Shushkova, T., Ermakova, I., Leontievsky, A. (2010). Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation*, 21(3), 403-410.
- [17] Grandcoin, A., Piel, S., Baures, E. (2017). Amino methyl phosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*, 117, 187-197. doi: 10.1016/j.watres.2017.03.055.
- [18] Kwiatkowska, M., Huras, B., Bukowska, B. (2014). The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109, 34-43. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.01.003.
- [19] Lupi, L., Miglioranza, K.S., Aparicio, V. C., Marino, D., Bedmar, F., Wunderlin, D. A. (2015). Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment*, 536, 687-694. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.090
- [20] Mercurio, P., Flores, F., Mueller, J. F., Carter, S., Negri, A. P. (2014). Glyphosate persistence in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), 385-390. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.021
- [21] Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., Tao, K. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(4), 263-271. doi: 10.2323/jgam.58.263

- [22] Firdous, S., Iqbal, S., Anwar, S. (2017). Optimization and modeling of glyphosate biodegradation by a novel *Comamonas odontotermitis* P2 through response surface methodology, *Pedosphere*, doi:10.1016/S1002-0160(17)60381-3.
- [23] Zhao, H., Tao, K., Zhu, J., Liu, S., Gao, H., Zhou, X. (2015). Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. Strains isolated from contaminated soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61, 165-170. doi: 10.2323/jgam.61.165
- [24] Carneiro, R. T. A., Taketa, T. B., Gomes Neto R. J., Oliveira, J. L., Campos, E.V.R., Moraes, M. A., Silva, C. M. G., Beppu, M. M., Fraceto, L. F. (2015). Removal of glyphosate herbicide from water using biopolymer membranes. *Journal of Environmental Management*, 151, 353-360. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.01.005
- [25] Pipke Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu M., Tang, T., Li, Z., Zhao, H. (2014). Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumoniae* PL1 and its potential use in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3819. doi: 10.1007/s00253-013-5469-6
- [26] Chaudhari, A. U., Kodam, K. M. (2010). Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1167-1174. doi: 10.1007/s00253-009-2299-7
- [27] Avcioglu, N. H., Bilkay I. S. (2019). Cyanide Removal in Electroplating, Metal Plating and Gold Mining Industries Wastewaters by Using *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* Species. *European Journal of Biological Research*, 78(1), 5-10.
- [28] Kwon, G. S., Kim, J. E., Kim, T. K., Sohn, H. Y., Koh, S. C., Shin K. S., Kim, D. G. (2002). *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 255-259. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11399.x
- [29] Zhang, J., Liang, S., Wang, X., Lu, Z., Sun, P., Zhang H., Sun, F. (2019). Biodegradation of Atrazine by the Novel *Klebsiella variicola* Strain FH-1. *Hindawi BioMed Research International*, 4, 1-12. doi: 10.1155/2019/4756579
- [30] Eslami, H., Shariatifar. A., Rafiee, E., Shiranian, M., Salehi, F., Hosseini S. S., Eslami. G., Ghanbari. R., Ebrahimi, A. A. (2019). Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis*-*Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 38. doi: 10.1007/s11274-019-2608-y.
- [31] Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 5033-5043. doi: 10.1007/s00253-018-9035-0.
- [32] Sabullah, M.K., Rahman, M.F., Ahmad, S.A., Sulaiman, M.R., Shukor, M.S., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y. (2016). Isolation and Characterization of A Molybdenum-Reducing and Glyphosate-Degrading *Klebsiella oxytoca* Strain Saw-5 in Soils from Sarawak. *AGRIVITA*. 38(1), 1-13. doi: 10.17503/agrivita.v38i1.654.