

## TINLI BİR TOPRAĞIN KATALAZ AKTİVİTESİ VE KİNETİĞİ ÜZERİNE 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit) HERBİSİTİNİN ETKİSİ

İmanverdi EKBERLİ\*

Nalan KARS

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü ve Bitki Besleme Bölümü, Samsun/Türkiye  
\*e-mail: iman@omu.edu.tr

Geliş Tarihi: 07.10.2010

Kabul Tarihi: 13.09.2011

**ÖZET:** Bu çalışmada, tın bünyeli toprağa artan düzeylerde (0.5 ppb, 1 ppb ve 2 ppb) 2,4-D herbisit uygulanmasının farklı substrat konsantrasyonları ve zamana bağlı olarak toprakların katalaz enzim aktivitesi değişimleri ve bu enzim reaksiyonunun kinetik parametreleri ( $V_{max}$ ,  $K_m$  ve  $V_{max}/K_m$ ) üzerine etkisi inkübasyon denemesi ile araştırılmıştır. Bu amaçla deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 paralelli olarak OMÜ Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü laboratuvarında kurulmuş ve yürütülmüştür. Deneme süresince topraklardan eksilen su miktarı her gün tartılarak maksimum su kapasitesinin %40'ı seviyesinde olacak şekilde tamamlanmıştır. Denemenin 15., 30., 45., 60., 75., ve 90. günlerinde alınan toprak örneklerinin katalaz enzim aktiviteleri belirlenerek bu enzime ait kinetik parametreler hesaplanmıştır. Tın bünyeli toprağa artan düzeylerde 2,4-D herbisit uygulanmasında, dozların katalaz enzim aktivitesine etkisi önemsiz seviyede iken inkübasyon dönemleri arasında önemli farklılıklar ( $P<0,01$ ) belirlenmiştir. Inkübasyonun 30. gününde maksimum katalaz aktivitesi değeri kontrolde 189.2 ml  $O_2$   $g^{-1}$ , 1 ppb herbisit uygulamasında ise 198.9 ml  $O_2$   $g^{-1}$  olarak saptanmıştır. En yüksek  $V_{max}$  değeri de inkübasyonun 30. gününde belirlenmiş ve 1 ppb herbisit uygulamasında ortalama 0.442 ml  $O_2$   $g^{-1}$  elde edilmiştir. En yüksek ortalama  $K_m$  değeri (1.440 ml  $O_2$   $sn^{-1}$ ) kontrolde, en düşük  $K_m$  değeri (1.214 ml  $O_2$   $sn^{-1}$ ) ise 0.5 ppb herbisit uygulamasında meydana gelmiştir. Ortalama  $V_{max}/K_m$  değerleri sırasıyla kontrol, 0.5; 1 ve 2 ppb herbisit uygulamaları için 0.645; 0.446; 0.425 ve 0.513  $sn^{-1}$  olarak belirlenmiştir

**Anahtar Sözcükler:** Toprak, katalaz aktivitesi, herbisit, kinetik parametreler

### EFFECT OF 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid) HERBICIDE ON CATALASE ACTIVITY AND KINETIC PARAMETERS OF A LOAMY SOIL

**ABSTRACT:** In this study, effects of increasing dose application (0.5 ppb, 1 ppb and 2 ppb) of 2,4-D herbicide on changes in catalase enzyme activity and kinetic parameters ( $V_{max}$ ,  $K_m$  and  $V_{max}/K_m$ ) in a loamy soil were investigated depending on substrate concentration and incubation time. For this purpose, an experiment was conducted in a randomized plot design with three replicates and carried out at the laboratory of Soil Science Department of Agricultural Faculty at Ondokuzmayis University. During the experiment, decreased moisture level in soils was completed to 40% of maximum moisture holding capacity by weighing everyday. Catalase enzyme activity was determined in soil samples taken 15., 30., 45., 60., 75. and 90. days of the experiment, and kinetic parameters of this activity were also calculated. In increasing applications of 2,4-D herbicide, significant differences ( $P<0,01$ ) were determined among the incubation periods while the effect of increasing doses on catalase enzyme activity was not significant. The highest catalase activity in 30 days of incubation was determined in control as 189.2 ml  $O_2$   $gr^{-1}$  and in 1 ppb herbicide application as 198.9 ml  $O_2$   $g^{-1}$ . The highest mean  $V_{max}$  value was also obtained in 1 ppb herbicide application as 0.442 ml  $O_2$   $g^{-1}$  in 30 days of incubation. While the highest mean value of  $K_m$  (1.440 ml  $O_2$   $sec^{-1}$ ) was determined in control, the lowest value of  $K_m$  (1.214 ml  $O_2$   $sec^{-1}$ ) was determined in 0.5 ppb herbicide application. Mean  $V_{max}/K_m$  values of control, 0.5; 1 and 2 ppb herbicide applications were 0.645; 0.446; 0.425 and 0.513 ( $sec^{-1}$ ), respectively.

**Key words:** Soil, catalase activity, herbicide, kinetic parameters.

## 1. GİRİŞ

Toprakların enzim aktiviteleri ile enzim kinetikleri, toprakların biyolojik özellikleri ve antropojen faktörlerin (gübreleme, sulama, tarımsal mücadele ilaçlarının topraklara uygulanması vb.) etkisi ile biyolojik özelliklerindeki değişimi detaylı olarak gösterebilmektedir. Antropojen etkiler sonucunda, topraktaki mikroorganizmaların popülasyonu ile bunların aktivitesi ve mikrobiyal kaynaklı enzim aktivitelerinde de önemli değişimler olmaktadır. Tarımsal alanlarda birim alandan daha fazla ürün elde etmenin yollarından birisi de yabancı otlara karşı uygulanan ve herbisit olarak adlandırılan bitki koruma ilaçlarıdır.

Topraklara uygulanan herbisitlerin toprak enzimlerine ve bu enzimlerin kinetiği üzerine olan etkileri herbisitinin uygulama şekline, dozuna ve

herbisitin kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir (Greaves ve ark., 1976; Mostafa ve ark., 2006).

1940'lı yılların ortalarında geliştirilmiş olan 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) herbisiti, organik bir kimyasal olup, ana bileşeni asitten meydana gelmektedir (Keller ve ark., 1994). Özellikle 1950'li yılların başından itibaren kullanılmaya başlayan 2,4-D herbisiti, toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak toprak mikroorganizmaları gibi toprak özelliklerine farklı düzeylerde etki yapmaktadır. Bu nedenle, değişik ülkelerde 2,4-D herbisiti üzerinde yapılan çok sayıda deneme sonucunda elde edilen optimum uygulama dozları arasında farklılıklar görülmektedir.

Herbisitlerin tavsiye edilen düzeyde uygulanması, toplam toprak mikrofloranın gelişimini ciddi olarak engellemekte, ancak hakim mikroorganizma gruplarında değişiklikler oluşturabilmekte veya

topraktaki biyolojik süreçlerin oluşum hızını 2,4-D herbisitinin %75-80'ninin parçalanarak topraklarda etkisinin yok olma süresi yaklaşık olarak 4 hafta olup, sıcaklık, pH, havalandırma, toprağın organik madde içeriği gibi çevresel faktörlerdeki değişiklikler bu süreyi etkilemektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Topraklara bulaşan herbisitler, mikroorganizma grupları tarafından farklı şekillerde etkilenebilmektedir. Anaerob bakteriler, aerob bakterilerle karşılaştırıldığında 2,4-D herbisitine karşı daha duyarlı olmaktadır. Herbisitlerin toprak mikroflorasına etkisi, toprakların fiziksel, kimyasal özelliklerine ve toprak işleme yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Topraklara uygulanan herbisitlerin toprak mikroflorasında meydana getirdiği olumsuz etki; organik maddesi düşük, hafif bünyeli topraklarda, organik maddesi yüksek ağır bünyeli topraklarla karşılaştırıldığında daha fazladır. Optimum düzeyde 2,4-D herbisit uygulaması, topraktaki mikroorganizmaların faaliyetine olumsuz etki yapmamakta, buna karşın düşük doz uygulamalarında toprakların mikrobiyolojik aktivitesi artmaktadır. Aynı zamanda topraktaki mikroorganizmalar, herbisitleri C ve enerji kaynağı olarak kullanabilmekte ve bunun sonucunda da herbisit parçalanarak ayrışmaktadır. Bu ayrışma üzerine de toprakların fiziko-kimyasal özellikleri ile herbisit topraktaki davranışları, uygulama dozu ve kimyasal kompozisyonu da büyük oranda etki etmektedir (Rankov ve Velez, 1976; Voynova-Raykova ve ark., 1986, Weber, 1990, Kızılkaya, 1997).

Toprakların enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan  $K_m$  (Michaelis sabiti) ve  $V_{max}$  (enzim reaksiyonunun maksimum hızı) temel kinetik parametrelerdir. Toprak enzimlerine ait kinetik parametrelerin saptanması, söz konusu enzimin orijini ve toprak özellikleri ile çevresel faktörlerin enzim reaksiyonlarının her bir aşamasındaki etkisini ortaya koymaktadır.  $V_{max}/K_m$ , toprakta enzim-substrat kompleksinin meydana gelmesi ile bu kompleksten ürün oluşumunun karşılaştırılmasını ifade etmektedir. Bu oranın yüksek oluşu, enzim-substrat kompleksinin dağılımının oluşumuna göre daha çabuk olduğunu göstermektedir (Tabatabai ve Bremner 1971; Tabatabai 1973; Aliev ve ark. 1981; Ekberli ve Kızılkaya, 2006; Ekberli ve ark., 2006).

Bu çalışmada, tınlı bir toprağın katalaz aktivitesi ve kinetik parametreleri ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) üzerine 2,4-D amin aktif maddeli herbisitinin etkisi incelenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Denemede kullanılan toprak örneği, Samsun iline bağlı Bafra ilçesinin 41°36.602' Kuzey, 35°54.564' Doğu koordinatlarında yer alan tarım arazisinden 0-20 cm'lik toprak derinliğinden alınmıştır. Alınan toprak örneği gölgede kurutulduktan sonra dövülmüş,

değiştirebilmektedir (Berim,1971;Rizvanov ve ark.,1981). 2 mm'lik elekten geçirilmiştir. Denemede kullanılan 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) herbisiti ise OMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden temin edilmiştir. Toprağın bünyesi hidrometre yöntemine göre (Bouyoucos, 1951); toprak reaksiyonu (pH) 1:1 toprak: su karışımında cam elektrodlu pH metre ile (Peech, 1965), elektriksel iletkenlik değerleri ( $EC_{25^{\circ}C}$ ) EC metre ile (Brower ve Wilcox, 1965); kireç kapsamı ( $CaCO_3$ ) Scheibler kalsimetresinde (Hızalan ve Ünal, 1966); organik madde Walkey-Black (Walkey, 1946); toplam azot (N) ise Kjeldahl yöntemine göre (Bremner, 1965) belirlenmiştir.

### 2.1. İnkübasyon Denemesi

İnkübasyon denemesi tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 paralel olarak kurulmuştur. Bu amaçla, hava kuru toprak örneğinin 250 gr'lık miktarları plastik saksılara konulmuş, üzerlerine 0.5; 1.0 ve 2.0 ppb dozlarında 2,4-D herbisit ilavesi yapılmıştır. Uygulanan dozlar bu herbisit Türkiye'deki uygulama dozlarına göre seçilmiştir (Anonymous, 2010). Herbisit ilavesi yapılmayan saksılar kontrol olarak kabul edilmiştir. Saksılardan eksilen su miktarı her gün eklenerek nem düzeyi maksimum su tutma kapasitesinin %40'ı seviyesinde tutulmuştur. İnkübasyon denemesi toplam 90 gün sürmüş ve toplam 72 saksıdan [1 (toprak) x 3 (paralel) x 4 (kontrol+ 3 doz) x 6 (inkübasyon dönemi)] oluşmuştur.

İnkübasyonun 15, 30, 45, 60, 75 ve 90. günlerinde saksılardan alınan toprak örneklerinin katalaz enzim aktivitesi (EC 1.11.1.6) Beck (1971)' e göre hacimsel olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 5 gr toprak örneği üzerine 10 ml fosfat tampon (pH 7) ve 5 ml %3'lük substrat ( $H_2O_2$ ) çözeltisi ilave edilmiştir. 3 dakika sonunda laboratuvar sıcaklığında (20°C) açığa çıkan  $O_2$  miktarı hacimsel olarak belirlenmiştir. Her analiz 3 paralelli yapılmış ve elde edilen bulgular "ml  $O_2$  gr<sup>-1</sup> kuru toprak" olarak ifade edilmiştir.

### 2.2. Kinetik Parametreler

Katalaz enzimine ait kinetik parametrelerin ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}/K_m$ ) belirlenmesi amacıyla, 90 günlük deneme periyodu boyunca denemenin 15, 30, 45, 60, 75 ve 90. günlerinde saksılardan alınan toprak örneklerinde farklı inkübasyon zamanları (0.25; 0.50; 0.75; 1.0; 2.0;..., 39 dakika) ile substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) %0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %15, %20, %25 ve %30 olmak üzere 11 farklı konsantrasyonunda katalaz aktivitesi tayinleri yapılmıştır.  $V_{max}$ ,  $K_m$  kinetik parametrelerin saptanması amacıyla Michaelis- Meten denkleminin [ $v = V_{max}[S] / (K_m + [S])$ ] Lineweaver-Burk tarafından lineerize edilmiş aşağıdaki ifadesinden kullanılmıştır (Tabatabai ve Bremner, 1971; Tabatabai 1973; Aliev ve ark., 1981; Palmer 1981; Khabirov ve Kuvatov, 1990; Atkins 1998; Ekberli ve Kızılkaya. 2006; Ekberli ve ark., 2006; Kızılkaya ve ark., 2007; Kızılkaya ve Ekberli, 2008):

Burada, v-başlangıçtaki hız, ml O<sub>2</sub> gr<sup>-1</sup>sn<sup>-1</sup>; [S] – substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) konsantrasyonu, %; V<sub>max</sub>-maksimum başlangıç hızı, ml O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> sn<sup>-1</sup>; K<sub>m</sub>-Michaelis sabiti, ml O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>dir.

1/v ve 1/[S] arasındaki doğrusal regresyon ilişkisinde 1/[S]=0'daki başlangıç ordinatı 1/V<sub>max</sub> olup, K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> eğiminden ise K<sub>m</sub> bulunmaktadır.

Deneme sonucunda elde edilen bulgulara ait istatistiksel analizler SPSS 10.1 paket programında yapılmış ve elde edilen sonuçlar Yurtsever (1984) tarafından bildirildiği şekilde değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Deneme Toprağının Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

Denemede kullanılan toprak örneği tın (L) bünyeye sahip olup, tuzsuz, alkalın reaksiyonlu, orta kireçli, organik madde kapsamı az, toplam azot yönünden ise düşük seviyededir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Deneme toprağının bazı özellikleri

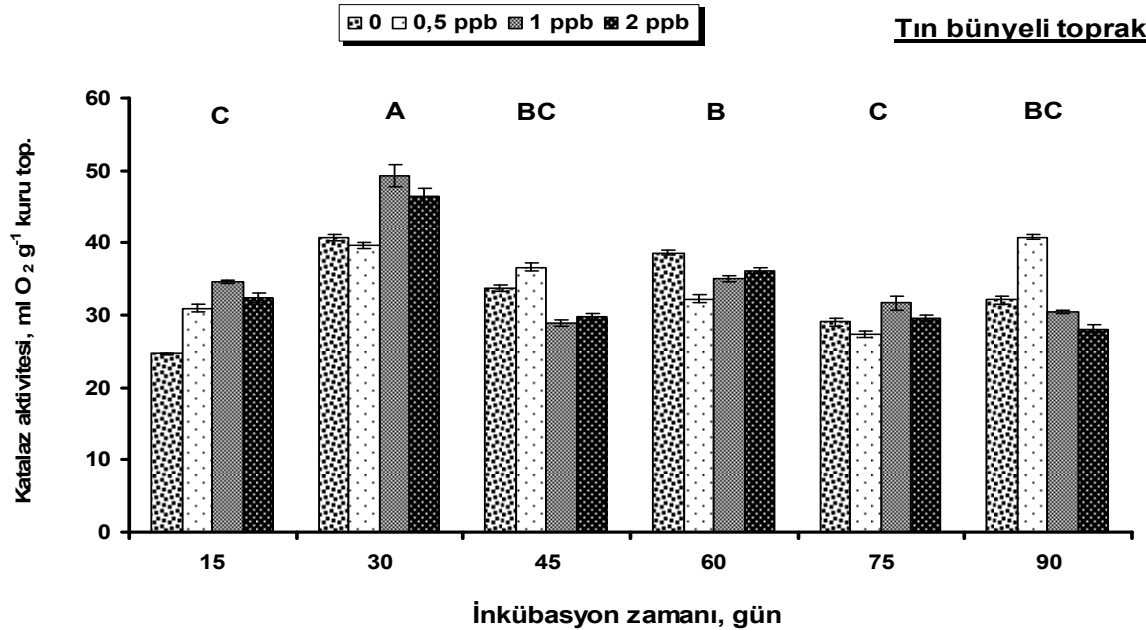
Kil, %	18.32
Silt, %	37.86
Kum, %	43.95
Bünye	Tın (L)
Organik madde, %	1.96
Kireç (CaCO <sub>3</sub> ), %	11.02
pH <sub>1</sub> (1:1)	8.2
EC (1:1), dSm <sup>-1</sup>	0.31
Toplam azot (N), ppm	580
C/N	19.65

$$1/v = (K_m/V_{max}) 1/[S] + 1/V_{max}$$

#### 3.2. 2,4-D Herbisitinin Katalaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

2,4-D herbisitinin tın bünyeli toprağa artan dozlarda uygulamasının katalaz aktivitesi üzerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 1'de verilmiştir. Toprağa artan düzeylerde ilave edilen 2,4-D herbisitinin katalaz enzimine etkisi önemsiz seviyede iken, inkübasyon dönemleri arasındaki değişimler önemli (P< 0.01) bulunmuştur. Maksimum katalaz aktivitesi seviyesi 30. günde ortaya çıkmış, bu dönemden sonra meydana gelen değişimler ise kararlılık göstermemiştir. İnkübasyon dönemleri arasında katalaz aktivitesindeki değişimler, herbisit uygulama dozları ile beraber, hem bünye bileşenlerinden hem de besin maddesi ve ortamdaki mevcut mikrofloradan kaynaklanabilmektedir.

Toprağa artan düzeyde uygulanan 2,4-D herbisitinin özellikle inkübasyon başında kontrole göre katalaz aktivitesini artırdığı, inkübasyonun ilerleyen dönemlerinde ise azalttığı saptanmış, ancak meydana gelen bu değişimler istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Tu ve ark. (2001), 2,4-D'nin düşük konsantrasyonlarının canlı organizmanın RNA, DNA ve protein sentezini uyarabildiğini, kontrolsüz hücre bölünmesine ve gelişmesine yol açabildiğini, diğer taraftan yüksek konsantrasyonlarının ise hücre bölünmesini ve gelişmesini engelleyerek organizmanın ölümüne neden olabileceğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalar topraklara uygulanan pestisitlerin toprak mikroorganizmaları ile bunların aktiviteleri veya mikroorganizmaların aracılık ettiği biyokimyasal süreçler üzerindeki etkilerinin çok



Şekil 1. Topraklara uygulanan 2,4-D herbisitinin artan dozlarının 90 günlük inkübasyon periyodu boyunca tın bünyeli toprakta katalaz enzim aktivitesine etkisi (Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında P<0.01 olasılıkla farklılık yoktur).

değişken olduğunu ortaya koymuştur (Olson ve Lindwall, 1991; Kızılkaya ve Arcak, 1996; Kızılkaya ve Aksoy, 1999; Kızılkaya, 2000). Bu değişimler, uygulanan pestisit dozuna, formülasyonuna, toprak ve çevresel koşullara göre değişmektedir. Çeşitli pestisitler mikrobiyal popülasyona uyarıcı veya engelleyici yönde etki edebildiği gibi, mikrobiyal popülasyon ve aktivitesi üzerine etkisiz de olabilir (Sylvestre ve Fournier, 1979; Haktanır, 1989). Bu çalışmada da, tın bünyeli toprağa uygulanan 2,4-D herbisitinin denemede kullanılan uygulama dozlarının katalaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir.

### **3.3. Substrat Konsantrasyonu ile Ölçüm Zamanına Bağlı Olarak Katalaz Aktivitesi Arasındaki İlişkiler**

Toprağa artan düzeyde uygulanan 2,4-D herbisitinin 90 günlük inkübasyon periyodu boyunca katalaz enziminin kinetiği üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak kullanılan hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) 11 farklı konsantrasyonu kullanılarak, belirli zamanlarda açığa çıkan  $O_2$  miktarı hacimsel olarak belirlenerek katalaz aktivitesi hesaplanmıştır. Artan substrat konsantrasyonlarında ve belirli zamanlardaki katalaz aktivitesindeki değişimler Şekil 2 ve Çizelge 2’de verilmiştir.

Şekil 2’den görüldüğü gibi, artan substrat konsantrasyonlarında toprağın katalaz aktivitesi ile ölçüm zamanı arasında hiperbolik bir ilişkinin bulunduğu saptanmış olup, substrat konsantrasyonu arttıkça katalaz aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar (Aliev ve ark.,1981; Khabirov ve Kuvatov, 1990; Kızılkaya ve ark., 2007) artan substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasındaki ilişkilerin hiperbolik olduğunu ortaya koymuştur. Ekberli ve Kızılkaya (2006), solucan dışkısı ve toprağın katalaz enzimi ile kinetiğinin araştırıldığı çalışmada,  $H_2O_2$  konsantrasyonu ile katalaz aktivitesi arasında hiperbolik bir ilişki saptamışlar ve bu çalışmaya benzer şekilde substrat konsantrasyonu arttıkça katalaz aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir.

Artan düzeylerde 2,4-D herbisitinin uygulandığı toprakta inkübasyon dönemlerine bağlı olarak substrat konsantrasyonu arttıkça açığa çıkan  $O_2$  miktarının ve dolayısıyla katalaz aktivitesinin sabitleştiği süre de artmaktadır. Katalaz aktivitesinin toprakta %30’luk  $H_2O_2$  konsantrasyonunda 15-33 dakikalar arasında (Çizelge 2) sabitleştiği belirlenmiştir. Bu durum kuşkusuz denemede kullanılan toprağın bünyesi, havalanma durumu, adsorbsiyon kapasitesi ve ortamdaki mevcut mikroflora ile ilgilidir. Toprağa 2,4-D uygulamasında tüm  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında maksimum katalaz aktivitesi 30. günde saptanmıştır (Çizelge 3).

### **3.4. Tın bünyeli toprağa 2,4-D herbisitinin uygulanması sonucunda katalaz enzimine ait kinetik parametrelerdeki değişimler**

Tın bünyeli toprağa artan dozlarda 2,4-D herbisiti uygulanmasında farklı substrat konsantrasyonları ile reaksiyon hızları ( $v$ ,  $mlO_2 g^{-1} sn^{-1}$ ) arasındaki ilişki Şekil 3’de verilmiştir.

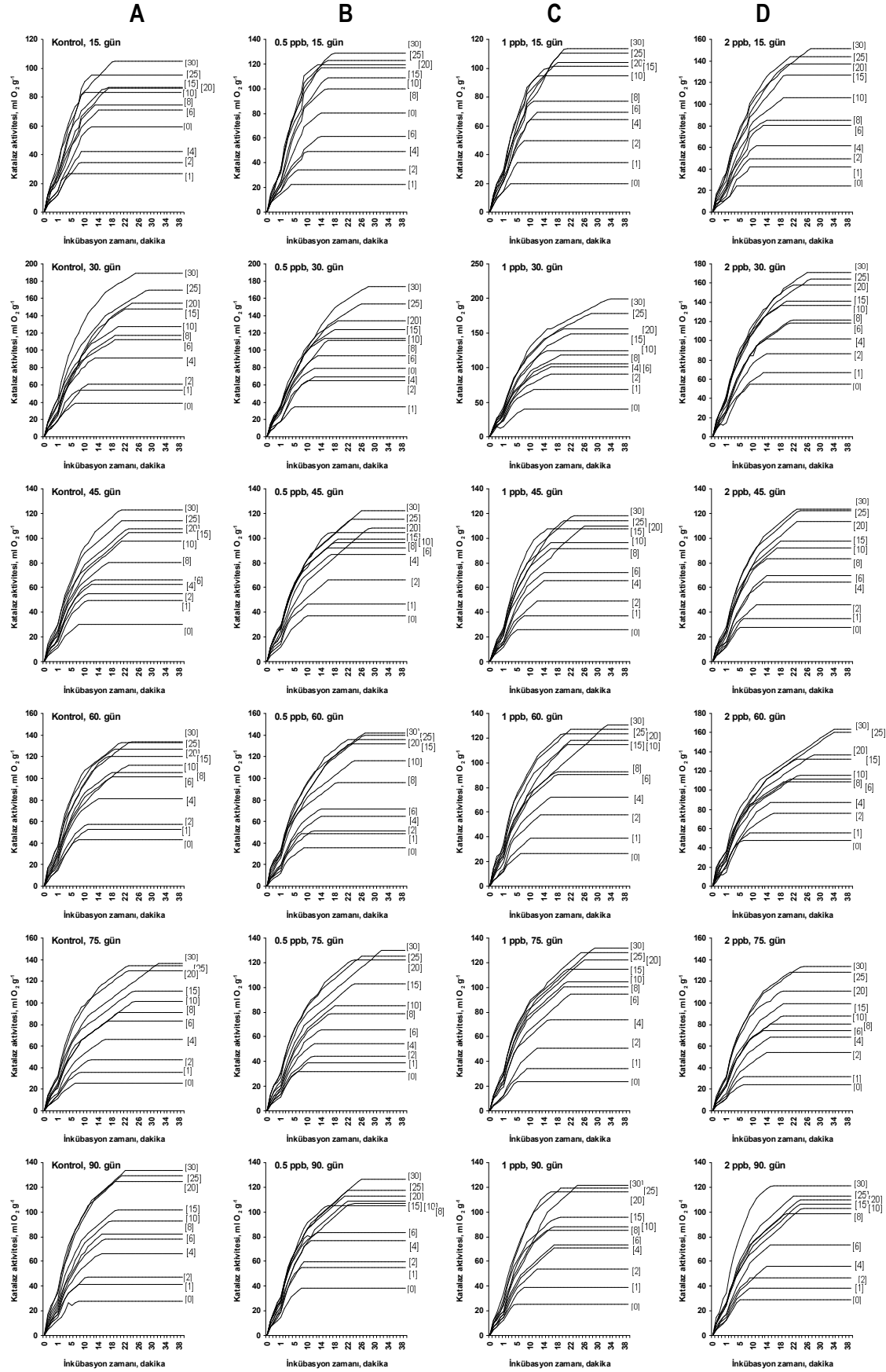
Kontrol toprağı ve 2,4-D’nin tüm uygulama düzeylerinde, reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasında hiperbolik bir ilişki belirlenmiş olup, substrat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hızın da arttığı saptanmıştır. Aynı şekilde, Khaziev, (1982) toprak enzimlerine ait kinetik parametrelerin hesaplanmasında, substrat konsantrasyonu ile ilk hız arasındaki ilişkinin hiperbolik fonksiyon biçiminde olduğunu belirlemiştir.

Farklı düzeylerde 2,4-D uygulanmış tın bünyeli toprak ile kontrol toprağındaki katalaz aktivitesine ait kinetik parametreler Çizelge 4’de, Michaelis-Menten eşitliğinin linearize edilmiş formu olan Lineweaver-Burk grafikleri ise Şekil 4’de verilmiştir.

Toprakta kontrol uygulamasında en yüksek  $V_{max}$ , inkübasyonun 30. gününde ortaya çıkmıştır. Topraklara 2,4-D herbisitinin uygulanması durumunda ise,  $V_{max}$  değerleri değişiklikler göstermiş, 0.5 ppb, 1 ppb ve 2 ppb uygulama dozlarında en yüksek  $V_{max}$ , inkübasyonun 30. gününde elde edilmiştir. Tüm inkübasyon dönemlerine ait  $V_{max}$  değerlerinin ortalaması dikkate alındığında, 2,4-D herbisiti uygulanması durumunda  $V_{max}$ ’da değişiklikler meydana gelmiştir. En yüksek  $V_{max}$  1 ppb dozunda elde edilirken en düşük  $V_{max}$  2 ppb uygulama dozunda saptanmıştır. Bu durum, kontrol ile karşılaştırıldığında tın bünyeli toprağa 1 ppb 2,4-D herbisiti uygulanması sonucunda reaksiyon hızı ve ürün oluşum hızının daha çabuk olduğunu, buna karşın toprağa uygulanan 2,4-D herbisitinin uygulama dozunun artması durumunda ürün oluşum hızının azaldığını ifade etmektedir.

İnkübasyon dönemlerine ait ortalama  $K_m$  değerlerine bakıldığında, 2,4-D herbisit uygulamasının  $K_m$  değerlerini azalttığı ve en yüksek  $K_m$ ’nin kontrolde, en düşük  $K_m$ ’nin ise 0.5ppb uygulama dozunda elde edildiği belirlenmiştir. Bu durum tın bünyeli toprağa 2,4-D uygulanması sonucunda katalaz enzimine ait enzim-substrat kompleksinin dayanıklılığının kontrole göre daha kuvvetli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, herbisit uygulamasında ürün oluşumu düşük, kontrolde ise daha yüksek olmuştur.

Tüm inkübasyon dönemlerinin ortalama  $V_{max}/K_m$  değerlerine göre, en yüksek  $V_{max}/K_m$  kontrol düzeyinde elde edilmiş iken, bunu sırası ile 2 ppb, 0.5 ppb ve 1 ppb 2,4-D uygulama dozları takip etmektedir. Bu ise, kontrol uygulamasında enzim-substrat kompleksinin dağılımının oluşumuna göre daha çabuk olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Tın bünyeli toprağa artan düzeylerde 2,4-D herbisit uygulamasında farklı substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) düzeyleri ile inkübasyon dönemlerinde belirlenen katalaz aktivitesinin değişimi, A) Kontrol; B) 0,5 ppb; C) 1 ppb; D) 2 ppb 2,4-D dozu

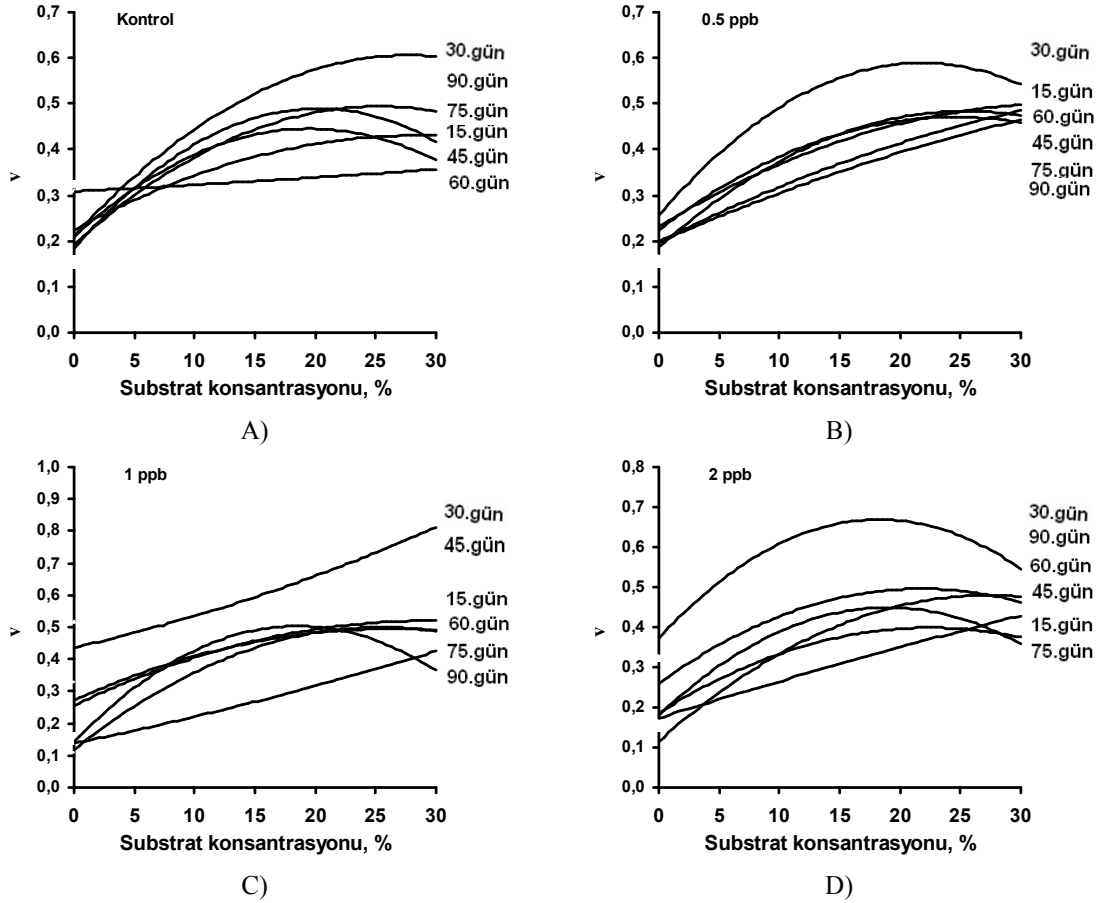
**Tınlı bir toprağın katalaz aktivitesi ve kinetiği üzerine 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit) herbisitinin etkisi**

**Çizelge 2. 2,4-D herbisit uygulamasında inkübasyon periyodu boyunca tın bünyeli toprakta ölçüm zamanına göre farklı substrat konsantrasyonlarındaki O<sub>2</sub> çıkışının sabitleştiği zaman (dakika)**

gün	doz	Substrat konsantrasyonu [S], %										
		0	1	2	4	6	8	10	15	20	25	30
15	0	4	8	8	11	13	12	9	16	16	11	18
	0.5	4	6	8	13	13	15	15	13	12	15	17
	1	3	5	7	9	11	10	12	16	17	18	20
	2	4	8	8	10	12	13	18	19	20	20	26
30	0	7	6	10	12	18	18	19	21	23	28	24
	0.5	5	9	11	11	12	15	14	17	18	25	27
	1	7	10	15	15	15	18	14	21	19	27	33
	2	8	12	13	13	20	21	17	19	21	26	25
45	0	7	10	10	11	12	16	20	22	22	20	20
	0.5	9	9	15	16	17	28	22	25	16	18	15
	1	5	7	11	13	13	15	15	14	25	19	22
	2	5	6	10	12	13	13	16	17	22	23	22
60	0	7	10	10	13	17	17	22	16	18	20	23
	0.5	8	7	11	13	13	18	23	22	21	26	26
	1	6	9	12	15	17	17	20	21	19	21	32
	2	6	8	15	14	18	20	23	22	27	33	33
75	0	6	8	11	15	16	19	24	24	22	22	31
	0.5	6	9	11	11	13	16	1	23	23	25	31
	1	5	8	11	15	21	19	20	20	25	24	28
	2	6	6	13	14	12	14	18	18	18	20	24
90	0	7	7	10	14	15	14	17	19	18	20	21
	0.5	7	7	8	10	12	15	23	21	20	21	25
	1	5	7	11	16	16	14	16	18	15	18	23
	2	5	8	8	13	14	19	24	23	23	21	15

**Çizelge 3. 2,4-D herbisit uygulamasında tın bünyeli toprağın 90 günlük inkübasyon periyodu boyunca farklı substrat konsantrasyonlarındaki katalaz aktivitesi**

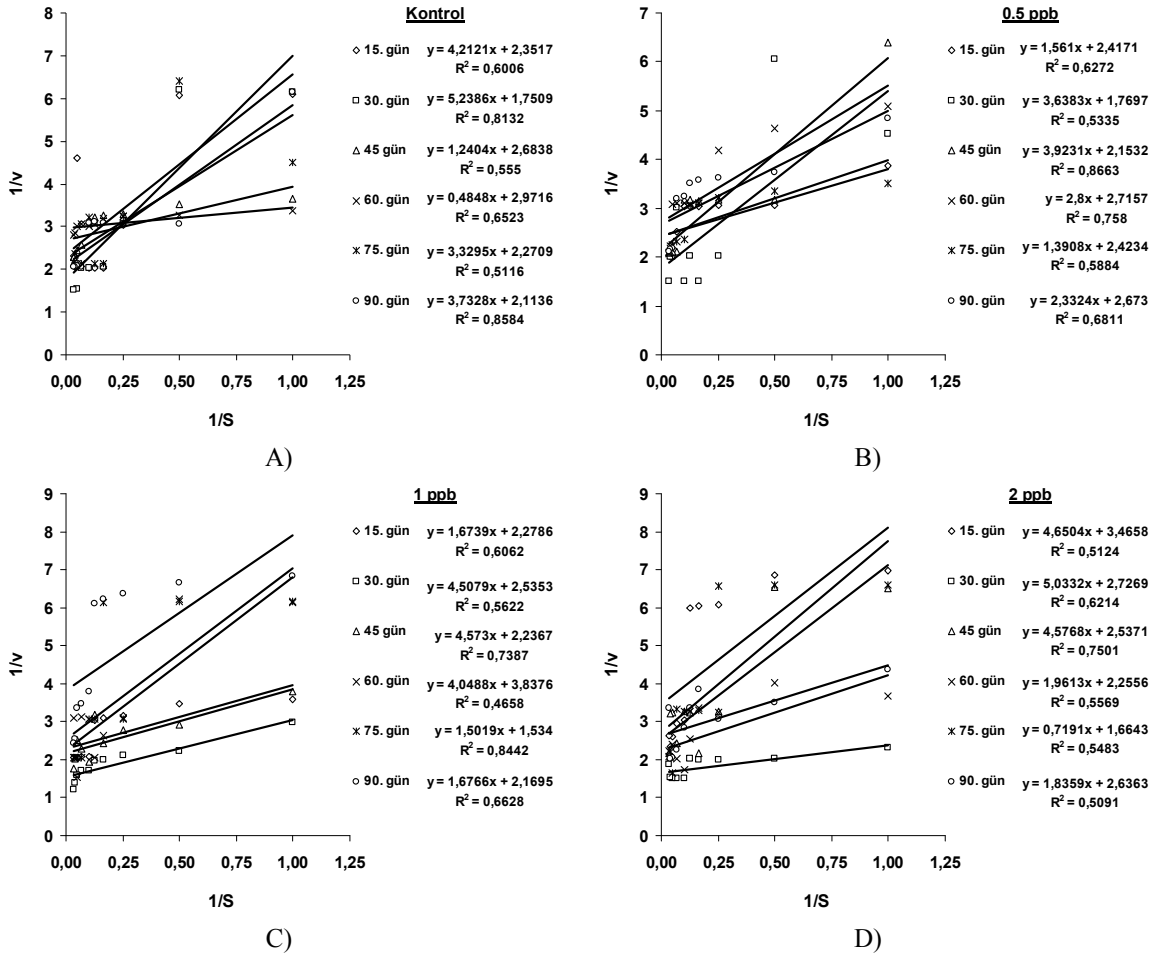
[S]	Katalaz aktivitesinin değişim aralığı, ml O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup>				Maksimum katalaz aktivitesinin elde edildiği inkübasyon dönemi, gün			
	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	2 ppb	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	2 ppb
0	4.6-53.6	4.6-38.7	4.0-39.8	4.6-54.3	30.	90.	30.	30.
1	4.6-52.4	4.6-64.7	4.7-68.3	4.6-66.5	60.	30.	30.	30.
2	4.7-60.6	4.6-69.5	4.7-91.1	4.6-86.8	30.	30.	30.	30.
4	4.9-91.0	4.5-86.7	4.7-101.0	4.6-101.9	30.	45.	30.	30.
6	6.9-112.3	6.9-96	4.7-105.3	4.6-118.8	30.	45.	30.	30.
8	7.0-117.0	6.9-111.3	7.1-118	7.0-121.9	30.	30.	30.	30.
10	9.3-127.2	9.2-116.1	7.0-124.7	9.2-137.1	30.	60.	30.	30.
15	9.3-147.8	9.2-131.5	7.0-149.1	9.3-141.4	30.	60.	30.	30.
20	9.2-154.3	11.8-135.5	9.4-156.5	9.2-158.3	30.	60.	30.	30.
25	11.6-169.3	11.9-153.2	9.4-178.7	9.8-164.0	30.	30.	30.	30.
30	10.6-189.2	11.9-174.2	9.3-198.9	11.3-171.2	30.	30.	30.	30.



Şekil 3. Tın bünyeli toprağa artan düzeylerde 2,4-D herbisiti uygulamasında katalaz enzimi reaksiyonunun başlangıç hızı ( $v$ ,  $\text{mL O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ ) ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiler, A) kontrol; B) 0,5 ppb; C) 1 ppb; D) 2 ppb 2,4-D dozu

Çizelge 4. Farklı dozlarda 2,4-D herbisiti uygulamasında 90 günlük inkübasyon periyodu boyunca tın bünyeli toprakta kinetik parametrelerin değerleri

2,4-D Uygulama Dozu	Kinetik Parametreler	İnkübasyon dönemi, gün						Ortalama
		15	30	45	60	75	90	
Kontrol	$V_{\max}$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ )	0.425	0.571	0.372	0.337	0.440	0.473	0.436
	$K_m$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1}$ )	1.791	2.992	0.462	0.163	1.466	1.776	1.440
	$V_{\max}/K_m$ ( $\text{sn}^{-1}$ )	0.237	0.191	0.805	2.068	0.300	0.268	0.645
0.5 ppb	$V_{\max}$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ )	0.413	0.565	0.464	0.368	0.412	0.374	0.433
	$K_m$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1}$ )	0.646	2.056	1.822	1.031	0.574	0.873	1.214
	$V_{\max}/K_m$ ( $\text{sn}^{-1}$ )	0.639	0.275	0.255	0.357	0.720	0.428	0.446
1 ppb	$V_{\max}$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ )	0.439	0.652	0.461	0.447	0.394	0.261	0.442
	$K_m$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1}$ )	0.735	0.979	0.773	2.045	1.778	1.055	1.228
	$V_{\max}/K_m$ ( $\text{sn}^{-1}$ )	0.597	0.666	0.596	0.219	0.222	0.247	0.425
2 ppb	$V_{\max}$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ )	0.289	0.601	0.394	0.443	0.367	0.379	0.412
	$K_m$ ( $\text{mLO}_2 \text{ g}^{-1}$ )	1.342	0.432	1.804	0.870	1.846	0.696	1.265
	$V_{\max}/K_m$ ( $\text{sn}^{-1}$ )	0.215	1.391	0.218	0.509	0.199	0.545	0.513



Şekil 4. Ters koordinatlarda (1/v ve 1/S), tın bünyeli toprağa farklı dozlarda 2,4-D herbisiti uygulamasında, enzim reaksiyonunun başlangıç hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki fonksiyonel ilişkiler, A) kontrol; B) 0,5 ppb; C) 1 ppb; D) 2 ppb 2,4-D dozu

#### 4. SONUÇ

Günümüzde tarımsal alanda kullanılmakta olan herbisitler topraktaki mikrobiyal süreçlere önemli düzeyde etki yapmaktadırlar. Bu çalışmada, artan düzeylerde 2,4-D herbisitinin tın bünyeli toprağa uygulanması sonucunda, katalaz enzim aktivitesi ile kinetik parametrelerdeki değişimler 90 günlük inkübasyon denemesi ile belirlenmiştir. 2,4-D uygulamasının hem katalaz aktivitesi hem de kinetik parametreleri önemli düzeyde etkilediği, bu etkiye uygulama dozunun katkı sağladığı saptanmıştır. Katalaz enzim aktivitesinin yüksek olması toprağın aerob mikroflora popülasyonundaki fazlalığı, kinetik parametreler ise enzim-substrat kompleksi ve ürün oluşumu arasındaki ilişkileri göstermektedir. 2,4-D herbisit uygulamasında katalaz enzim aktivitesinin başlangıçta artarak, inkübasyonun 30. gününde maksimuma ulaştığı, ilerleyen inkübasyon dönemlerinde ise azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, 2,4-D'nin toprağa uygulanması sonucu ortam yöntemlerin bölge toprak ve ekolojik koşullarına uygunluğunun da belirlenmesini ortaya koymaktadır.

mikroflorasına muhtemelen karbon, mikrobiyal parçalanma için potansiyel enerji kaynağı ve CO<sub>2</sub>'ye kadar oksitlenmeye imkan sağlayan elektron vericisi olmasından dolayı aerob mikrobiyal aktiviteyi artırdığını, ancak herbisitinin mineralizasyonu sonucu ortaya çıkan parçalanma ürünlerinden kaynaklanan toksiditenin katalaz enzim aktivitesini azalttığını ortaya koymaktadır.

2,4-D herbisitinin tın bünyeli toprağa uygulanması sonucu  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}/K_m$  gibi kinetik parametrelerin etkilendiği, bu etkiye inkübasyon süresi ve substrat konsantrasyonunda katkı sağladığı belirlenmiştir. Kontrolde  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}/K_m$   $V_{max}$  değerlerinin sırasıyla 0.337-0.571 mlO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>sn<sup>-1</sup>; 0.163-2.992 mlO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>; 0.191-2.268 sn<sup>-1</sup>, herbisit uygulamasında ise 0.261-0.652 mlO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>sn<sup>-1</sup>; 0.432-2.056 mlO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>; 0.199-1.391 sn<sup>-1</sup> aralığında değiştiği saptanmıştır.

Katalaz enzim aktivitesine bağlı oksijen çıkışının farklı substrat konsantrasyonlarındaki sabitlendiği zamanın belirlenmesi, laboratuvar koşullarında yapılan katalaz enzim tayinlerinde uygulanan standart Örneğin, kontrol uygulamasında (0 ppm 2, 4-D) % 2 'lik substrat konsantrasyonunda 8 dakika sonunda O<sub>2</sub>



çıkışı sabitlenmektedir. Oysaki, standart yöntem bu süreyi 3 dakika olarak ortaya koymaktadır. Ayrıca toprağa yapılan 2,4-D herbisit uygulamaları da bu süreyi etkilemektedir. Bu nedenle bölge ve ülke koşullarında enzim tayinlerinde optimum substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin kinetik çalışmalar ile ortaya konulması hem elde edilecek bulguların güvenilirliğini artıracak hem de zaman ve kimyasal madde sarfını azaltacaktır.

## 5. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezinin bir kısmı olan bu çalışmanın yürütülmesine destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Rıdvan KIZILKAYA'ya teşekkür ederiz.

## 6. KAYNAKLAR

- Aliev, S.A., Gadzhiev, D.A., Mikaylov, F.D., 1981. Kinetic indices of catalase activity in the basic soil types of Azerbaijan. *Soviet Soil Science*, 9: 107-112.
- Anonymous, 2010. Ruhsatlı Bitki Koruma Ürünleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, s: 82-93.
- Atkins, P.W. 1998. *Physical Chemistry*, Sixth Edition. Oxford University Press. UK.
- Beck, T.H., 1971. Die messung der katalasen aktivität von böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 130: 68-81.
- Berim, N.G., 1971. *Ximiçeskaya zaşıta rasteniy*. Kolos Press, Leningrad- Moscow.
- Bouyoucos, G.J., 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soil. *Agronomy Journal*, 43: 434-438.
- Bremner, J.M., 1965. Total nitrogen. In C.A. Black, D.D.Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark (Eds). *Method of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*. Agronomy 9, ASA, Madison, Wisconsin, USA, 1149-1176.
- Brower, C.A., Wilcox, L.V., 1965. Soluble salts. In C.A. Black, D.D.Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark (Eds). *Method of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*. Agronomy 9, ASA, Madison, Wisconsin, USA, 933-951.
- Ekberli, İ., Kızılkaya, R., 2006. Catalase enzyme and its kinetic parameters in earthworm *L. terrestris* casts and surrounding soil. *Asian Journal of Chemistry*, 18(3): 2321 - 2328.
- Ekberli, İ., Kızılkaya, R., Kars, N., 2006. Urease enzyme and its kinetic and thermodynamic parameters in clay loam soil. *Asian Journal of Chemistry*, 18(4): 3097-3105.
- Greaves, M. P., Davies, H. A., Marsh, J. A. P., Wingfield, G. I., Wright, S. J.L., 1976. Herbicides and Soil Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 5:1, 1-38.
- Haktanır, K., 1989. Pestisitlerin ve ağır metallerin topraktaki biyolojik olaylar üzerine etkileri. *Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayınları*, s.5-15, Ankara.
- Hızalan, E., Ünal, H., 1966. Toprakta önemli kimyasal analizler. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 278: 5-7.
- Keller, T., G. Skopp, G., Wu, M., Aderjan, R., 1994. Fatal overdose of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Forensic Science International*, 65: 13-18.
- Khabirov, I.K., Kuvatov, Yu.G., 1990. Kinetics and thermodynamics of the hydrolysis reaction of <sup>14</sup>C-labelled carbamide in the Pre-Urals soils. *Soviet Soil Science*, 8: 83-94.
- Khaziev F. Kh., 1982. Ecological research of soil enzyme activity. *Nauka Press Moscow*.
- Kızılkaya, R., Arcak, S., 1996. Trifluralin'in nitrifikasyon üzerine etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 11(3),145-154.
- Kızılkaya, R., Aksoy, H. M., 1999. Pestisitlerin farklı bacillus spp. gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 14 (3), 76-87.
- Kızılkaya, R., 1997. Pestisidlerin toprakta tutulmaları. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesinin Dergisi*, 12 (1): 131-145.
- Kızılkaya, R., 2000. The effects of herbicides 2,4-D on total bacteria and *Bacillus cereus* var. *mycoides* growth in soil. *Proceedings of International Symposium on Desertification*. 13-17 June 2000. Konya-Turkey. p. 541-546.
- Kızılkaya, R., Ekberli, İ., Kars, N., 2007. Tütün atığı ve buğday samanı uygulanmış toprakta üreaz aktivitesi ve kinetiği. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(3): 186-194.
- Kızılkaya, R., Ekberli, İ., 2008. Determination of the effects of hazelnut husk and tea waste treatments on urease enzyme activity and its kinetics in soil. *Turk. J. Agric. For.*, 32 (4): 299-310.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2010. *Mikroorganizmaların biyolojisi (Çeviri editörü: Cumhur Çökmüş)*. Palme yayınları:532, s: 647-655.
- Mostafa, A.E., Komeil, A.A., El-Aswad, A.F., Aly, M.I., 2006. The influence of certain pesticides on soil respiration and urease activity. *J. Pest Cont. & Environ. Sci.*, 14 (2): 365 – 380.
- Olson, B.M., Lindwall, C.W., 1991. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effects of 2,4-D and glyphosate. *Soil Biology and Biochemistry* 23,1071-1075.
- Palmer, T. 1981. *Understanding Enzymes*. Chichester, Ellis Horwood, USA.
- Peech, M., 1965. Hydrogen activity. In C.A. Black, D.D.Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark (Eds). *Method of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*. Agronomy 9, ASA, Madison, Wisconsin, USA, 914-925.
- Rankov, V., Velez, B., 1976. Effect of temperature on the interaction between the metribuzin and propachlor herbicides and soil microorganisms. *Agrokimiya*, 11(5): 100-105.
- Rizvanov, Kr., Toskov, N., Çirkov, Y., 1981. *Mikrobiologiya*. Zemizdat, Press Sofiya.
- Syvestre, G.S., Fournier, J.C., 1979. Effects of pesticides on the soil microflora. *Advances in Agronomy*. Academic Press. Inc. 31, 63-72.
- Tabatabai, M.A., 1973. Michaelis constant of urease in soils and soil fraction. *Soil Science Society America Proceedings*, 37: 707-710.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1971. Michaelis constant of soil enzymes. *Soil Biology and Biochemistry*, 3: 317- 323.
- Tu, M., Hurd, C., Randall, M.J., 2001. *Weed Control*

***Tınlı bir toprağın katalaz aktivitesi ve kinetiği üzerine 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit) herbisitinin etkisi***

- Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas, Wildland Invasive Species Program, The Nature Conservancy.
- Voynova-Raykova, J., Rankov, V., Ampova, G., 1986. Mikroorganizmı i Plodorodiye. Moskova, Agropromizdat Press, 120 s.
- Weber, J.B., 1990. Behavior of dinitroaniline herbicides in soils. Weed Technology, Vol. 4, No. 2 (Apr. - Jun., 1990), pp. 394-406.
- Walkey, A., 1946. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils-effect of variations in degestion conditions and of inorganic soil constituents. Soil Science, 63: 251-263.
- Yurtsever, N., 1984. Deneysel İstatistik Metodlar. T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Köy Hizm. Genel Müd. Yayınları, Ankara.