

## ***Azotobacter chroococcum* Strainlerinin Sülfonilüre ve Triazolopirimidin sınıfı ALS-Inhibitörü Herbisitlere in vitro Toleranslarının Belirlenmesi**

**İsmail Karaboz<sup>1</sup>, Binnur Meriçli-Yapıcı<sup>2</sup>**

### **Özet**

Bu çalışmada dünyada geniş çapta kullanılan herbisit sınıflarından birisi olan ALS-inhibe edici herbisitlerin, toprakta serbest yaşayan N<sub>2</sub>-fikse edici toprak bakterilerinden olan *Azotobacter* üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla üç farklı ticari formülasyonda yer alan sülfonilüre ve triazolopirimidin sınıfı ALS-inhibitörlerinden tribenuron metil, tifensulfuron metil, florasulam ve flumetsulam'ın etkileri İzmir'deki çeşitli sera topraklarından izole edilen ve tanımlanan 20 *Azotobacter chroococcum* straini üzerinde denenmiştir. Herbisit konsantrasyonları ilk önce 0,01-1,0 g/l olarak kullanılmış ve tüm izolatların bu düzeye dirençli olduğu görüldüğünden, daha sonra herbisit konsantrasyonları 2-50 g/l olarak uygulanmıştır. 15 g/l düzeyine dek tüm izolatların dirençli olduğu görülmüştür. 20 g/l konsantrasyonunda 18 izolatın, 35 g/l konsantrasyonunda 12 izolatın ve 50 g/l düzeyinde ise 2 izolatın denen her üç herbiside halen tolerant olduğu görülmüştür. *Azotobacter* toleransının tarımsal uygulamalarda kullanılan herbisit düzeylerin çok üzerinde olduğunun görülmesi, bu durumun topraktaki serbest azot fikse edici *Azotobacter* gelişimini etkilemediğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Herbisit, ALS-inhibitörü, *Azotobacter*, tolerans

### **Giriş**

Asetolaktat sentaz (ALS; EC 4.1.3.18 veya asetohidroksi asit sentaz; AHAS) dallanmış-zincir yapısındaki aminoasitler olan: valin, lösin ve izolösinin biyosentezindeki ilk genel basamağı sentez etmesi nedeniyle, bu metabolik yol-izi bitkilerde ve mikroorganizmalarda oldukça önemlidir. Modern ve birbiriyle ilişkili olmayan sülfonilüre (SU), imidazolinonlar (IMI), triazolopirimidinler (TP), pirimidinil-oksibenzoatlar (POB), ve sülfonilamino-karbonil-triazolin (SCT) sınıfı farklı kimyasal yapıdaki herbisidlerin hedefinin ALS enzimi olduğu bilinmektedir (1, 2). Bu nedenle, bu tip herbisidler "ALS-inhibitörü herbisit" olarak da adlandırılmaktadır.

<sup>1</sup> Prof. Dr., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AbD., İzmir. Yazışmadan Sorumlu Yazarın E-Posta Adresi: [ismail.karaboz@ege.edu.tr](mailto:ismail.karaboz@ege.edu.tr)

<sup>2</sup> Yrd. Doç. Dr. 18 Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale

ALS-inhibe edici herbisidler özellikle çeşitli ekinlerin yabancı ot mücadelesi için son yıllarda Dünya'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarımsal sistemlerde herbisitlerin uygulanmasının toprak mikroflorası üzerinde yan etkileri ortaya çıkabilir ve mikrobiyal komünite yapısında bazı değişikliklere yol açabilir (1, 3, 4). Toprakla ve bitkiyle bağlantılı olan çeşitli mikroorganizmaların (bakteriler, aktinomisetler ve funguslar) kullanılan herbisidlere karşı farklı dayanıklılık gösterdiği görülmüştür. Bazı mikroorganizmalar herbisidlere karşı yüksek tolerans gösterirken, bazı mikroorganizmaların herbisidleri kullandığı ve metabolize ettiği de belirlenmiştir (4, 5, 6, 7). ALS-inhibe edici herbisidlerin mikrobiyal popülasyon ve enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri yeterince bilinmediği için, son yıllarda bu yönde araştırmalar yapılmaya başlandığı görülmektedir (6).

Bu çalışmada etken maddesi sülfonilüre (SU) ve triazolopirimidin (TP) sınıfı olan 3 ticari herbisit formülasyonunun, toprakta serbest yaşayan azot fikse edici bakterilerden olan *Azotobacter* üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan 20 adet *Azotobacter chroococcum* straini Ege Üniv. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Bu izolatların İzmir ilindeki çeşitli sera topraklarından izole edildiği ve tanımlandığı belirtilmiştir (8).

### Herbisitler

Çalışmada herbisit olarak 3 ticari formülasyon kullanılmıştır:

1. Granstar, etkin maddesi % 75 tribenuron metil olan sülfonilüre sınıfı (SU) katı formda bir herbisittir.
2. Harmony<sup>R</sup> Extra, etkin maddesi % 50 tifensulfuron metil + % 25 tribenuron metil olan sülfonil üre sınıfı (SU) ve katı formda bir herbisittir.
3. Derby 175 SC, etken maddesi florasulam (75 g/l) + flumetsulam (100 g/l) olan triazolopirimidin (TP) sınıfı ve sıvı formda olan bir herbisittir.

### Ortamlar

*Azotobacter* strainlerinin saklanması, aktifleştirilmesi ve herbisitlere karşı toleranslarının belirlenmesi için katı ve sıvı formda "Azotobacter Zenginleştirme Ortamı" kullanılmıştır: Mannitol 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,2 g; NaCl 0,2 g; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,005 g; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,005 g; CaCO<sub>3</sub> 5 g; Agar 20 g ve distile su 1000 ml (Karaboz, 1988)

### Herbisitlerin Kullanım Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Herbisit kullanım konsantrasyonları iki aşamalı olarak hazırlanmıştır. İlk olarak hububat tarlalarında uygulanan düzeye yakın olacak şekilde herbisit düzeyi (0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 1,0 g/l veya ml/l) olarak 0,01-1,0 g/l aralığında hazırlanmıştır. Daha sonra ise kullanım konsantrasyonları (2.0 ; 4.0 ; 8.0 ; 15 ; 35 ;50 g/l veya ml/l) olarak 2.0-50 g/l aralığında hazırlanmıştır.

## **Azotobacter Strainlerinin Aktivasyonu**

15 ml'lik deney tüplerinde yatık olarak hazırlanan *Azotobacter* Zenginleştirme Ortamı'nda +4 °C'de buzdolabında saklanan *Azotobacter* strainleri, sıvı olarak 15 ml'lik taze ortama bir öze aşılansarak, 25 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Oluşan aktif sıvı kültürler agarlı ortamda *Azotobacter* 'lerin herbisit toleranslarının belirlenmesinde aşı olarak kullanılmıştır (10).

## **Azotobacter Strainlerinin Herbisit Toleranslarının Belirlenmesi**

Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan herbisidler, agar inokülasyonu yöntemiyle 15 ml'lik ortama 1 ml olacak şekilde, ortam steril edildikten sonra 45 °C'de iken karıştırılmıştır. Agar plakları katılaşıp soğuduktan sonra, *Azotobacter* inokülasyonu aktif kültürden her plağa 0,1 ml olacak şekilde yüzeye yayma yöntemiyle yapılmıştır. 25 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra büyüme oluşturan plaklar (+), büyüme oluşturmeyen plaklar (-) olarak belirtilmiştir (10).

## **Araştırma Sonuçları ve Tartışma**

Araştırmada kullanılan 20 *Azotobacter chroococcum* straininin 15 g/l düzeyinde her üç herbiside karşı toleranslı olduğu; 20-50 g/l düzeyinde ise belirli strainlerin farklı herbisidlere duyarlılıklarının farklı olduğu görülmüştür (Tablo 1. )

Herbisitlerin 20 g/ l düzeyinde: Tüm strainler Herbisit I'e, 19 strainin Herbisit II'ye ve 17 strainin de Herbisit III'e toleranslı olduğu ve ayrıca 18 strainin de her üç herbisit konsantrasyonuna toleranslı olduğu belirlenmiştir (Tablo 1.) .

Herbisitlerin 35 g/l düzeyinde: 13 strainin Herbisid I'e, 18 strainin Herbisit II'ye ve 17 strainin de Herbisit III'e toleranslı olduğu ve ayrıca 12 strainin de her üç herbisit konsantrasyonuna toleranslı olduğu belirlenmiştir ( Tablo 1.).

Herbisitlerin 50 g/l düzeyinde: 10 strainin Herbisit I'e, 4 strainin Herbisit II'ye ve 8 strainin de Herbisit III'e toleranslı olduğu ve ayrıca 2 strainin (strain 2 ve 14) de her üç herbisit konsantrasyonuna toleranslı olduğu belirlenmiştir (Tablo 1.).

Araştırmada elde edilen sonuçlar, *Azotobacter* strainlerinin tarlada kullanılan herbisit konsantrasyonlarının (2-75 g/hektar) oldukça üzerindeki düzeylere kadar toleranslı olduğunu göstermiştir. Bu durum topraktaki serbest azot fikse edici *Azotobacter* 'lerin ALS-inhibitörü herbisidlere karşı duyarlı olmadıklarını ve gelişmeye devam ettiklerini göstermektedir. Toprağın mikroflorası üzerinde oluşan bu olumlu durumun toprağın verimliliği açısından avantajlı olacağı belirtilmektedir (6).

*Azotobacter* spp. üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda ALS-inhibe edici herbisit uygulaması sonrası ilk 30 gün içinde *Azotobacter* popülasyonunun arttığı da gözlenmiştir (6).

Topraktaki herbisit uygulamalarının heterotrofik bakterilere negatif etki yapması için (100 mg/l) den fazla olması gerektiği, hatta fazla olduğunda bile bazısının etkilendiği ve bazısının etkilenmediği görülmüştür (4, 11).

Tablo 1. *Azotobacter chroococcum* Strainlerinin ALS-Inhibitörü 3 Ticari Herbisit formülasyonunun Farklı Düzeylerine Toleransı

Strainler	Herbisitler ve Konsantrasyonları (g/l )								
	20			35			50		
	H I	H II	H III	H I	H II	H III	H I	H II	H III
TEM 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TEM 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TEM 3	+	+	+	-	+	+	-	+	+
TEM 4	+	+	+	+	+	+	+	-	+
TEM 5	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TEM 6	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TEM 7	+	+	+	-	+	+	-	-	+
TEM 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TEM 9	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TEM 10	+	+	+	+	+	+	-	-	-
TEM 11	+	+	-	+	+	-	-	-	-
TEM 12	+	+	+	-	+	+	-	-	-
TEM 13	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TEM 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TEM 15	+	-	-	-	-	-	-	-	-
TEM 16	+	+	+	+	+	+	+	-	+
TEM 17	+	+	+	-	+	+	-	-	-
TEM 18	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TEM 19	+	+	+	-	+	+	-	-	+
TEM 20	+	+	+	+	+	+	-	-	+

+: herbisitlere toleranslı ; -: herbisitlere duyarlı

H I: 1. herbisit formülasyonu ; H II: 2. herbisit formülasyonu ; H III: 3. herbisit formülasyonu

He ve ark. (2006), genel funguslar, genel aktinomisetler ve aerobik azotobakter sayımlarının herbisit uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) toprak örneklerinde belirgin farklılıklar göstermediğini gözlemişlerdir.

Saha ve ark. (1991) in vitro yaptıkları çalışmada *Azotobacter* 'ın büyüme ortamına karbon kaynağı olarak mannitol yerine sadece herbisit katarak azotsuz ortamda *Azotobacter chroococcum* 'un geliştiğini gördükleri için, toprakta herbiside maruz kalmadan önce bile in vitro olarak *Azotobacter chroococcum* 'un herbisidi kullandığını belirlemişlerdir (5).

Bu çalışmada yüksek herbisit toleransı saptanan *Azotobacter chroococcum* strainlerinin inokulant olarak çeşitli kültür bitkilerinin sera ve tarla denemelerinde in vivo olarak da etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Böylece *Azotobacter* 'lerin kültür bitkilerin verimine olan katkıları da belirlenmiş olacaktır (6).

## Kaynaklar

1. Royuela, M., Gonzales, A., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.M., Gonzales-Murua, C.1998. Imazethapyr inhibition of acetolactate syntase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. Pestic. Sci. 52, 372-380.

2. Corbett, C.A., Tardif, F.J. 2006. Detection of resistance to acetolactate syntase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Manag. Sci.* 62:584-597
3. Patnaik, G.K., Kanungo, P.K., Rao, V.R. 1994. Interaction of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation associated with rice. *Microbiological Research* 149 (3): 291-295.
4. Allievi, L and C. Gigliotti, 2001. Response of the bacteria and fungi of two soils to the sulfonylurea herbicide cinosulfuron. *J. Env. Sci. and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 36: (2) 161-175.
5. Saha, J., Chowdhury, A., Chaudhuri, S. 1991. Stimulation of heterotrophic dinitrogen fixation in barley root association by the herbicide pendimethalin and its metabolic transformation by *Azotobacter* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 23 (6): 569-573.
6. He, Y.H., Shen, D.S., Fang, C.R., He, R., Zhu, Y.M. 2006. Effects of metsulfuron-methyl on the microbial population and enzyme activities in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental and Health Part B*, 41: 269-284.
7. Forlani, G., Mantelli, M., Branzoni, M., Nielsen, E., Favilli, F. 1995. Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant and soil* 176 (2): 243-253.
8. Türkmen, E. and İ. Karaboz, 2002. İzmir'deki çeşitli sera topraklarından *Azotobacter chroococcum* izolasyonu, tanımlanması ve bazı fitopatojen funguslara karşı antagonistic etkilerinin belirlenmesi, X VI. Ulusal Biyoloji Kongresi (4-7 Eylül 2002, Malatya) Bildiri Özetleri Kitabı, 53.
9. Karaboz, İ. 1988. Toprak Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kılavuzu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi, No. 80, Bornova-İZMİR.
10. Anonymous, (1998). *Bacteriological Analytical Manuel*, U.S. Food and Drug Administration, 8<sup>th</sup> Edition.
11. Ferrari, F., C. Gigliotti and L. Allievi, 1999. Behavior of the soil microbial community in the presence of the herbicide cinosulfuron. *Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepaste-Biologische Wetenschappen-Universiteit-Gent.*, 64 (3b): 829 – 836.