

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORMANGÜLÜ HUMUSUNDAKİ HUMİK ASİT
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Gülnur YAZICI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ORGANİK KİMYA
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet TUTAR

Mayıs 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORMANGÜLÜ HUMUSUNDAKİ HUMİK ASİDİN
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Gülnur YAZICI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : ORGANİK KİMYA

Bu tez 31/05/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ahmet TUTAR
Üye



Yard. Dr. Ayhan HORUZ
Üye



TEŞEKKÜR

Bilgisini, deneyimini, teknik donanımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımın olumlu sonuçlanmasında en büyük pay sahibi sayın danışman hocam Prof. Dr. Ahmet TUTAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada deneyimini ve bilgisini esirgemeyen sayın Doç Dr. Abdil Özdemir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmamızda desteğini eksik etmeyen Yard. Doç. Ayhan Horuz' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca grubumuz doktora öğrencisi Cihansel Sancak Ünlü'ye, Dr. Melek Gül'e, yüksek lisans öğrencileri Neşe Altuntaş, Çiğdem Işık ve Selçuk Karakaya, Arif Balkancı ve Makbule Yılmaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK (108T073) tarafından desteklenen projenin bir bölümünü kapsamaktadır. Desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
HUMİK MADDELERİN OLUŞUMU, YAPISI ve KULLANIM ALANLARI.....	4
2.1. Toprağın Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.1.1. Toprağın bileşimi.....	4
2.1.2. Toprak horizonları.....	5
2.1.3. Toprak organik madde terimi.....	6
2.2.4. Toprak organik maddenin sınıflandırılmasının isimsel Şeması.....	7
2.2. Humik Maddelerin Kısımlara Ayrılması.....	8
2.2.1. Humik asit.....	9
2.2.2. Fulvik asit.....	9
2.2.3. Humin.....	10
2.2.4. Siyah karbon ve kerogen.....	10
2.3. Humik Madde Kavramı.....	11

2.3.1. Humik kavramının oluşması.....	11
2.3.2. Humik asitler üzerine yapılan çalışmaların tarihsel süreci....	13
2.4. Humik Maddelerin Sınıflandırılması.....	14
2.4.1. Karasal veya karasal kökenli humik maddeler.....	15
2.4.2. Sudaki humik maddeler.....	16
2.4.3. Sulak alan humik maddesi.....	16
2.4.4. Jeolojik humik madde.....	17
2.4.5. Zirai humik madde.....	17
2.5. Humik Maddelerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması.....	17
2.5.1. Ekstrakt reaktiflerinin seçimi.....	18
2.5.2. Karasal humik maddelerin ekstraksiyon metotları.....	18
2.5.3. Humik asidin saflaştırılması.....	20
2.5.4. Fulvik asidin saflaştırılması.....	22
2.6. Humik Asidin Öncü Molekülleri.....	22
2.6.1. Lignin.....	23
2.6.2. Fenoller ve polifenoller.....	24
2.6.2.1. Lignin türevi fenoller ve polifenoller.....	24
2.6.2.2. Mikrobiyal fenoller.....	25
2.7. Humuslaşma Teorileri.....	26
2.7.1. Ligno-protein teorisi.....	27
2.7.2. Fenol-protein teorisi.....	29
2.7.3. Şeker-amin yoğunlaşma teorisi.....	32
2.8. Günümüzde Kabul Gören Humik ve Fulvik Asit Yapıları.....	33
2.9. Humik Maddelerin Uygulama Alanları.....	35
2.9.1. Tarım Uygulamaları.....	35
2.9.2. Çevresel Uygulamaları.....	37
2.9.3. Biyomedikal Uygulamaları.....	39
2.10. Ormangülleri (Rhododendron L.).....	40
2.10.1. Mor çiçekli ormangülü (Rhododendron Ponticum L.).....	41

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Kimyasallar.....	43
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	43
3.1.2.1. Santrifüj cihazı.....	43
3.1.2.2. Çalkalayıcı.....	44
3.1.2.3. pH metre.....	44
3.1.2.4. Termometreli ısıtıcı.....	44
3.1.2.5. Vakum pompası.....	44
3.1.2.6. Etüv.....	44
3.1.2.7. Hassas terazi.....	44
3.1.2.8. Elek.....	45
3.1.2.9. Havan.....	45
3.1.2.10. Toprak küreği veya beli.....	45
3.1.2.11. Kova ya da leğen.....	45
3.1.2.12. Naylon torba.....	45
3.1.2.13. Etiket.....	45
3.1.3. Spektroskopik yöntemler.....	46
3.1.3.1. UV spektroskopisi.....	46
3.1.3.2. IR spektroskopisi.....	46
3.1.3.3. NMR spektroskopisi.....	47
3.1.3.4. ESI-MS spektroskopisi.....	47
3.2. Metot.....	47
3.2.1. Humus numunelerinin toplanması.....	47
3.2.2. Örneklerin etiketlenmesi.....	49
3.2.3. Örneklerin torbalanması.....	50
3.2.4. Humus numunelerinin kurutulması.....	50
3.2.5. Humus numunelerinin dövülmesi ve elenmesi.....	50
3.2.6. Humus numunelerinden humik asidin ekstraksiyonu.....	50

BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	52
4.1. Numune Yerlerinin Seçimi.....	52
4.2. Humus Örneklerinin Toplanması.....	52
4.3. Humus Örneklerinin Kurutulması.....	53
4.4. Humus Örneğinin Dövülmesi ve Elenmesi.....	53
4.5. Ormangülü Humusundan Humik Asidin Ekstraksiyonu.....	54
4.6. Humik ve Fulvik Asit Karışımından Humik Asidin Çöktürülerek Ayrılması.....	54
4.7. Humik Asidin Yıkanması.....	55
4.8. Humik Asidin Kurutulması.....	55
4.9. Spektroskopik Sonuçlar.....	56
4.9.1. UV-Visible spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	56
4.9.2. FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	58
4.9.3. Kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	63
4.9.4. NMR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	69
4.9.5. FTIR ve NMR sonuçlarına uygulanan pik tanımlanması ile ilgili yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	71
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR.....	73
BÖLÜM 6.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
Kg	: Kilogram
Max	: maksimum
MI	: Mililitre
Mm	: Milimetre
N	: Normal
Nm	: Nanometre
Rpm	: Devir
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
¹³ C-NMR	: Karbon 13-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
ESI-MS	:Kütle spektroskopisi
FA	: Fulvik Asit
HA	: Humik Asit
HIN	: Hidrofilik doğal bileşikler
HON	: Hidrofobik doğal bileşikler
IHSS	: Uluslararası humik maddeler topluluğu
IR	: Infrared Spektroskopisi
LDI-TOF-MS	: Kütle spektroskopisi
LMAN	: Düşük molekül ağırlıklı bileşikler
LMN	:Düşük molekül ağırlıklı doğal bileşikler
NMR	:Nükleer manteyik rezonans spektroskopisi
SOM	:Soil organic matter
TOM	:Toprak organic madde
UV	:Ultraviyole spektroskopisi
ε	:Epsilon
π	:Pi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Toprak horizonlarının üç boyutlu ve çizgisel görünümü.....	5
Şekil 2.2.	Orlov(1975) tarafından önerilen humik maddelerin tipik isimsel şeması.....	8
Şekil 2.3.	Topraklardan turbalardan ve diğer karasal tortulardan ekstrakte edilen humik maddelerin ekstraksiyonunun akış diyagramı.....	20
Şekil 2.4.	Yumuşak ağaç, sert ağaç ve çimen bambu ağaçlarından elde edilen lignin monomerleri.....	23
Şekil 2.5.	Ligninin bozunmasıyla pirogallol oluşumu.....	25
Şekil 2.6.	Asetat malonat yolu ile resorsinolün oluşumu.....	26
Şekil 2.7.	Shikimik asit yolu ile pirogallol oluşumu.....	26
Şekil 2.8.	Ligno-protein konseptine göre humik asidin oluşum şeması.....	27
Şekil 2.9.	Humik maddelerin diagenetik değişimi.....	29
Şekil 2.10.	Shikimik asit yoluyla lignin monomerlerinden ligno-protein kompleksinin oluşumunun sadeleştirilmiş şeması.....	30
Şekil 2.11.	Fenol-protein teorisine göre humikleşmenin olası reksiyonu.....	31
Şekil 2.12.	Glikoz ile amin arasında ve glikoz ile glisin arasında gerçekleşen reaksiyon ile humik madde öncülerinin oluşumu.....	33
Şekil 2.13.	Stevenson'a göre humik asidin yapı modeli.....	34
Şekil 2.14.	Buffel ve ark. Göre fulvik asidin yapı modeli.....	34
Şekil 2.15.	Şekil 2.15. Humik asitlerin LDI-TOF-MS kütle spektrumu.....	35
Şekil 2.16.	Morçişekli ormangülünün Türkiye'de yayılışı.....	42
Şekil 3.1.	Toprak numunesi almada kullanılan çeşitli alet ve malzemeler....	46
Şekil 3.2.	Karışık toprak örneklerinin tarlanın bir ucundan diğer ucuna doğru zig-zag çizilerek açılan çukurlardan alınması.....	48
Şekil 3.3.	Toprak numunesi alınması.....	49
Şekil 4.1.	Humus numunelerinin alındığı bölgelerin haritada gösterimi....	52

Şekil 4.2.	Bazı humik asitlerin UV spektrumları.....	58
Şekil 4.3.	Farklı humik asitlerin FTIR spektrumları.....	61
Şekil 4.4.	Örnek numunelerin FTIR spektrumunun normal spektrumu, ikinci türevi ve ikinci türevinin pozitif kısmı.....	62
Şekil 4.5.	Orman gülü humusundan ekstrakte edilen humik asitin ESI-MS spektrumu.....	63
Şekil 4.6.	Örnek bir humik asidin yüksek enerjide MALDI-TOF-MS spektrumu.....	67
Şekil 4.7.	Örnek bir humik asidin düşük enerjide MALDI-TOF-MS spektrumu.....	68
Şekil 4.8.	Ormangülü humusundan elde edilen humik asidin katı hal ¹³ C NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.9.	Farklı bölgelerden alınan ormangülü humuslarından ekstrakte edilen humik asitlerin katı hal ¹³ C NMR spektrumları.....	70
Şekil 4.10.	FTIR spektrumu pik ekstraksiyonu.....	71
Şekil 5.1.	Humik asit yapısı	73

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	H1 numunesine ait etiket bilgileri.....	53
Tablo 4.2.	Humik asit FTIR spektrumunda gözlenen pikler ve grupları.....	60
Tablo 4.3.	Örnek numunenin MS/MS değerlerinin detaylı gösterimi.....	65
Tablo 4.4.	NMR ve FTIR spektrumlarından hesaplanan alifatik/aromatic ve aromatik/karbonil oranları.....	71

ÖZET

Anahtar kelimeler: Humik asit, humik madde, ormangülü

Humik maddeler hem karada hem de sulu ortamlarda bulunan en önemli organik karbon kaynaklarıdır. Humik maddeler bitkilerin büyümesinden, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ve yapısından sorumludurlar. Humik maddelerin yapısında humik asit, fulvik asit ve humin olmak üzere üç bileşen bulunmaktadır. Humik asitler; tarımda, tıpta, eczacılıkta, hayvancılıkta, çevre teknolojilerinde ve polimer endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu çalışmamızda Sakarya'da yetişen mor çiçekli orman gülünün (*Rhododendron ponticum L*), humusundan humik asit ekstraksiyonu ve yapı karakterizasyonu çalışıldı. Yapı karakterizasyonu için başta ESI-MS olmak üzere katı hal ^{13}C NMR, FTIR ve UV gibi çeşitli cihazlar kullanıldı.

EXTRACTION OF HUMIC MATTER FROM SOIL

SUMMARY

Key Words: Humic acid, humic matter, *Rhododendron Ponticum*

Humic substances (HS) are the most important source of organic carbon in both terrestrial and aquatic environments, and play a key role in nature. They contribute to the growth of plants, are responsible for the structure and physical-chemical properties of soil, and are involved in the majority of surface phenomena that occur in soil. Humic substances can be divided into three components: fulvic acids (FAs), humic acids (HAs) and humin. One of the most important parts of HS is HAs. *Rhododendron* is a highly celebrated ornamental genus because of its spectacular flowers, species-richness, ease of hybridization and broad geographical range [3]. Approximately 1000 species inhabit a vast geographical range, from the tropics to the polar zone and alpine to sea level. *Rhododendron ponticum* L. has been documented throughout the Black Sea Region of Turkey.

The goal of this work is to characterize the humic acid fractions isolated from soil collected under the *Rhododendron ponticum* L. in Turkey by a combination of spectroscopic techniques comprising ESI-MS, solid-state ^{13}C NMR, and Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopies.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Organik maddeler humik maddeler ve humik olmayan maddeler olmak üzere iki genel gruba ayrılır.

Humik olmayan maddeler, değişime uğramış olmalarına rağmen hala kimyasal özellikleri tanımlanabilen; karbonhidratlar, proteinler, peptitler, aminoasitler, yağlar, mumlar, reçineler, pigmentler ile diğer düşük molekül ağırlıklı organik maddelerdir [1].

Humik maddeler, topraklarda, göllerde, nehirlerde ve sularda oluşan ve doğada en yaygın dağılım gösteren kolloidal özelliklere sahip doğal organik maddelerdir. Bu maddeler başlıca dekompoze amino asit artıkları içeren azotlu bileşikler ile aromatik komplekslerden oluşmaktadır [2].

Humik maddeler Stevenson tarafından yüksek moleküler ağırlıkta, ikincil sentez reaksiyonları ile oluşan, böylelikle toprak veya sediment çevresinden ayrı özellikte olan renkli maddeler olarak tanımlanmaktadır. Organik maddenin büyük hacmini humik maddeler oluşturur. Bu bileşikler amorf, kahverengi veya siyah, hidrofilik, asidik, moleküler ağırlıkları birkaç yüzden on binlere kadar değişebilen polidispers maddelerdir [3].

Humikli yapılar organik maddenin kabasını oluşturur. Toprak, linyit, turba kömürü, kanalizasyon suları, kaynak suları ve çökeltilerinden oluşan organik maddelerin çoğunu temsil eder. Humik maddeler Fulvik asitler (FAs), humik asitler (HAs) ve humin olmak üzere üçe ayrılırlar [4].

Humik asit, fulvik asit ve humin temel humik madde fraksiyonları

olup çoğu topraklarda humik maddelerin yaklaşık olarak %50 humin, %40 humik asit ve %10 fulvik asit şeklinde dağıldığı tahmin edilmektedir [5].

Humik maddelerinin en önemli parçalarından biri Humik asitlerdir. Humik asitler ve fulvik asitler alkali ortamda çözünen humus yapılarını temsil ederler. Humin çözünmeyen tortuyu temsil eder [4].

Humik asit, ayrılmış organik maddede, peat, kömür yatakları ve toprakta bulunan, özellikle demir gibi metal katyonlarla kleyt oluşturma özelliğinde olan polimerik fenolik bileşikler içeren kompleks makro organik moleküllerdir [6].

Humik asit genellikle koyu kahverengi ve siyah arasında olan kolloidal bir maddedir. Bu madde hidrofilik özellik gösterir ve asitlidir. Nemli haldeyken humik asitin tadı acı ve asitlidir. Molekül ağırlığı çok yüksektir. Humik asitin kristal yapıda olmadığı düşünülmesine rağmen, dondurucu kurutmadan sonra humik asitin parçacıklarının çoğu şekil olarak şekerin taneli kristalleri gibi rombiktir. Bu parçalar yüksek elektrostatik şarja sahiptir çünkü bu parçacıklar anında metal bir spatüle doğru çekilir. Bu özellik, ince ve küçük parçacıklar için geçerlidir [7].

Besin maddeleriyle birlikte humik maddelerin uygulanmasının bitkilerin biyokütlesi üzerinde olumlu etki yaptığını saptayan Schnitzer and Khan (1978), humik asitin bitki gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkilediğini bildirmişlerdir. Doğrudan etkinin bitkinin bünyesinde besin dağılımını değiştirebilecek olan humik madde bileşenlerinin bitki tarafından alınması şeklinde olabileceğini; dolaylı etkinin ise sentetik iyon değiştiricilerinin yaptığı gibi bitki besin maddelerinin sağlanması ve düzenlenmesi şeklinde olabileceğini ileri sürmüşlerdir [8].

Fulvik asitler, humik asitler gibi alkali çözeltide çözünür fakat alkalın ekstaktın asitleştirilmesi sonunda çökmez çözeltide kalır. Diğer bir deyişle hem seyreltik alkali hem de asit çözeltilerinde çözünebilir haldedir. Humik maddelerin tüm pH seviyelerinde suda çözünebilir parçasıdır. Humik maddelerin asidifikasyonu sonucu ortamdan ayrılan humik asitten sonra bunlar kalırlar. Fulvik asitler açık sarı ile sarı-kahverengi arasında bir renktedirler. Humik asitten daha küçük bir molekül yapısına

sahiptir ve toprakta yarılanma ömrü 10-50 yıl arasında değişmektedir. Doğal olarak meydana gelmiş humik asit moleküllerine bağlı 60'ı aşan farklı iz elementleri farklı canlı organizmaların kullanımına hazır olarak bulunmaktadır.

Her iki asitte toprak ve topraktaki mikro organizmalar için yararlıdır. Fulvik asit humik aside göre daha küçük bir moleküler yapıya sahiptir. Bunun sonucu olarak kalıcılığı daha azdır ve daha kolay parçalanır. Fulvik aside göre daha büyük bir moleküler yapıya sahip olan humik asit ise toprakta uzun süre kalır ve zaman içerisinde yavaş parçalanır. Genel olarak toprak organik madde miktarını arttırmada uzun süreli etkilerinden dolayı humik asitlerden faydalanılır. Humin, toprak veya sedimentlerden seyreltik asit veya baz çözeltileri ile ekstrakte edilemeyen humik parçalardır. Diğer bir deyişle her hangi bir pH değerinde suda çözünmezler. Moleküler yapıları çok büyüktür. Humik maddeler içinde parçalanmaya en dayanıklı olanıdır [9].

Yapılan çalışmada ormangülü bitkisine ait humus örnekleri incelenmiş ve analiz edilmiştir. Türkiye'nin kuzey kıyı ormanları sadece ülkemize özgü olan mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron ponticum L*) ile kaplıdır. Bunların humusunda humik madde oranının oldukça yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Bu tür çalışmalar ülkemizde yeni olmakla birlikte TÜBİTAK tarafından da yaygın olarak desteklenmektedir.

BÖLÜM 2. HUMİK MADDELERİN, OLUŞUMU YAPISI VE KULLANIM ALANLARI

2.1. Toprağın Yapısı ve Özellikleri

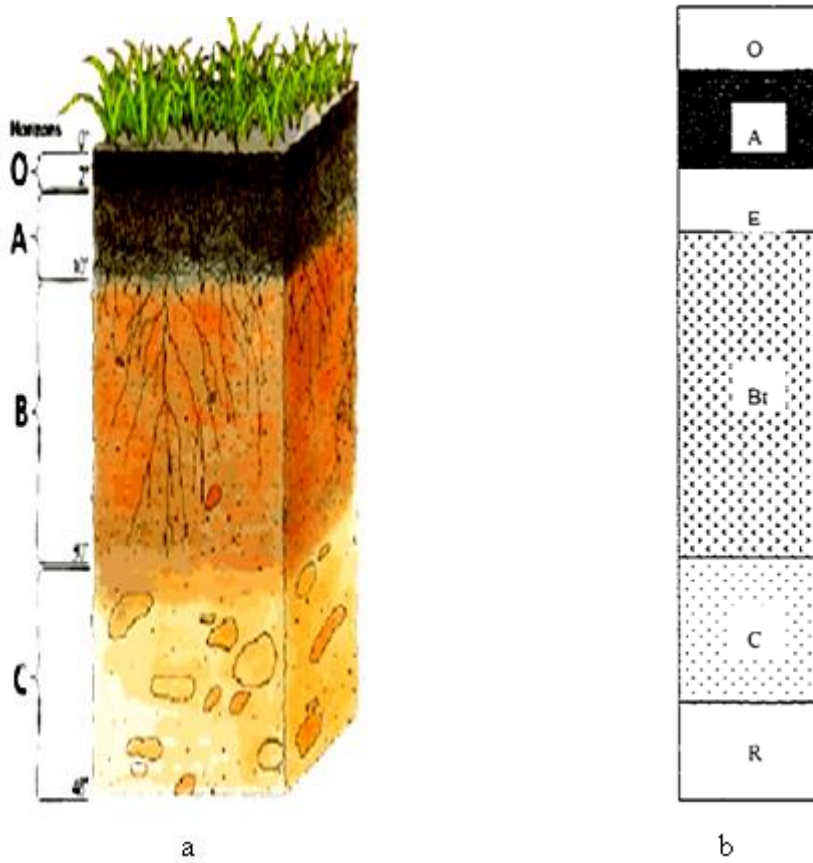
2.1.1. Toprağın bileşimi

İnorganik materyal, organik materyal, su ve hava dört temel toprak bileşeni olarak kabul edilir [10]. Toprağın inorganik kısmı kayaların parçalanma ürünlerinden oluşur ve farklı hacim ve bileşimlerdeki kaya parçaları ve minerallerden ibarettir. Hacim esas alındığında, toprağın inorganik kısmı kum, mil ve kil'den oluşmuştur denir. Bunlar toprak ayraçları olarak adlandırılır. Kum tanecikleri hacim ve biçim olarak düzensizdirler. Kimyasal olarak inerttirler ve elektriği iletmezler. Kil toprağın en küçük parçacığıdır ve kolloidal özelliklere sahiptir. Negatif yük taşır ve kimyasal olarak aktiftir. Mil orta büyüklükte olup kum ve kil arasındaki karakteristiklere sahiptir.

Toprak hava ve toprak su topraklardaki makro ve mikro deliklerde bulunur. Toprak hava atmosferdeki gazların benzer türünden ibarettir ve deliklerdeki hava miktarı toprak su tarafından kontrol edilir. Su arttığında deliklerdeki hava dışarıya itilir ve tersi de geçerlidir. Toprak su topraktaki besinler ve atık ürünler için en önemli taşıma aracıdır. Toprak su aynı zamanda topraklardaki kirliliklerin akibetine etki eder. Buna ilaveten mikroorganizmalar (mikrofaune ve mikroflora) toprağın önemli bir kısmıdır. Toprak bileşenlerin konsantrasyonları topraktan toprağa veya horizontondan horizonta farklıdır. Toprak bileşenlerin konsantrasyonları iklim, organizmalar, ana materyal ve zaman olarak tarif edilen toprağın oluşum prosesine bağlıdır [11]. Alternatif olarak, toprak oluşumu litosferin, biosferin, hidrosferin ve atmosferin bir fonksiyonu olarak görülebilir.

2.1.2. Toprak horizonları

Toprak horizonları kara yüzeyine paralel genetik olarak ilgili tabakalardır. Toprak horizonları fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler bakımından birbirinden farklıdır. Başlıca toprak horizonları Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi O, A, E, B, C ve R'dir.



Şekil 2.1. a) Toprak horizonlarının üç boyutlu görünümü, b) toprak horizonlarının çizgisel görünümü

A horizon, organik madde birikintisinin en fazla mineral içeren bölümüdür. A horizonu toprağı sürülen ya da işlenen kısmına Ap horizonu denir.

B horizonu bir alt toprağı işaret eder. Kolloidal birikintinin bölümüdür. Bazen kimyasal aşınma ile kil oluşur. Süzme su tarafından A horizontandan B horizonza taşınır. Böylelikle B horizonu Bt horizonza dönüşür. Kumlu topraklarda humus birikintisi ve alüminyum ile demir oksitler Bhs horizonu oluşturur.

A horizontandan koloitlerin aşağıya doğru transferi toprağın st kısmında kum ve mil ölçekli parçacıkların konsantrasyonuyla sonuçlanır. Böylece A ve B horizonlar arasında düşük organik madde içerikli açık renkli E horizonu oluşur.

C horizon ana materyalin st kısmında yer alır ve aşınma ile katı kayalardan oluşan R horizon hemen altında yer alır.

O horizonu organik materyallerin egemen olduğu toprak tabakadır. Bazen toprak yüzeyindeki aşırı ıslaklık ve asitlik organik madde bozunması için istenmeyen şartları oluşturur ve mineral toprak horizonların üstünde O horizonun oluşumuyla sonuçlanır. Kısacası; bir toprak profilinden en üstte dal yapraklar gibi organik maddelerin parçalanmasından ve ayrışmasından meydana gelmiş olan organik horizon ve onun altındaki mineral horizon ya da katlar en altta kısmen znmş ana materyal bulunur. İnceleme yapacağımız kısım organik horizonlardır. Toprak yüzeyinde bitki ve canlıların artıklarından meydana gelmiş olup O harfi ile ifade edilirler. Bu horizonlar organik maddelerin mineral toprak içine taşınması ve toprağın içinde ve altında ölmüş köklerin parçalanması ve ayrışması sonucunda humik asit bakımında oldukça zengindir [12].

2.1.3. Toprak organik madde terimi

İngilizcesi ‘Soil Organic Matter (SOM)’ olan Toprak Organik Madde (TOM) terimi hem humik hem de organik mineral toprağı kapsayan humik olmayan organik maddelerden ibarettir. Humik olmayan maddeler belirlenebilen ve sınıflandırılabilen herhangi bir materyallerdir. Humik maddeler mikrobiyal metabolizma sonucu oluşan ısıya dayanıklı, heterojen organik bileşiklerdir. Toprak organik maddenin sınıflandırılması bazik ekstraksiyon sonucunda asidik şartlarda znebilirliğe göre yapılmıştır. Humin aromatikliğin en büyük derecesine ve oksijen konsantrasyonunun en kk miktarına sahip dev molekülden oluşmuştur [13].

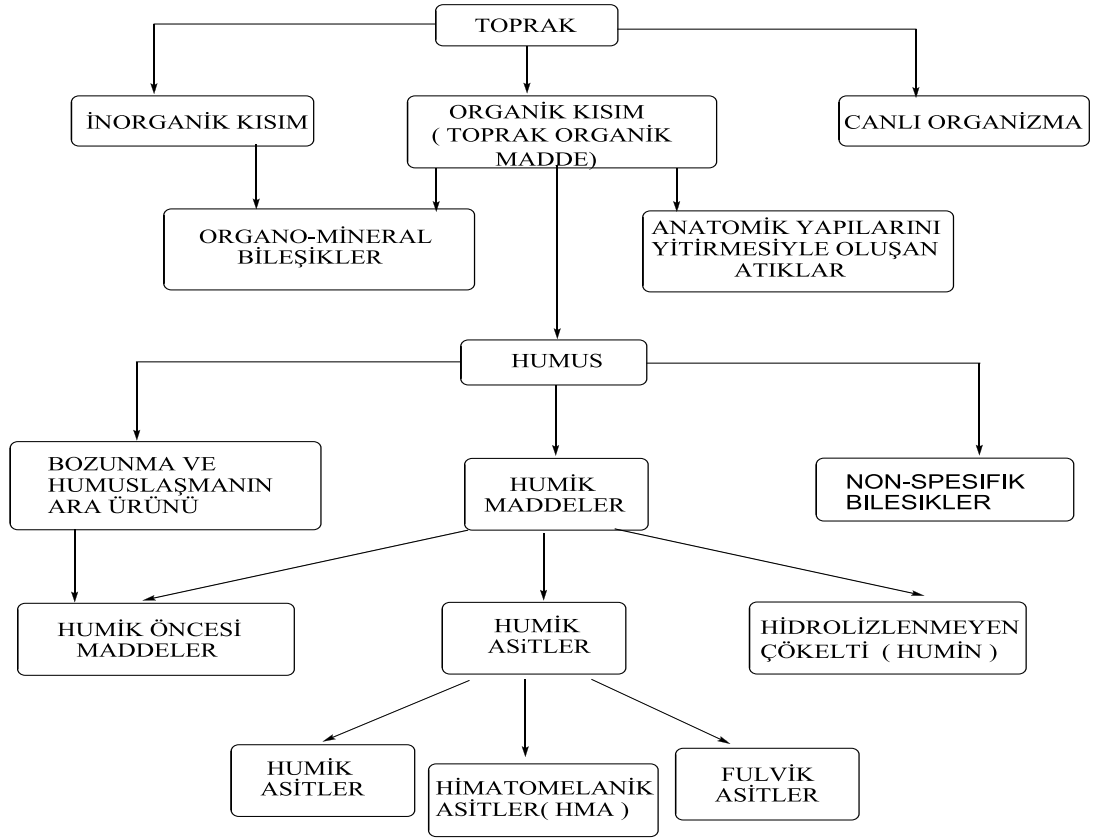
Genellikle humin toprakta çok kararlı olan ve bazik olarak ekstrakte edilmeyen mineral yüzeyleri ilgilendirir. Mineral toprakta huminin analogları olan ve O horizontanda znmeyen materyaller çoğunlukla selüloz ve ligninden ibarettir.

Humik asit (HA) bazik şartlarda çözünen, asidik çözeltide çöken ve toprakta hareketsiz olan kısımdır. Fulvik asit (FA) hem bazik ekstraksiyonda hem asidik çözeltide çözünür. Siyah karbon (black carbon, BC) toprak organik maddenin (TOM) diğer bileşenidir. Hem O horizonun hem de mineral toprak horizonlarının çözünmeyen humin fraksiyonudur. Siyah karbon heterojendir, aromatikdir ve biyokütle yanmasının karbonca zengin kalıntısıdır. Ayrıca kömür is ve grafiti içeren fosil yakıtıdır [14]. Kömür kütleinin yanmasından sonra geriye kalan kül ve kalıntının önemli bir kısmıdır. İis parçacıkları gaz fazında oluşur ve duman bulutu şeklinde taşınır. Grafit genellikle jeolojik olarak oluşturulur ve kalıtsaldır. Siyah karbon yanmamış materyallerden daha yavaş bozunur ve topraktaki yararlı karbon formu olduğu önerilmiştir [15].

2.1.4. Toprak organik maddenin sınıflandırılmasının isimsel şeması

Şekil 2.2’de Orlov (1975) tarafından oluşturulan humik maddenin tipik isimsel şeması görülmektedir. Orlov’a (1975) göre, spesifik humik maddeler, non-spesifik organik maddeler, bozunma ve humifikasyon ara ürünler humus bileşenleri olarak tarif edilir. En son grup kısmi hidroliz, oksidasyon, demeoksilasyon ürünleri ve lignin, protein, karbohidratlar ve bazı doğal bileşiklerin diğer türevlerini içerir. Non spesifik bileşikler lignin, selüloz, protein, aminoasitler, monosakkaritler ve parafin gibi maddeleri temsil eder [16].

Bugün humik maddeler, sarıdan kahverenkli amorf ve koloidal polidispersler olarak tarif edilir ve yüksek moleküler ağırlıklıdır. Lignoprotein teorisine göre, fenolik bileşiklerin, peptitlerin, aminoasitlerin ve karbohidratların interpolimerleşmesiyle oluşan lignoprotein bileşiklerdir. Humik maddelerdeki polimerler, nispeten kararlı ve mikrobiyal enzimatik atağa karşı dayanıklıdır [11].



Şekil 2.2. Orlov (1975) tarafından önerilen humik maddelerin tipik isimsel şeması

2.2. Humik Maddelerin Kısımlara Ayrılması

Humik maddelerin klasik olarak kısımlara ayrılması farklı pH değerlerinde sulu çözeltilerinde çözünebilirlik farklılığına bağlıdır. Başlıca, zayıf HA kısımları pH değeri düştükçe ilk önce çöker, kuvvetli asitler daha sonra çökecektir. Humik maddeler çok bilinen organik çözücülerde düşük çözünürlüklere sahiptir. Etanol, metanol ve aseton gibi organik çözücüler humik maddeleri alkali çözeltilerden çöktürmek için kullanılır [16].

Humik maddeleri kısımlara ayıran diğer teknikler; jel kromatografisi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve elektroforezdir [17].

2.2.1. Humik asit

Humik asit (HA) bazik ortamda çözünür fakat asidik ortamda (pH=1) çözünmez. Humik maddelerin yüksek molekül ağırlıklı kısmını oluşturur. Molekül ağırlığı birkaç bin ile birkaç yüzbin arasında değişir [18].

Humik asitler siyah ve kahverenkli humik asitler olmak üzere en az iki alt gruba ayrılır. Bu alt gruplar karbon içeriği, optikal yoğunluk ve diğer özellikleri bakımından hafif farklılık arz eder. Siyah ve kahverengi humik asitlerin ayrılması 2 N NaCl çözeltisi ile tuzlandırarak yapılabilir. Bu durumda siyah humik asit pıhtılaşır ve çöker. Humik asit terimi bileşiklerin ekstraksiyon metotlarıyla ilgili bir operasyonel terim olarak kullanılmıştır. Genel olarak, toprak humik maddelerin içeriklerinin %25 ile %45'lik kısmı aromatikdir. Aromatikler tek halkalı ve 3-5 sübstitüentli bileşiklerdir. Fenolik hidroksitler humik asitlerde en bol bulunan gruplardır [17].

Hala humik asitlerin geriye kalan kısımlarının çoğu bilinmemektedir. Bütün bunların yanında HA yapıları onların orijin yapıları ile yakından alakalıdır. Tüm humik asitler için tek ve üniversal HA yapısı araştırmak zor olacaktır [19].

2.2.2. Fulvik asit

Fulvik asit (FA) baz ve asitte (tüm pH şartlarında) çözünürdür. Humik maddelerin düşük molekül ağırlıklı kısmıdır. Molekül ağırlığı birkaç yüzden ikibin dalton arasında değişir [18]. Humik maddelerin Ekstrakte edildiğinde ve saflaştırıldığında, FA genellikle sarı renklidir. Fulvik asitler humik asitlerde olduğu gibi aromatik, doymamış yapılar ve karboksil-karbonil karbonlar gibi yapısal benzerliklere sahiptir [20]. Fakat onlar tamamen farklı bileşiklerdir. Humik asitlerle karşılaştırıldıklarında daha yüksek karboksilik ve fenolik gruplar içerir. Hidrojenin oranı karbon oranından (H/C), oksijenin oranı karbon oranından (O/C) daha fazladır. Fulvik asitler humik asitlerden daha az aromatiklerdir. Fulvik asitlerin daha küçük, daha polar ve daha yüksek yüklü olduğu görülür. Fulvik asitler asidik şartlarda ya da diavelent metallere düşük konsantrasyonlarında çökmezler. Bununla beraber, mineral

topraklardaki fulvik asitler inorganik kolloitler ve hidrofobik humik asitlerce tutulur ve böylece drenaj sularından atılamazlar. FA ve HA humik maddelerin en önemli kısımlarıdır. Topraktan toprağa çok farklı olmasına rağmen topraklarda büyük oranlarda vardır [19]. Genelde humik asit C ve N bakımından fulvik asitten daha zengin iken O ve S açısından daha fakirdir. Fulvik asitlerin humik asitlerden daha asidik olduğu rapor edilmiştir [11].

2.2.3. Humin

Humin, humik maddelerin suda, asitte ve bazda çözünmeyen kısmıdır. Buna rağmen sıcak alkalilerle ekstrakte edilebilir. Toprağın silikat kısmı HF ile muamele edildikten sonra sıcak bazik çözeltilerde çözülebilir. Humin; lignin, polisakkaritler, mineral bağlı lipitler, humik asit benzeri materyaller, kerogen ve siyah karbon gibi kompleks yapılardan oluşmuştur [21].

Ekstrakte edilebilir olmadığından dolayı huminin fiziksel ve kimyasal özelliğini anlamak oldukça zordur. Dai ve arkadaşlarına göre humin, humik ve fulvik aside göre daha fazla alkil karbonu içerirken, humik ve fulvik aside göre karboksil-karbonil karbonu, aromatik karbon ve doymamış karbonu daha az ihtiva etmektedir. Bahsedilen grup huminde parafinik karbonların oranının daha fazla olduğunu da önermektedirler [20].

2.2.4. Siyah karbon ve kerogen

Siyah karbon (black carbon, BC) Novakov tarafından “yanma ile oluşan grafitik mikroyapıya sahip siyah parçacık karbon” şeklinde tarif edilmiştir [22]. Literatürde kömür, is, elementel karbon veya pirojenik karbon gibi birkaç sinonimleri kullanılmaktadır [23]. Genellikle siyah karbon terimi kömürler, isler ve yüzeyleri elementel karbon içeren diğer materyalleri ifade etmek için kullanılır. Siyah karbon karasal organik maddenin tamamlanmamış yanması ve pirolizi ile elde edilir [24].

Kerogen, monoee, oksitleyici asitlerde, bazlarda ve organik çözücülerde çözünmeyen tortul kayalardaki karbon içerikli materyallerin bir kısmı olarak tarif edilir [25].

Olgunlaşmış kerogen tortul kayalardaki asıl doğal organik maddedir [26]. Siyah karbon ve kerogen sert karbon ve yumuşak karbonlu toprak organik madde yerine kullanılır. Tortullardaki toplam organik maddenin %1-20 siyah karbon ve kerogendir [27]. Humik maddelerden daha az polardır.

2.3. Humik Madde Kavramı

2.3.1. Humik kavramının oluşması

Toprağın organik özü, toprak biyokütlesinin canlı ve organik özünden oluşur. Bu, tarımın ilk günlerinden bu yana büyük bir ilgi çekmektedir. Çünkü toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik durumu üzerinde tarımın belirgin bir etkisi vardır. Bitkilerin büyümesi ve verimli olması, organik bakımdan zengin olan topraklarda büyümelerine bağlıdır. Topraklara ve bitkilere olumlu yönde etkileri konusundaki şüpheler, geçmişteki bilimsel veri eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Toprak organik maddesi terimi, ölü organik kesimi belirtmek için çok sık kullanılır. Fakat toprağın canlı bölümü genellikle dikkate alınmaz. Ölü kesimi, organik kalıntıların kimyasal ve biyolojik bozunumu ile oluşur. Organik maddeler çeşitli bozunma derecelerine göre ayırt edilebilir. Birincisi, bitkinin morfolojik olan hareketsiz görünen kısmı, ikincisi ise anatomik olarak sahip olduğu yapıdan hiç iz kalmayan yani tamamen bozunmuş kısmıdır. Burada bahsedilen ilk grup, bozunmamış materyalin çoğunu içerir, toprağın fiziksel özelliklerin üzerinde belirgin bir etkisi vardır.

Fibrik ve hemik kısımlar bağlı bozunma derecelerine göre sınıflandırıldığında, toprak taksonomisinde pratik uygulama sağlar. Buradaki fark orantılı bozunum derecesine dayalı olarak bulunur. Fibrik (Latince fibra = lif) kesimi en az derecede çürümüş iken, hemik (Yunanca hemi = yarım) kesimi kısmen çürümüş haldedir. Üçüncü kısım, tamamen çürümüş parça olarak tanımlanmaktadır. Toprak kimyası ve humik madde açısından çürümemiş olan bu grubun önemi çok azdır, ancak çürümüş kısım için kaynak oluşturmaktadır. Litter terimi ise genellikle toprağın yüzeyinde bulunan bu tür organik maddeler için kullanılır. Orman ve çayır topraklarında bulunan litterler beslenme döngü sürecinde önemlidir.

Bugünkü humus kavramı, birçok teoriye kıyasla pek de değişmemiştir. Hala ölü organik kısmın bir bozunmuş parçasını kapsamaktadır ve orijinal materyal tamamen ortadan kaybolmaktadır. Toprak taksonomisinde bu, çürük malzeme olarak söz edilir. Bu sözcük, Yunanca sapos teriminden gelir ve çürük anlamını verir dolayısıyla en yüksek bozunmuş olan organik kısımdır. Renk olarak, saprik malzemeleri genellikle koyu gri ve siyah arasında olur. Fibrik ve hemik kısımlar ile karşılaştırıldığında görülür ki, zamana karşı fiziksel ve kimyasal olarak çok az da olsa değişir. Humus teriminin düşünülmesi ve yerine humik olmayan madde ve hümik madde kullanılması ilk olarak Page ismindeki bir bilim adamı tarafından önerilmiştir. Koyu renk, hümik maddeden farklı olan fulvik asit ve organik maddenin renksiz ayrışma ürünleri, Page tarafından humik olmayan madde isminin altında gruplanmıştır. Buna karşı, Waksman tüm bu terimleri silmeyi tercih etmiştir ve humus adını, sadece hümik maddelerden bahsetmek için kullanılmasını önermiştir. Bugün Waksman ve Page'in önerileri günümüzde humus kavramı adı altında birleşmektedir. Güncel standartlarda humus humikleşmiş fraksiyon ve humik olmayan fraksiyon olmak üzere iki kısımda incelenmektedir [13]. Humik olmayan fraksiyon için Page'in tanımının genişletilmiş hali; bitkilerin ve diğer organizmaların kalıntılarının çürümesi ile elde edilen tüm maddeleri kapsayan kısımdır. Bu kısım karbonhidratlar, aminoasitler, lipitler, mumlar, nükleik asitler, lignin ve diğer organik maddeleri içerir. Humusun bu kısmının bitkilerden ve diğer tüm organizmalardan sentezlenen neredeyse tüm biyokimyasal bileşikler içerdiğine inanılmaktadır. Bu maddeler genellikle daha ileri çürüme ya da bozunma reaksiyonlarına maruz kalırlar. Humikleşmiş fraksiyonların sentezi ya da oluşumunun esas kaynağı olan bu süreç humikleşme süreci denir. Bunlar genellikle kil gibi topraktaki diğer anorganik maddelerden anaerobik şartlar altında adsorbe olurlar.

Özet olarak; humik maddeler sarıdan siyah ya da kahverengiye kadar değişen amorf ve polidispers maddelerin bir karışımıdır. Humik maddeler hidrofilik, asidik, yüksek moleküler ağırlıklı, moleküler ağırlığı birkaçyüzden birkaçbine kadar değişen atomik birim ya da daldır. Onlar çürümüş organik kısımdan meydana gelir ve yeni oluşum humikleşme olarak adlandırılır ve topraktan ekstraksiyon yoluyla elde edilirler, asidik ve bazik çözücülerle fraksiyon ve izolasyon işlemleri yapılır.

2.3.2. Humik asitler üzerine yapılan çalışmaların tarihsel süreci

Humik asitler ilk kez 1786 yılında Achard tarafından turbalıklardan ekstrakte edilmiştir. Daha sonraları sırasıyla bitki materyallerinden ve topraklardan ekstrakte edildi. İlk kapsamlı çalışmalar 1826 yılında Sprengel tarafından yayınlandı. Sprengel humik asitleri Achard'ın turba için önerdiği yöntemle, bazik ekstraksiyonla yaptı. Bu metot humik asit ekstraksiyonları için tercih edilen bir metot olmuştur. Braconnot nişasta ve şekere asit ekledi ve topraklardan ekstrakte edilen humik asitlere benzer koyu bir çökelek elde etti. Bu olay yapay ulmin olarak ifade edilen türlerin hazırlanması girişimi olarak görüldü. Glukozun da aynı tür maddeleri verdiği bulundu. Karbohidratların sentetik humik asitlere dönüştürüldüğü Malguti tarafından rapor edildi. Selüloz Mulder tarafından humik asitlere dönüştürüldüğünde, humik asitlerin başlangıcının polisakkaritler olabileceği teyit edildi. 1985 yılına kadar (146 yıl) bu izaha şüphe ile bakıldığından bu düşüncenin hatalı olabileceği düşünülmüştür. Bu zamanda humik asitlerin orijini hakkında bir görüş birliği olmasına rağmen humik asitlerin sınıflandırılmasında bazı şüpheler vardı. Humik asitler 1800'li yılların ortalarına kadar kimyasal formüllerle genel olarak karakterize edildi.

Ondokuzuncu yılların sonlarında humik asitler hakkında iki görüş hakim olmuştur. Birincisi, doğal humik asitlere benzeyen, koyu renkli maddeleri veren, karbon tetraklorür kadar basit yapılı organik bileşiklerden ibaret olduğu fikridir. Hem şekerler hem de bu kimyasallar açıkça humik asitlerin öncüleri olamaz. Bu yüzden humik asitlerin polisakkarit orijinli olduğu fikri taraftar kaybetmeye başlamıştır. İkincisi ise, humik asitlerin kimyasal formüllerinin ve bileşimlerinin gün geçtikçe daha da farklılaşmakta ve daha karışık bir hal almakta olduğu fikridir. Sadece karbon, hidrojen ve oksijenden oluşmadığı, aynı zamanda azot, anhitritler, eter, ketonlar, hidroksiller, alkil grupları, aromatik ve furanlardan oluştuğu düşünülmektedir. Bu kompleksite polisakkarit orijin fikrinin kaybolmaya başlamasıyla beraber, humik asitlerin mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu düşüncesi ortaya çıkmaya başlamıştır. Humik asitlerin polisakkaritlerden geldiği fikri kömür üzerine araştırma yapan Gortner ve Marcusson gibi araştırmacılar tarafından tekrar gündeme getirilmiştir. Bu araştırmacılar çalışmalarına ışık tutan düşüncüyü kömür ve humik asitlerdeki "furan" yapısından almışlardır. Yine kömür

araştırmacıları olan Fischer ve Schrader 1921 yılında mikroorganizmaların polisakkaritleri hızlıca tükettiklerini ortaya atmışlardır. Böylece polisakkaritlerin humik asitler için öncü olamayacakları görüşü hakim olmuştur. Söz konusu grup ligninin yavaşça bozunmasının humik asit oluşumuna yol açtığı düşüncesini ortaya atmıştır. Şu anda lignin teorisi bütün araştırmacılar tarafından olmasa bile büyük oranda kabul görmüştür [11]. Humus adında popüler bir kitap yazan Waksman humik asitlerin oluşumuna yol açan ligninlerin mikrobiyal dönüşümüne ciddi destek vermiştir. Lignin teorisini destekleyen bir grup araştırmacı 1982’de Uluslararası Hümik Maddeler Topluluğunu (International Humic Substances Society, IHSS) kurmuşlardır. IHSS hümik asit araştırmalarında koordinasyonu sağlamak amacıyla kurulmuştur. Humik asitler üzerine diğer popüler kitap olan “Humus Chemistry” Stevenson tarafından yayınlanmıştır [3]. Söz konusu kitap da humik asitlerin lignin teorisini desteklemiştir. Stevenson’un ikinci kitabı 1994 yılında yayınlanmış olup, bu kitapta da lignin teorisinden çok farklı iddialar ortaya atılmamıştır [13]. 1980 li ve 1990 lı yıllarda İkan ve gibi çok sayıdaki araştırmacı humik asitlerin alifatik yapıda olduğunu rapor etmişlerdir [28]. Susic IR ve NMR’ı da kullanarak yaptığı araştırmalarında yosunlarda, mantarlarda ve lignin içermeyen çürümüş meyvelerde yüksek oranda hümik asitler olabileceğini önermiştir [29]. ABD Kuzey-Doğu Üniversitesi hümik asitler araştırma grubu tarafından da destek bulmuştur. Gabbour ve arkadaşları “pilyella littoralis” isimli bir canlı bitkiden hümik asit elde etmişlerdir. Fakat halen hümik asitlerin kaynağının alifatik mi, aromatik mi veya polisakkaritlerden mi ya da ligninden mi olduğu tartışması devam etmektedir. Küçük mekanizmalarla polimer gelişimini modelleyen bazı teşebbüsler olmasına rağmen hümik asitlerin temel bloklarının birincil veya ikincil yapısını teyit eden önemli raporlar bulunmamaktadır. Çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

2.4. Humik Maddelerin Sınıflandırılması

Humik maddeleri toprak humik maddeleri, sudaki humik maddeler, sulak alanlardaki humik maddeler, jeolojik humik maddeler ve antropojenik humik maddeler olmak üzere 5 genel gruba ayırmak mümkündür.

2.4.1. Karasal veya karasal kökenli humik maddeler

Daha önce de açıklandığı gibi topraktaki humik maddelerin büyük kısmı humik ve fulvik asitten oluşmaktadır. Ligno-protein teorisine göre humik maddeler başlıca ligno protein kompleksleridir. Bu humik maddelerin en önemli bileşeni lignindir. Onların monomerleri 3 büyük temel türde mevcuttur. Bunlardan ilki, kozalaklı ağaçlar veya iğne yapraklı bitkilerden gelen, koniferil alkol ile karakterize edilen kozalaklı ağaç ligninidir. İkincisi sert ağaç bitki örtüsünde yaygın olan sinapil alkol tarafından karakterize edilen sert ağaç ligninidir. Üçüncüsü ise çimenlerde ve bambularda yaygın olan, kumaril alkol tarafından karakterize edilen, çimen ve bambu ligninidir. Sonuç olarak, bu öneride topraktaki humik maddeler 3 alt grupta incelenebilir:

Yumuşak ağaç(çam) toprak humik maddesi adı altında geçen humik maddeler kozalaklı ağaç lignin monomerlerinden oluşmaktadır ve yapısal olarak koniferil alkol ile karakterize edilir.

Sert ağaç(gürgen, meşe) toprak humik maddesi adı altında geçen humik maddeleri ise sert ağaç lignin monomerlerini meydana getirir ve yapısal olarak sinapil alkol ile karakterize edilir.

Çimen veya bambu toprak humik maddesi olarak geçen humik maddeler çimen veya bambu lignininden oluşmaktadır ve yapısal olarak kumaril alkol ile karakterize edilir.

Yukarıda anlatılan 3 alt grup arasında keskin bir fark vardır, bu toprak humik maddeleri monokültürel çevreden etkilenmektedir. Doğada, çimenler ve bambuların bitkileri çalılık ve kozalaklı ağaç ile sert ağaç ormanlarıyla karışık halde olarak bulunur. Böyle karmaşık ekosistemde, humik maddeler yukarıda anlatılan 3 grubun uygun karışımıdır. Bu fikir humik maddelerin yapısında daha fazla araştırma yapmayı teşvik etmek için sunulur.

2.4.2. Sudaki humik maddeler

Bu humik maddeler akarsularda, göllerde, okyanuslarda ve onların tortularında bulunur. Kerojen terimi bazen su tortularındaki humik asitler için kullanılır [30]. Mayer humik asitlerin suda oldukça yoğun bir şekilde var olduğuna dikkat çekmiştir [31].

Yapılan araştırmalar sonunda suda var olan humik maddelerin büyük çoğunluğunun fulvik asitlerden oluştuğu, humik asitlerin ise az miktarda var olduğu belirlenmiştir. Ancak, deniz dibinde veya göllerde biriken humik maddelerde kayda değer miktarda humik asit bulunabilmektedir. Oluşum temeline göre, sudaki humik maddeler iki grupta incelenebilir.

Allokton Su Humik Maddesi: Bu humik maddeler su ortamına dışarıdan getirilir. Bu humik maddeler toprakta oluşur ve sonra akarsuların, göllerin, okyanusların içinde biçimlenir. Su sistemleri tarafından fiziksel ve kimyasal değişimlerin meydana getirilmesine rağmen humik maddelerin doğası karasal humik maddelerle ilişkilidir.

Otokton Su Humik Maddesi: Bu humik maddeler, su ortamlarında suya özgü organizmaların hücresel bileşenlerinden oluşur. Denize ait tortularda, bu tür humik maddeler karbonhidrat-protein komplekslerinden oluşur [32]. Oksijensiz koşullarda derin suda oluşan çökelti katmanı sapropel ve kapropel bu kategoride gruplanabilir.

2.4.3. Sulak alan humik maddesi

Bu tür humik maddeler bataklık, turba ve çamurlu bataklık gibi sulak ekosistemlerdeki materyalden türetilir. Bu humik maddelerin içeriği humik ve fulvik asitten oluşur ve humik asit içeriği turbadan çamurlu bataklığa doğru gidildikçe artar. Huminin miktarı ve humik maddelerin değişik turbalardaki özelliklerinin farklı olup olmadığı şu an bilinmemektedir. Çünkü bataklık yosunundan oluşan turba, kimyasal olarak çalı bitkilerinden veya odunsu ağaçlardan oluşan turbadan farklıdır. Turba yataklarında, sulak alanlar dışında humik asit oluşumu toprak ekosistemine benzer

şekilde olmaktadır ve oluşan humik asitlerin karasal humik asitlere oldukça benzer özellikler gösterdiği belirtilmiştir.

2.4.4. Jeolojik humik madde

Jeolojik humik madde, linyit veya leonarditteki çeşitli kömür tiplerinden olan humik maddedir. Bu humik madde çoğunlukla, humik asitten meydana gelir ve çok fazla humin içerir. Bunun nedeni bekleme sürecinde fulvik asitlerin çoğunun diyagenez reaksiyonları ile sıkıştırılarak ve polimerize edilerek humik asit formuna çevrilmesidir. Fulvik asidin çevresel prosesler nedeniyle yıkanarak uzaklaştırılması gibi sebeplerle de fulvik asit içeriği azalabilmektedir. Biriken tortuların jeolojik yaşları esas alınarak humik maddeler jeolojik ve paleontolojik olarak alt gruplara ayrılabilir.

2.4.5. Zirai humik madde

Antropojenik humik madde, tarımsal, endüstriyel, yerel atık ve kirlenmiş sulardaki materyalden türemiştir. Bu tip humik maddeler fulvik asit ve humik asitten oluşur. Kirlenmiş kanallarda ve hendeklerdeki su çoğunlukla sarımsak ve kahverengi arasında olan bir renktedir. Bunun sebebi; fulvik asit içeriğinin fazla miktarda olmasıdır. Kümes hayvanlarından elde edilen fulvik asidin toprak fulvik asidi ile birbirine benzer olduğu kabul edilmektedir.

2.5. Humik Maddelerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Organik madde bileşenleri ile ilgili çalışmalar tamamen ayrılmış organik maddenin (humus) topraktan ekstraksiyonunu, bunları takiben humus fraksiyonlarının izolasyonu ve saflaştırılmasını gerektirmektedir. Ekstrakte olabilir organik maddenin yaklaşık %65-75'i genellikle amorf, kimyasal olarak karmaşık, renkli, mikrobiyal atağa dayanıklı ve moleküler ağırlığı birkaç yüzdenden birkaç yüzbine kadar değişebilen humik maddelerden oluşur. Organik maddenin ilk ekstraktı, ekstraksiyon metoduna bağlı olarak çoğunlukla oldukça fazla miktarda kül içerir. Ekstraksiyonun etkinliği de kullanılan metoda bağlıdır. Organik maddenin ekstraksiyonundan sonra humik

maddeler çözünebilirlik karakterlerine göre fraksiyonlarına ayrılabilirler. Alkali ekstraksiyon ve fraksiyonlama işleminden sonra bile humik maddeler, humik olmayan materyallerden kolaylıkla ayrılamaz.

2.5.1. Ekstrakt reaktiflerinin seçimi

Sahici humik maddelerin ekstraksiyonunu yapabilmek için düzgün bir analitik süreç gereklidir. İzolasyon ve saflaştırma prosesi, ekstraksiyon sürecinin önemli kısımlarıdır. Buradaki amaç humik maddeleri birbirinden ve çeşitli safsızlıklardan ayırarak saflaştırmaktır. Ekstraksiyon prosesinin başarısı doğru ekstraksiyon reaktifinin kullanımına bağlıdır.

Ekstraksiyon reaktiflerini organik ve inorganik reaktifler olmak üzere iki kısımda inceleyecek olursak, inorganik ayraçların humik maddelerin ekstraksiyonunda oldukça avantajlı olduğunu görürüz. Organik çözücü kullanımı inorganik çözücü kullanımıyla karşılaştırıldığında oldukça problemlidir. Organik çözücüler güçsüz ekstraktant olmakla beraber saflaştırma prosesinde uzaklatırmaları da oldukça zordur. Tüm bunlar göz önüne alındığında humik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılan en etkili alkali NaOH çözeltisidir. Saflaştırma esnasında kolayca çıkartılması da oldukça avantajlıdır.

Toprak veya sedimentin alkali ile ekstraksiyonunun sonucunda çözünmeyen (humik) ve çözünen (humik asit + fulvik asit) kısımlar elde edilir. Çözünen kısım asit ile muamele edildiğinde ise çöken (humik asit) ve çökmeyen (fulvik asit) olmak üzere iki kısım elde edilir.

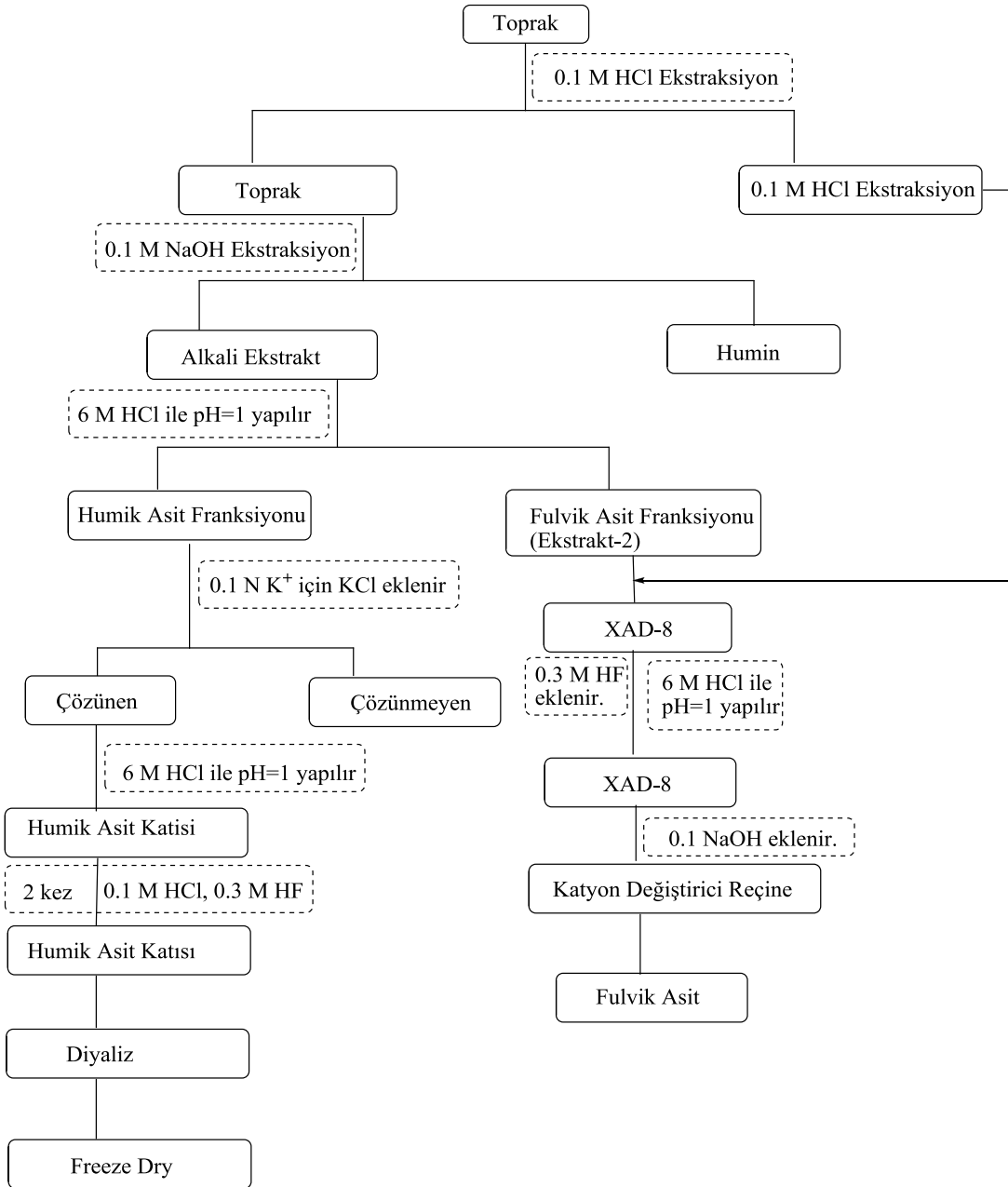
2.5.2. Karasal humik maddelerin ekstraksiyon metotları

En çok kullanılan yöntemde tartılan toprak numunesi 0,1 molar sodyum hidroksit ile karıştırılır. Kullanılan toprak miktarı ile kullanılan çözücünün oranları değişik şekillerde olabilmektedir. Toprak çözücü oranı 1:5 olabilir ve gece boyunca çalkanır. Bir diğer yöntem, Uluslar Arası Humik Maddeler Topluluğu tarafından kullanılan 1:10 oranıdır. Bu yöntemde çözücü oranı toprağın organik madde içerisine göre

belirlenmektedir. Örneğin organik maddece çok zengin olan turbalarda 1:10 toprak:çözücü oranı kullanılabilir. IHSS ve SSSA ekstraksiyon işlemini azot atmosferinde yapmışlardır. Choudri ve Stevenson humik maddelerin otooksidasyonunu önlemek için stannous klorür eklemeyi önermiştir [33]. Bu yapılar daha kolay ve hızlı yöntemler olmakla birlikte ekstraksiyon ürününün miktarı ve niceliğini etkilemez.

Ekstraksiyon yöntemi için bir şema aşağıda verilmiştir. 10 gram toprak numunesi santrifüj tüpüne tartılır. İşlem vakum ortamında ve azot atmosferinde gerçekleştirilebilir. Toprak numunesi üzerine 50 mL 0,1 molar sodyum hidroksit çözeltisi eklenir ve azot atmosferi oluşturulur. Sistem hava almayacak şekilde kapatılarak gece boyunca çalkalanır. Ertesi gün siyah renkli süzüntü 10,000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek ayrılır. Süzüntü bir yere ayrılır ve toprak kalıntıları 50 mL destile su ile yıkanır, renkli su santrifüj edilir ve süzüntü bir önceki ekstrakt ile birleştirilir. Eğer daha fazla miktar elde edilmek isteniyorsa aynı işlem tekrarlanır.

Birleştirilen süzüntüler humik maddeleri içermektedir bu karışım 11,000 devirde 15 dakika santrifüj edilir. Humik çözelti alınır ve çöküntü atılır. Çözelti damla dala hidroklorik asit eklenerek pH=2 olana kadar asitlendirilir. Bu işlem sonunda çökme meydana gelir çöken kısım humik asittir, süzüntü ise fulvik asit içermektedir. 10,000 devirde 5-10 dakika santrifüj yapılarak humik ve fulvik asit birbirinden ayrılır. Bundan sonra humik ve fulvik aside saflaştırma işlemi uygulanacaktır.



Şekil 2.3. Topraklardan, turbalardan ve diğer karasal tortulardan ekstrakte edilen humik maddelerin ekstraksiyonunun akış diyagramı

2.5.3. Humik asidin saflaştırılması

Yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen ham humik asite tekrar 0,1 molar sodyum hidroksit çözeltisinde çözülür ve 10,000 devirde santrifüj edilir. Çözünmeyen kısım atılır ve çözünen kısım yine pH=2 olana kadar asitlendirilir. 10,000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek çöken kısım ayrılır ve süzüntü atılır.

Çalkalama ve santrifüj işlemlerinin ardından HCL+HF karışımı atılırken humik asit çökeltisi ayrılır. Bu çökelti destile su ile yıkanır, santrifüj edildi ve yıkama suyu atılır.

Tan (1996) son basamak için humik asit çökeltisini yeniden 50 mL sodyum hidroksit çözeltisiyle çözmeyi ve çözeltiyi hidrojen ile doyurulmuş katyon değiştirici kolondan geçirmeyi önermiştir [34]. Humik asit çözeltisinin pH değeri 2 ile 3 arasında olmaktadır, çünkü humik asit oldukça asidiktir. Bu şekilde saflaştırılan humik asit analiz için kullanılabilir ya da daha sonra kullanılmak üzere soğuk kurutma işlemi yapılarak koyu rekli bir şişede saklanabilir.

Bir diğer saflaştırma işleminde katyon değiştirici kullanılmaksızın, humik madde HCl+HF ile muameleden sonra diyaliz tüpüne alınarak destile su ile 3 ila 4 gece kadar diyaliz edilir. Dikkat edilmesi gereken nokta suyun her 6 ila 12 saatte bir değiştirilmesidir. Her iki metotla elde edilen sonuç aynı olmasına karşın diyaliz metodu çok zaman tüketimine neden olduğu için katyon değişim metodu daha avantajlıdır.

Son zamanlarda Tatzber ve arkadaşları tarafından yapılan humik asit saflaştırma metodu daha kısa ve kolaydır. Bu metot elde edilen humik asit örneğinin sodyum hidroksit ile çözündürülüp saf su ile yıkanması ve HCl ile çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Saflaştırma işleminin ilk basamağında humik asit örneği 20 ml sodyum hidroksit çözeltisi ile çözündürülüp, saf su ile 200 mL'ye tamamlanır ve ardından 3 mL HCl kullanılarak humik asit çöktürülür. Santrifüj ve dekantasyon işleminin ardından humik asit ayrılarak saflaştırma işleminin ikinci basamağına geçilir. Bu aşamada humik asit örneği 10 mL sodyum hidroksit çözeltisi ile çözündürülerek 1,5 ml HCl ile çöktürülür ve üçüncü yıkamada humik asit örneği yalnızca saf su ile yıkanarak 10 damla HCl ile çöktürülür. Elde edilen saf humik asit örneği kurutularak saklanır.

2.5.4. Fulvik asidin saflaştırılması

Fulvik asit içeren renkli süzüntü Uluslararası Humik Maddeler Topluluğu'nun önerdiği gibi XAD-8 amberlite kolonundan geçirilerek saflaştırılır. XAD-8 kolonu sudaki humik maddelerin ekstraksiyonu için hazırlanmaktadır. Fulvik asit XAD-8 reçinede tutulmakta ve iki kez su ile yıkanarak karbonhidratlar ve diğer yabancı bileşiklerden ayrılmaktadır. Daha sonra fulvik asit 0,1 molar sodyum hidroksit çözeltisi ile reçineden alınmaktadır. Son olarak hidrojenle doyurulmuş katyon değiştirici (Dowex 50-X-8) kolonundan geçirir. Bu şekilde saflaştırılan fulvik asit analiz için kullanılabilmesi gibi daha sonra kullanılmak üzere soğuk kurutma yapılarak koyu renkli bir şişede saklanabilir. Bu şekilde elde edilen XAD-saf fulvik asit Stewenson tarafından generic fulvik asit olarak adlandırılmıştır.

2.6. Humik Asidin Öncü Molekülleri

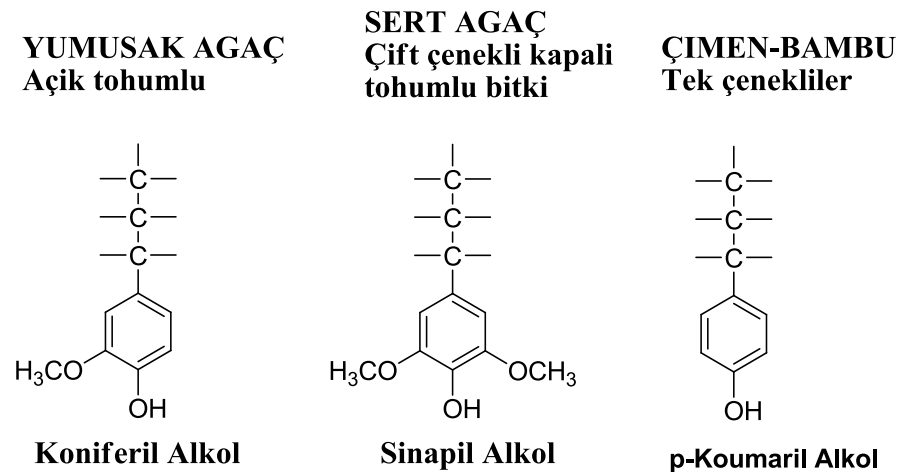
Humik maddelerin biçimlendirildiği işlem humifikasyon olarak adlandırılan işlemdir. Humik maddelerin sentezinde doğal kaynaklardan ve orijinal ham maddelerden farklı bir yolla yararlanıldığı düşünülmektedir. Öne sürülen teorilerin bir grubu humik maddelerin direkt dönüşümlerine biyopolimerlerin depolimerizasyonunun neden olduğunu savunur. Diğer bir grup ise biyopolimerlerin çürümesinin tamamlanmasıyla humik maddelerin oluştuğunu savunmaktadır. Çoğunlukla bitki materyallerinin ve hayvansal kalıntıların humik asitlere dönüştüğü düşünülür. Polimerizasyon teorisinde diğerinden farklı olarak bitki biyopolimerlerinin bozularak monomere ya da küçük organik bileşiklere ayrıştığı düşünülür. Bu küçük bileşikler arasındaki etkileşimler ile humik maddeler oluşur. Bu teori ilk yapının fulvik asit olduğunu varsaymakta ve bunun polimerizasyon ya da yoğunlaştırma ile humik aside dönüşebileceğini savunmaktadır.

Humik madde sentezinde bitki biyopolimerleri oldukça önemlidir. Bunlar humik madde öncülleri olarak adlandırılırlar. Yüksek bitkilerin yoğun bileşenleri olan lignin, selüloz ve hemiselüloz, polisakkaritler ve proteinler humik maddelerin oluşum kaynağı olarak oldukça önemlidir.

Humik maddelerin sentezi için; ham maddelerden mikroorganizmaların etkisiyle fenoller ve amino şekerler sentezlenmektedir. Fenolik bileşikler için diğer bir kaynak topraktır. Humik maddelerin oluşumuyla ilgili, bitki dokusundaki büyük moleküller ve topraktaki tüm orijinal bileşiklerin karakteristiği ve reaksiyonları ayrıntılı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.

2.6.1. Lignin

Lignin selülozdan sonra yeryüzünde bitkiler üzerinde en fazla bulunan doğal amorf polimerdir. Kimyasal yapısı bitkinin türüne ve morfolojik özelliklerine bağlı olarak değişir ve yapısını fenilpropan ünitesi oluşturur. Lignin adı Latince ‘lignum’ yani odun isminden türetilmiştir. Lignin odunun üç ana bileşeninden biridir, diğer ikisi ise selüloz ve hemiselülozdur. Ligninin büyük bölümü selüloz ve hemiselüloz ile birlikte ikincil hücre duvarında oluşur. Lignin ile diğer selülozik bitki bileşenleri arasında yakın ilişki vardır. Ligninin genel yapısı koniferil, sinapil ve kumaril alkollerin dehidrojenativ polimerleşmesi ile açıklanabilir. Lignini kompleks yapısı ve değişik yapıdaki bağların oluşumu bu monomerlerin fenoksi radikallerinin değişik şekillerde eşleşmesiyle meydana gelmektedir.



Şekil 2.4. Yumuşak ağaç, sert ağaç ve çimen bambu ağaçlarından elde edilen lignin monomerleri

Bitkinin yaşı ve kök içeriği ile birlikte lignin miktarı artmaktadır. Lignin yalnızca odunsu dokunun önemli bir bileşeni değil aynı zamanda odundaki metoksi içeriğinin

büyük bölümünü içermektedir. Ligninin fazla olması bitki dokularındaki damar yığınının ortaya çıkarır. Amaç ksilem borularını güçlendirerek suya daha dayanıklı olmasını sağlamaktır. Lignin içeriğinin daha fazla olması sebebiyle sıcak bölge otları ılıman bölge otlarına göre daha fazla büyümektedir. Bu fark nedeniyle oluşan humik maddelerde de farklılıklar görülebilir.

2.6.2.Fenoller ve polifenoller

Fenoller C_6H_5OH genel formülüne sahip aromatik karbon bileşikleridir. Fenoller benzendeki bir ya da daha fazla hidrojenin OH ile yer değiştirmesi ile türetilmiştir. Benzen renksiz ve yanıcı bir bileşiktir, aromatik olarak adlandırılır çünkü; yapısındaki altı karbon atomu birbirine ardışık tek ve çift bağlarla bağlıdır ve simetrik hegzagonal bir yapıya sahiptir. Fenoldeki C_6H_5 grubu fenil grubu olarak adlandırılır ve bu isim Latince'de *phene* yani parlak anlamına gelmektedir. Böyle adlandırılmasının nedeni benzenin yanarak çok parlak ışık vermesidir.

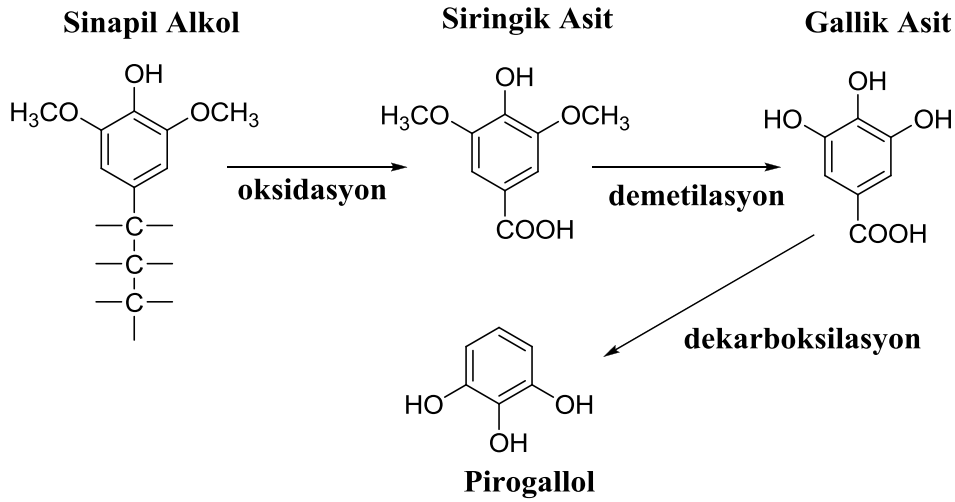
Birkaç monomerik fenolün birbirine bağlanmasıyla polifenoller oluşur. Daha öncede belirtildiği gibi fenoller ve polifenoller iki kaynaktan elde edilebilmektedir. Bunlardan biri ligninin bozunmasıyla oluşurken diğeri mikroorganizmalar vasıtasıyla oluşmaktadır. Stevenson serbest fenollerin yüksek bitkilerde glukozidaz ve tanen halinde bulunda inanmaktadır.

2.6.2.1. Lignin türevi fenoller ve polifenoller

Ligninin biyolojik olarak bozunmasıyla fenoller ve polifenoller oluşmaktadır. Mantarların belirli türlerinin lignine etki ederek mikrobiyal bozunma sağladığı bilinmektedir. Bu organizmaların lignine etkimesiyle fenoloksidaz türü enzimler olan tyrosinase ve laccase oluşmaktadır.

Ligninden fenol oluşum mekanizması, lignin sentezi mekanizmasının tersidir. Bu konuda ardı ardına gerçekleşen reaksiyonlarla ligninin fenole dönüşümü aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi ligninin temel birimleri olan koniferil, kumaril ve sinapil

alkollerin oksidasyon ve demetilasyon işlemlerinin ardından fenole dönüşmesiyle açıklanmaktadır.

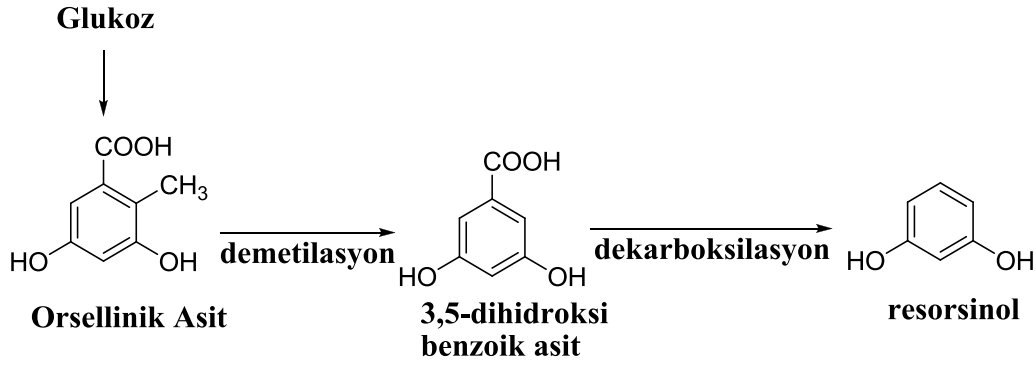


Şekil 2.5. Ligninin bozunmasıyla pirogallol oluşumunun basitleştirilmiş şeması

2.6.2.2. Mikrobiyal fenoller

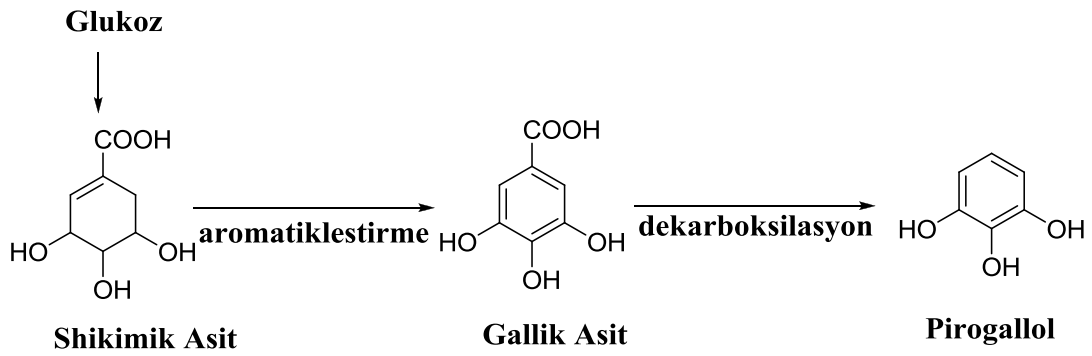
Mikroorganizmaların humik öncülerinin üretimine katkıda bulunduğu daha önce belirtilmiştir. Fenolik ve hidroksi aromatik asit türlerin büyük kısmının, aromatik olmayan hidrokarbon maddelerden mikroorganizmalar aracılığıyla oluşturulduğu bilinmektedir. Çoğu mantar, aktinomisit ve bakterinin ikincil metabolik proses ile basit fenolleri ve kompleks polifenolleri sentezleyebileceği bilinmektedir. Bu özellik mantar ve aktinomisitler için daha karakteristiktir. Çeşitli toprak mantarlarının glikoz, glikoz- NaNO_3 , asparagin ve pepton içeren kültür ortamında humik asit benzeri maddeler ürettiği rapor edilmiştir [35]. Bu maddeler çeşitli kimyasal analizler sonucunda fenollere, orsellinic, p-hidroksibenzoik, p-hidroksi sinamik aside, antrakinonlara ve melaninlere dönüşmektedir. Onlar da humik asitler gibi koyu renkli görünmektedir, fenol ve türevleri humik maddelerin bilinen yapı bileşenleridir. Mikorizal mantarlar tarafından humik maddelerin oluşumu da bildirilmiştir.

Humik öncülerinin mikrobiyal sentezi için en uygun iki mekanizma asetat-malonat yolu ve shikimic-asit yoludur. Haider ve ark. asetat-malonat yolu için şöyle bir öneride bulunmuştur; glikoz orsellinic asite dönüşmektedir, daha sonra demetilasyon ve ardından dekarboksilasyon ile bir dihidro fenol olan resorsinol elde edilmektedir.



Şekil 2.6. Asetat malonat yolu ile resorsinolün oluşumu

Shikimic asit yolunda ise son ürünün pyrogallol olduğu düşünülür. Görünüşe göre shikimic asitten aromatikleşme ile gallic asit oluşmakta ve buda dekarboksilasyona uğrayarak bir trihidroksifenol olan pyrogallol 'ü vermektedir.



Şekil 2.7. Shikimik asit yolu ile pirogallolün oluşumu

Pyrogallol ve resorsinol öne çıkan mikrobiyal fenollerdir ya da mikroorganizmaların ürettiği tipik fenollerdir. Pyrogallol ligninin bozunmasında ve sentezinde yer alan önemli bir üründür. Bu basit fenollerin polimerizasyonu ile polifenoller oluşmaktadır [36].

2.7. Humuslaşma Teorileri

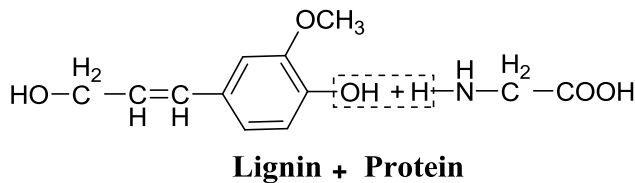
Bu teorilerden ilki bitki dokularını toprakta çürümesiyle humik maddelerin oluştuğunu öne süren ligno-protein teorisidir. Bu teoride lignin ya da az ayrıştırılmış ligninin diğer büyük organik polimerlerle tepkimeye girdiği düşünülür. Bu konuda öne sürülen bir diğer teori ise büyük bitki polimerlerinin humuslaşmadan önce daha

küçük moleküler bileşenlerine veya monomerlerine ayrıldığını öne süren fenol-protein teorisidir. Bu konudaki üçüncü teori ise humik madde sentezinde şeker ve aminin anahtar bileşen olarak kullanıldığı şeker-amin yoğunlaşma teorisidir. Bu teoriler aşağıda daha ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.

2.7.1. Ligno-protein teorisi

Bu teori humik maddelerin sentezi konusunda birçok bilimcinin bakış açısıyla oluşturulmuş ve yıllardır devam eden bir teoridir. Bu teori Amerikalı Waksman(1932), Rusyalı Kononova(1961) ve Almanyalı Flaig(1975) gibi birçok bilim adamı tarafından desteklenmiştir [37,38,39]. Sebebini belirtmemesine rağmen teori Stevenson tarafından Lignin Teorisi olarak adlandırılmıştır [13]. Lignin ve amino asitler humik asitin özünü şekillendirmek için birlikte ele alınır. Humik maddelerin sentezi yalnızca lignin ve protein reaksiyonlarını kapsamaz lignin türevleri ve NH₃ gibi protein olmayan basit azot bileşenleri arasındaki reaksiyonları da kapsamaktadır. Lignin ve protein türevlerinin humik maddelerin sentezinde önemli bir rol oynadığı düşüncesi Chefetz'in (2002) son zamanlarda yayınladığı raporlarda büyük destek gördü. ¹³C-NMR ve termokimyasal ayrışma-gaz kromatografi/kütle spektrometresinin gibi gelişmiş teknikler kullanılarak humik asit yapılarındaki lignin ve proteinin büyük bir miktarı ve kutikular materyaller belirlendi.

Lignin – protein teorisinde lignin birimleri amino asitler ile reaksiyona girerek humik molekülü oluşturmaktadır. Bundan dolayı teorisinin ismi lignin ve protein teorisidir. Bu tepkimenin basit bir örneği aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 2.8. Ligno-protein konseptine göre humik asidin oluşum şeması

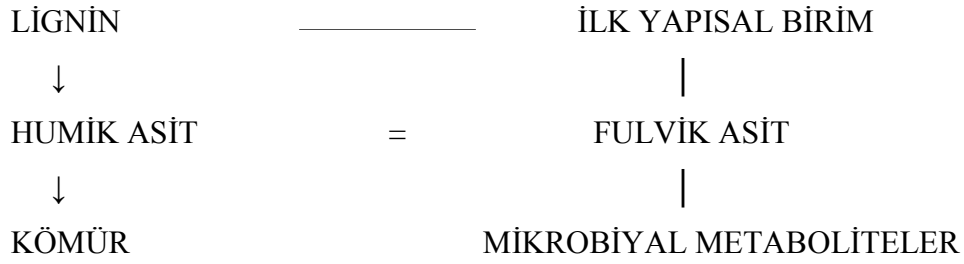
En basit şekliyle lignin fraksiyonu koniferil alkol tarafından temsil edilirken protein fraksiyonu monomerik aminoasit aracılığıyla gösterilir. Oluşan tepkime ürünü humik ve benzeri bir madde olarak görülmelidir. COOH ve OH gruplarının aromatik öze eklenmesi humik molekülünün en küçük olası monomerinin gelişimi için gereklidir.

Flaig'in teorisine göre, propan kısmı bir COOH grubu tarafından karboksilasyonla oksitlendirilir, metil grubu hidroksilasyon ile OH grubuna dönüştürülebilir ve bu yolla fenolik OH grubu elde edilebilir.

Biyopolimer bozunma kavramında bu bileşenler (koniferil alkol ve aminoasit) polimerik bileşiklerden oluşan, humik maddelerin ilk büyük molekülleri olarak düşünülebilir. Olası en büyük humik madde humindir ve humin bozunma ya da çürüme ile humik asite ve fulvik aside dönüşebilir. Hedges fulvik asitlerin ileri bozunma ile fenol ve kinon gibi küçük kararsız moleküllere parçalanabileceği belirtilmiştir [40].

Diğer taraftan monomerler yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi birlikte şu şekilde tepkime gösterebilirler. Bu maddelerin humik maddenin mümkün olan en küçük molekülünü oluşturması beklenir. En küçük humik madde bugün polimerleşme ile humik aside dönüştürülen fulvik asittir. Polimerleşme veya yoğunlaştırma reaksiyonlarının son ürününü humin ve kerojendir. Bu süreç Hedges tarafından abiyotik polimerleşme süreci olarak adlandırılır.

Ayrıca, son zamanlarda humik maddelerin sentezinde biyopolimer bozunma konusuna ve polimerleşme sürecine gölge düşüren humik maddelerin diyogenetik değişimi konusunda farklı bir yorum ortaya çıkmıştır. Stevenson ligninin direk kömüre dönüşmesiyle humik asit oluşturacağı görüşündedir. Stevenson'un meydana gelen karışıklıkları önlemek için aşağıdaki diyagramı önermiştir. Burada biyopolimer bozunması ile ligninden humik asit oluşumu ve yoğunlaşma sürecinden sonra kömüre dönüşümü görülmektedir.

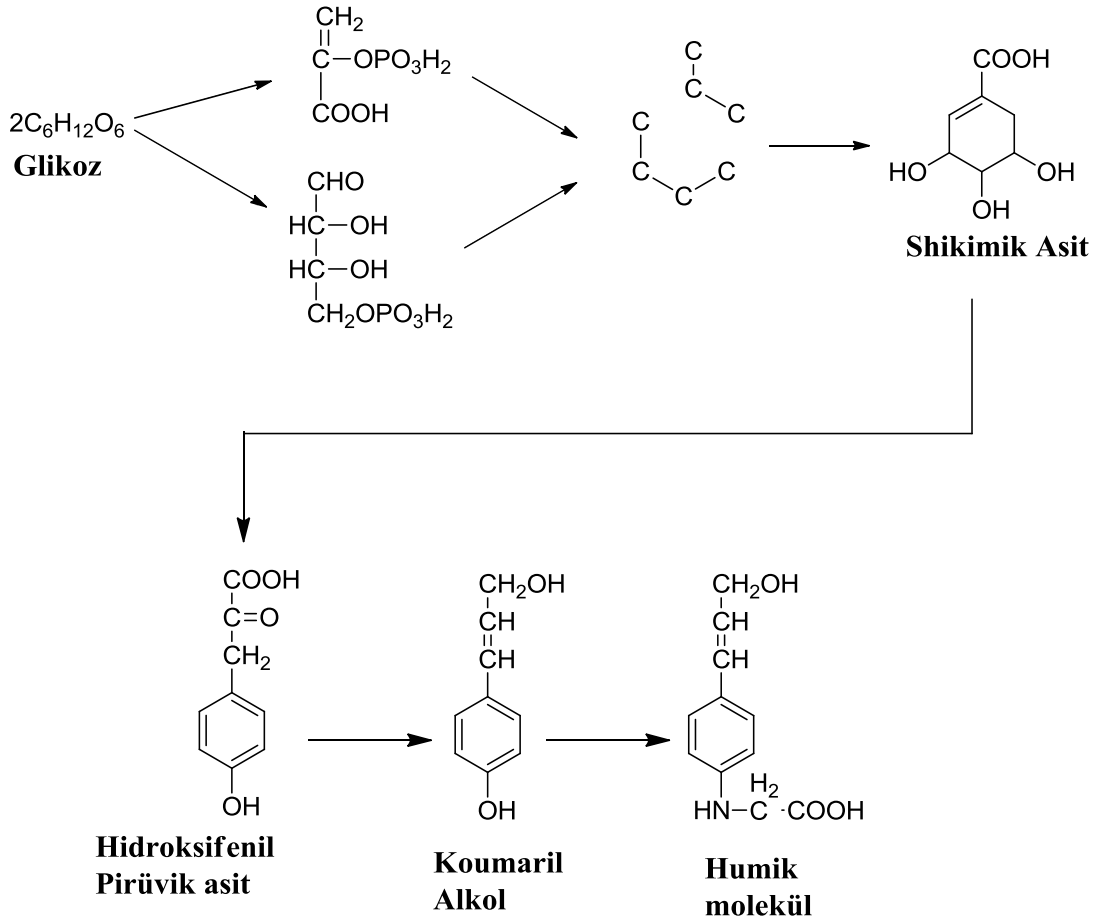


Şekil 2.9. Stevenson (1994)'e göre humik maddelerin diagenetik değişimi

Stevenson ligninin humik aside dönüştürülmesi ile başlayan parçalanma sürecinin fulvik asidin oluşmasıyla son bulacağı görüşündedir. Bu süreçte fulvik asidin sadece yan ürün olarak oluşturulduğu varsayılır çünkü asıl rota oklarla da belirtildiği gibi lignin → humik asit → kömür şeklindedir.

2.7.2. Fenol-protein teorisi

Bu teori Stevenson tarafından “polifenol teorisi” veya Zeichmann tarafından “fenol otoksidasyon teorisi” olarak adlandırılır [13]. Genellikle aromatik ve azotlu maddelerin karıştırılması ve humik asit özünde içeren belli kavramlar açısından bakıldığında fenol-protein teorisi ismi de kullanılmaktadır. Bütün bu isimler yanlış isim olarak düşünülebilir. Çünkü humik aside şekil veren tepkimede sadece fenoller değil aynı zamanda kinonlar da vardır. Kinonlar fenol türevlerdir ve sık sık humik maddelerin biçimlenmesinde baskın bir rol oynarlar. Fenol-protein teorisinin bölümleri ligno-protein teorisi ile örtüştürülebilir. Humik madde oluşumundaki öncü bileşiklerin birçoğu ve onların tepkimeleri birbiriyle alakalıdır.

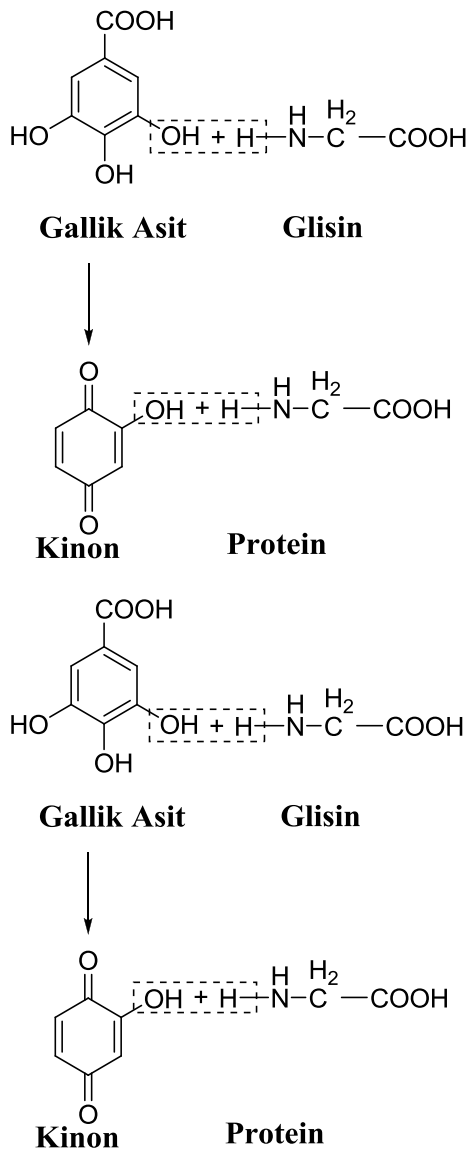


Şekil 2.10. Shikimik asit yoluyla lignin monomerlerinden ligno-protein kompleksinin oluşumunun sadeleştirilmiş şeması

Belki de sadece şeker amin yoğunlaştırma teorisinin bu iki teoriden ayrı tutulması gereklidir. Çünkü o lignin ve türevlerinin olmadığı ortamda humik madde oluşumu için bir açıklama sunar. Ayrıca fenoller ve kinonlar sadece ligninin enzimatik parçalanmalarından oluşmaz aynı zamanda shikimik acid ve asetat malonat yolu aracılığıyla şekerden elde edilen mikroorganizmalar tarafından şekillendirebildiği için ayrı bir humuslaşma süreci olarak bu teorisinin kabul edilmesi gereklidir.

Fenol-protein teorisinde fenoller, kinonlar, ve amino asitler humik molekül özlerinin oluşumu için anahtar bileşenlerdir. Gallik asit ile küçük bir amino asit molekülü arasındaki basit bir reaksiyon aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Ayrıca hidrosikinon ile amino asit arasında da reaksiyon gerçekleştirilebilir. Aşağıdaki şekilde de gösterildiği gibi bileşenlerden humik maddenin oluşumu abiyotik yoğunlaştırma teorisi için model olarak kullanılabilir. Daha öncede belirtildiği gibi abiyotik yönergelere sadece kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir. Fenoller ve diğer bileşenler

abiyotik enzimatik reaksiyonlar ile oluşturulurlar. Bu yoğunlaştırma teorisi yukarıda belirtilen tepkime ürünlerinin polimerleşme ile öce fulvik asit verdiği ileri yoğuşma ile humik asit ve sonunda humin ve kerogene dönüştüğünü varsaymaktadır. Ayrıca fenollerin, kinonların ve aminoasitlerin büyük polimerleri humik maddenin oluşumundan önce oluşturulabilir. Bu büyük biyopolimerler tepkimeye girdiklerinde ilk oluşması beklenen humin gibi büyük humik moleküllerdir sonra bunlar daha ileri bozunma ile humik ve fulvik asitlere dönüşmektedir. Bu Hedges'in orijinal kuramından biraz farklı olan biyopolimer parçalanma kavramına örnek teşkil etmektedir.

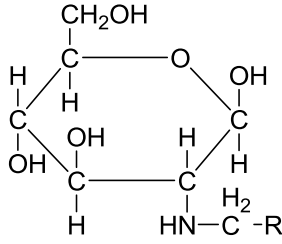


Şekil 2.11. Fenol protein teorisine göre humikleşmenin olası reaksiyonu

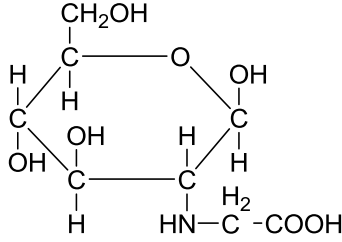
2.7.3. Şeker – amin yoğunlaşma teorisi

Bu teori farklı isimlerle ifade edilmiştir ve daha önceleri de tartışıldığı gibi bazıları albüminlerden elde edilen melanin yolu bazıları ise Maillard'ın tepkimesi olarak adlandırmıştır. Başlangıçta şeker ve amin kullanılan bir hipotezdir. Şeker ve amin humik madde sentezi için anahtar bileşenlerdir ve lignin türevlerini gerektirmezler. İlk olarak 1911 yılında Maillard tarafından rapor edilen tepkimede son ürün olarak melanin üreten glikoz ve amin arasında enzimatik olmayan veya abiyotik olarak gerçekleşen reaksiyondur. Zeichmann glisinine ile amin grubu arasındaki etkileşimler ile glikozilamin oluşumunun gerçekleştiğini rapor etmiştir. Glikozilamin olarak adlandırılan kısım sonunda albüminlerden elde edilen melanine dönüştürülecektir ve melaninler sonra polimerleşme ve yoğunlaşma ile humik madde oluşturacaktır.

Stevenson tarafından Maillard tepkimesinin bir dizi kompleks proses içerdiği rapor edilmiştir. İlk olarak şeker, amin ile reaksiyona sokularak schiff bazlarına dönüştürülür. Daha sonrada n-substituted glikozilamine dönüştürülür ve akabinde karışık Amadori yeniden düzenleme sürecine maruz kalır. Düzenlenme ürünleri tekrar oldukça karmaşık olan bir dizi katılma reaksiyonuna maruz kalır. Glikoz ve amin arasındaki etkileşimi daha rahat anlamak için aşağıdaki şekilde basit bir tepkime verilmiştir. Karşılaştırma amacıyla glikoz ve glisin arasındaki bir tepkime de verilmiştir. Şekilde gösterilen basit moleküler yapılar azotlu bileşiklerin ve karbonhidratların karışımıdır ve bunların yapısı otoklon aquatik humik maddeler ile yakından ilişkilidir [13]. Daha önceleri de tartışıldığı gibi sulu ortamdaki bitkisel materyaller lignini gerektirmezler ve çoğunlukla karbonhidratların karışımıdır. Bundan dolayı bu teori karadaki materyallerden etkilenmeyen sudaki humik maddelerin başlıca karbonhidrat-protein karışımlarından oluştuğunu gösterir.



Glikoz+Amin=Glikozilamin



Glikoz Glisin

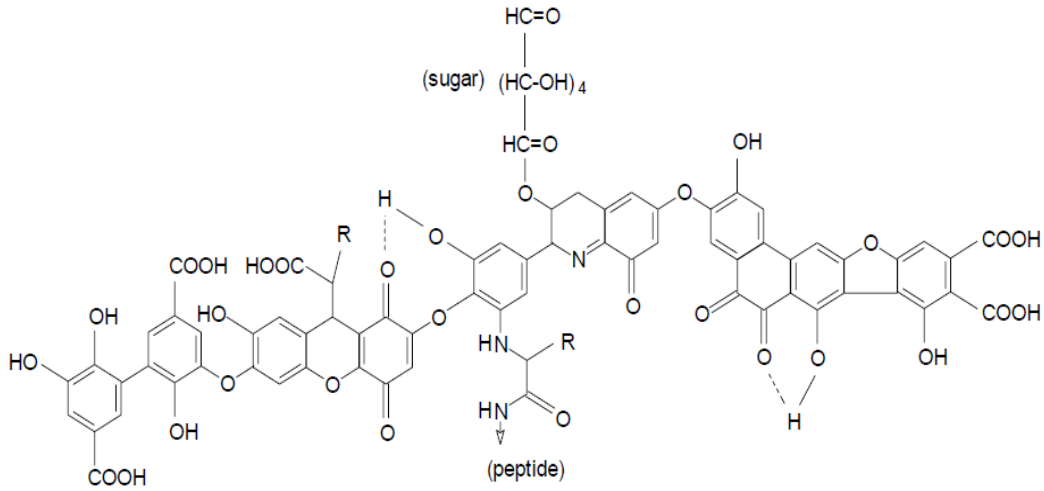
Şekil 2.12. Glukoz ile amin arasında ve glikoz ile glisin arasında gerçekleşen reaksiyon

2.8. Günümüzde Kabul Gören Humik Asit ve Fulvik Asit Yapıları

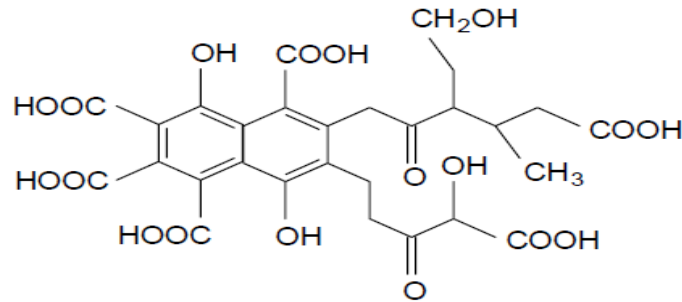
Bugünlerde fulvik ve humik asitlerin karışımının tanımlanması humik yapılar araştırmasındaki en önemli unsurlardan biri olduğu düşünülür. Analitik teknikler ve bilgisayar teknolojilerinin gelişmesinden dolayı fulvik ve humik asitlerin moleküler yapılarını açıklığa kavuşturmak için büyük çabalar sarfedilmektedir.

Stevenson (Şekil 2.13) ve Buffel'in (Şekil 2.14) çalışmasından tutun Shulten, Kujawnski ve Stenson'un günümüz son örneklerine kadar humik asitlerin yapısını tanımlamada birkaç moleküler yapı öne sürülmüştür. Uzun zamandır humik asitlerin yüksek molekül ağırlıklı bileşenler olduğu iddia edilmektedir. Ancak beş yıl önce humik asitlerin düşük molekül ağırlıklı bileşenler olduğu ispatlandı. Bu ilk kez IHSS'nin 9. Uluslar arası Sempozyumunda bildirildi. LDI-TOF MS vasıtasıyla elde edilen Humik asitlerin kütle spektrumu düşük değerlerden yükseğe doğru düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin mevcudiyetini gösteriyor. Farklı Humik asitler için elde edilen kütle spektrumunun analizi birkaç m/z değerlerinin tüm humik asitleri için aynı olduğunu gösterdi. Bazı bileşenlerin aynı olduğu ve onların humik asit içerisinde çok farklı kök ve kaynaktan olduklarını iddia ettiler. Diğer analitik tekniklerle birleştirilen kütle spektrometresinden elde edilen en son sonuçlar önceki

sonuçları doğruladı. Fulvik asitlere gelince birkaç bin bileşen tanımlamakta ve çoğunlukla lignin (odun özü) den türediği düşünülmektedir [41, 42].

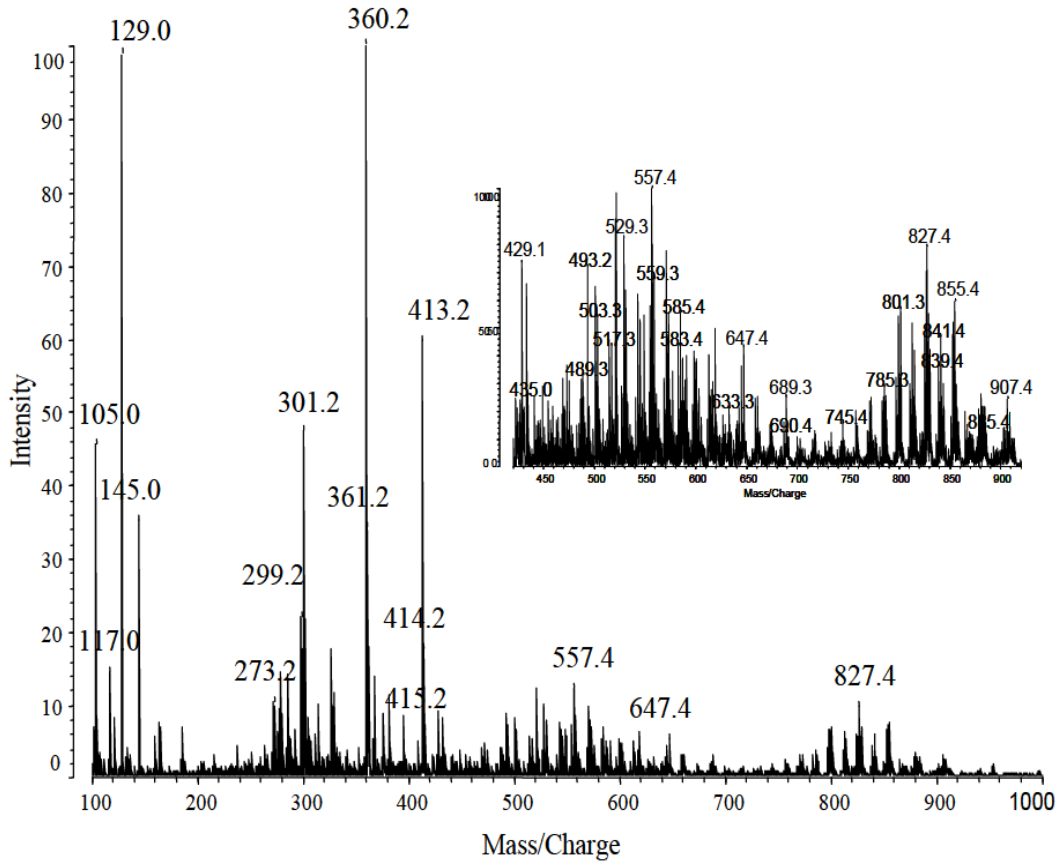


Şekil 2.13. Stevenson'a göre humik asidin yapı modeli: R alkali, aril alkil olabilir.



Şekil 2.14. Buffle ve ark. göre fulvik asit yapı modeli(1977)

Özgün fulvik asitlerin kimyasal formülleri belirlenmiştir [42]. Humik asitlerin durumunda son zamanlarda Fourier Dönüşüm ICR kütle spektrometri ve Laser Desorpsiyon/İyonlaşma ile birlikte elektrosprey iyonlaştırması uygulanarak başarılı sonuçlar elde edildi. LDI-TOF MS yardımı ile humik asitlerde var olan izotop karışımları gözlemlendi (Şekil 2.15). Pacheca ve Havel humik asitler için en son deneysel formülünü ileri sürdüler. Onların modelinden elde edilen sonuçlar ESI vasıtasıyla elde edilenlerle iyi bir uyum içerisindedirler [41, 42, 43, 44, 45].



Şekil 2.15. Humik asitlerin LDI-TOF-MS kütle spektrumu

2.9. Humik Maddelerin Uygulama Alanları

Humus dünyadaki en büyük karbon rezervlerinden birini simgeler. Humus ve humustan elde edilen ürünler endüstride bu zamana kadar az kullanılmıştır. Aksine kömürün kullanımı daha yaygındı ve 19. yüzyılın ikinci yarısında ve 20.yüzyılın ilk yarısında kimyasal endüstrinin temelini oluşturmuştur. Ayrıca petrol de diğer bir uygulamaydı ve 20. yüzyılın kimyasal endüstrisi için ana ham madde olarak kullanılmıştır. Humik maddelerin uygulama alanlarını; tarım, endüstri, çevre ve biyotıp olmak üzere dört ana kategoriye ayırmak mümkündür.

2.9.1. Tarım uygulamaları

Tarımda organik maddelerin rolü son derece önemlidir. Toprağın organik madde içeriği ile ürün verimi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Organik madde toprağı oluşturan materyalleri bir arada tutan, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştiren ana etmenlerden birisidir.

Toprağın organik madde içeriğini arttırmanın en iyi yolu toprağa ve bitkiye doğrudan humik asit uygulanmasıdır. Humik asitler toprakta uzun süre kalmakta ve zaman içinde yavaşça parçalanmaktadır. Humik asitler toprak verimini arttırmada ve sağlıklı bitki yetiştirilmede en önemli madde olarak kabul edilmektedir.

Toprak humik maddeleri, bitkilerin gelişiminde doğrudan ve dolaylı önemli rol oynarlar. Dolaylı etkiler, suyun tutulması, drenaj, havalanmanın iyileştirilmesi ve metalik iyonlar ile kilyetli bileşikler ya da metalik hidroksitler oluşturarak suda çözülebilir formların meydana gelmesi şeklindedir. Bitkilere doğrudan etkisi ise, kök gelişimi ve bitkilerin absorbe ettiği besin elementleri metabolizmasını etkilemesi ile meydana gelir.

Humik asitlerin tohumun çimlenme kapasitesini arttırdığı ve bitkilerin vitamin içeriğini çoğalttığı bilinmektedir. Humik asitlerin tohumun çimlenmesini etkilemesi bitkinin köklerini etkilemesine benzemektedir. Su ve besin maddeleri taşıyan humik taşıyan humik asitler tohumun gözeneği boyunca çekilmekte ve çimlenmenin başlaması için tohumu uyarmaktadır. Humik asitler sadece tohumu uyarmakla kalmaz, aynı zamanda kök sistemini ve üst kısmı da uyarmaktadır. Bitkiye geçen humik asitlerin polifenol kaynağı olduğu bunun da solunum katalisti vazifesi yaptığı tespit edilmiştir. Bu olay bitkinin yaşama aktivitesinin artmasına neden olmaktadır.

Humik asitler gerekli maddeleri bünyelerinde topladıktan sonra bunları bitkiye ihtiyaç duyduğu miktar kadar bırakmaktadır. Ayrıca humik asitler toprakta kilin gevşetmesini suyun toprağa nüfuz edişinin kolaylaşmasını, toprağın iyon değişim kapasitesinin artmasını ve toprak canlılarının uyarılmasını sağlamaktadır.

Özellikle killi toprakların sıkı bir yapı teşkil etmesi bitki beslenme ve gelişiminde ciddi bir problemdir. Humik asitler her bir kil parçacığının etrafında film yaparak bunları birbirinden ayırmaktadır. Böylece havadaki oksijen köklere ulaşmakta, bitki besin çözeltisi için gerekli su miktarı bitkinin kökleri etrafında yeterli miktarda sağlanmakta ve bitkinin kökleri gelişimini tamamlamaktadır. Humik asit suyun topraktan buharlaşmasını yavaşlatmaktadır. Bu durum kilin hiç olmadığı veya az olduğu su tutma kapasitesi olmayan kumlu topraklar için önemlidir. Ayrıca humik

asitler iklim şartlarına göre toprağın rengini daha koyu renkle dönüştürme özelliğine sahiptir. Böylece toprağın ısı şartları da değişmiş olmaktadır. Humik asitlerin kolloidal yapısı ve ana fonksiyonel grupların hidrofilleşmesinin yüksek seviyede oluşu onlara tutkal özelliği vermektedir. Bundan dolayı humik asit uygulamalarından sonra toprağın su tutma özelliğinin geliştiği ve kurak bölgelerde bunun etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Humik asitler toprağın tarımsal mücadele amacıyla kullanılan ilaçları özellikle de herbisitleri adsorbe ederek onların toksik etkilerini ve yıkanarak taban sularına karışmalarını; mevcut olan civa, kadmiyum gibi ağır metal ve diğer zararlı radyoaktif elementlerin bitkiler tarafından alınımını önler.

Humik maddeler toprak verimliliği için de önemli olan yüksek bir baz değişim kapasitesine de sahiptir [46,47].

Sodyum humatın ağaç yapraklarındaki dölleyici etkisi tanımlanmaktadır. Amonyum humatın önemli bir uyarıcı etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir [48].

Humik maddeler organik madde içerisinde az bulunduğu zamanda toprağın kalitesinin artışında olumlu yönde etki gösterirler. Son yapılan araştırmalarla humik asidin büyümeyi artırıcı etkisinden dolayı çiftlik hayvanlarının yemi olarak kullanabileceği görülmüştür [49].

2.9.2. Çevresel uygulamaları

Doğal organik kolloidler (humik ve fulvik asitler) oldukça önemlidir. Çünkü çoğu radyonüklidleri içeren metallerle kompleks oluşturarak suda çözünülebilirler. Bundan dolayı bu organikler çevrede radyonüklid taşıyan ajanlar kadar önemli olabilmektedir. Doğal suların içerisindeki humik maddelerin varlığı doğal topraklar vasıtasıyla radyonüklidlerin çekimini etkileyebildiği ve böylelikle onların yüzeydeki ve zeminin altındaki sulara etki edebildiği bilinmektedir [50,51].

Çevre kimyasında humik maddelerin başlıca görevi zehirli metalleri, antropojenik organik kimyasalları ve diğer kirletici maddeleri sudan uzaklaştırmaktır. Kalsiyum humata dayalı iyon değişim maddeleri demir, nikel, civa, kadmiyum ve bakır gibi ağır metallerin yok edilmesi için ve nükleer güç santrallerinden suya boşaltılan radyoaktif elementleri sudan uzaklaştırmak için uygun olduğu görülmüştür. Seçimli bağlayıcı özellikleri cephanelerin tahribi ve kimyasal savaş ajanları için kötüye kullanılmaktadır [52]. Humusa dayalı filtreler atık su üretimi için geliştirilmektedir. Filtreler kromat tasfiye ocağının atık sularını temizlemek için, atık su ve su sistemlerinden boya ve yağları çıkarmak için, kentsel ve endüstriyel atıkları filtrelerden süzmek için, atık sularda tarım ilaçlarını yok etmek için ve sudan fenolü çıkarmak için fayda sağlar [53].

Humus içeren materyallerden atık gazların emilimi için yararlanılmaktadır. Biraz değiştirilmiş olan humatlar kamu gaz rezervlerinden hidrojen sülfür ve merkaptanları baca gazlarından kükürt dioksiti çıkarmak için uygulanabilir [54].

Ot öldürücüler, endüstriyel fungusidler, insektisidler, yuvarlak solucan öldürücüler, dioksinler gibi bileşiklerin farklı grupları ve üstelik ostrojenik bileşikler gibi bazı eczacılıkta kullanılan ürünler çevresel endokrin maddeleri olarak belirlenir. Çevreden organik kirleticileri emme yeteneklerinden dolayı humik maddelerin su, toprak ve kanalizasyonlardan bu kirleticileri yok etmede etkili olduğu görülmüştür [55,56].

Humik maddeler ve ksenobiotikler arasındaki etkileşimin kompleks yapısı ve çevre kalitesindeki etkisi farklı araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır. Birkaç inorganik ve organik bileşiğin asit-baz ve humik asitlerin kompleksleşme özelliklerinden dolayı toprak, su kalitesi ve endüstriyel süreçlerindeki etkisi gittikçe dikkat çekmektedir. Pacheco ve ark. bazı inorganik ve organik kirleticilerin sadece belirli humik asit bileşenleri ile kuvvetli bir kompleks oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu gibi moleküller çok moleleküllü stabil bir yapı gösterirler.

Humik materyaller ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler üzerinde son 30 yıldır yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Fermantasyon bakterisi humik maddeleri azalttığı görülmüştür. Bu durum toprak ve tortulardaki anaerobik (havasız yaşayan)

bakterilerin autekolojisi için önemli sonuçlar elde etmektedir. Asetatın kümülatif (birikici) üretimi sırasında bu prosesin fermantasyon bakterisine enerji avantajı sağladığı görülür [57]. Belirli bakteriler, mantar ve birçok mikroorganizma için enerji kaynağı olarak humiklerin kullanımı birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [58]. Fakat yiyecek kaynağı olarak humik materyalleri kullanamayacakları belirlenmiştir.

2.9.3. Biyomedikal uygulamaları

Ticari düzeyde üretilen humik maddeler veterinerlik ve eczacılıkta kullanılır. Humik materyallerin ilaç özellikleriyle ilgili birkaç çalışma yayınlanmıştır.

Humik asitlerin etil alkolün sebep olduğu gastritin zararını önemli bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Mide ve duodenuma (onikiparmak bağırsağı) TPP deneysel olarak uygulandığında hızlı bir şekilde iyileşme gözlemlendiği belirlenmiştir [59,60].

Pflug ve Ziechman humik asitlerin mikrokokus luteus bakterisiyle etkileşebileceklerini bildirdiler. Bu durumda humik materyaller lizozom enzimi tarafından hücre duvarı bozulmasına karşı organizmayı korurlar. Herpes virüsü aracılığıyla hücre kültürlerinin amonyum humat ile enfeksiyonunu bulan Thiel humik maddelerin işlevini organizmanın koruyucuları olarak belirtmiştir.

Son 10 yılda tıp ve biyolojide humik materyalleri kullanmaya büyük bir eğilim olmaktadır. Humuslu toprağın amino asitler ile ekstraksiyonun mümkünlüğü kozmetik ve ilaç üretiminin temelini oluşturan vitamin B benzerlerinin aday oluşu üzerine çalışılmaktadır. Humik asitlere gittikçe artan ilginin ana sebebi onların antiviral, profibrinolitik, alevlemeyi önleyen ve ostrojenik özellikleri ile açıklanabilir. Ağır metallerle şelat bileşiklerini oluşturmak için humik maddelerin gücü ağır metallerin canlı organizmalardan ayıklanmasını sağlamaya fazlasıyla yeter [61]. Su sistemleri ve su çözeltilerindeki humik materyallerin su tedavisi ve banyo tedavisi ile yakın bir şekilde bağlı olduğu gözlemlendi [62].

Humik maddelerin anti bakteriyel ve antiviral özellikleri sayesinde yeni tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [63,64].

Hastane çalışmaları çocuklarda yaygın olan ağır solunum hastalıklarının fulvik asit besin takviyeleri ile hızlı şekilde iyileştirilebileceklerini gösteriyor. Fulvik asit zengin organik humus topraklarda ve eski bitki kalıntılarındaki humik asitin bir özüdür. Birçok tıbbi çalışma humik yapıların özellikle fulvik asitlerin kanser ve kansere neden olan virüslere karşı koruyucu bir güce sahip olduğunu gösteriyor.

Genellikle çalışmalar özel humik madde terapileri kullanarak ölümcül kanser ve tümörlerin tersine çevrildiğini gösteriyor [65,66,67].

Diğer taraftan humik asitin birçok memeli hücresi için zehirleyici bir faktör olduğu kanıtlandı. Fakat onun sitotoksitesinin (hücreye zehirli olma durumu) spesifik mekanizması belirsiz olarak kalmıştır. Humik asidin redoks özelliği sulu ortamlarda geniş pH aralığında demir (III) ü demir (II)'ye indirgemek için yeterlidir fakat bu süreç kısmen süperoksit çürükçüller tarafından engellenir. Demirli proteinden elde edilen demirin humik asit bazlı lipid peroksidasyonunu hızlandırdığı görülmektedir. Humik asitler lipid peroksidasyonuna katkı sağladığı kadar demirli protein deposundan demir ortaya çıkartabilir ve demiri indirgeyebilir. Bundan dolayı ortaya çıkan demirle birleşen humik asitler biyolojik sistem içerisindeki redoks dengesini bozabilir ve oksidatif strese neden olabilir. Bu olay humik asit sitotoksitesi için en önemli mekanizmalardan biridir [68].

2.10. Ormangülleri (Rhododendron L.)

Orman gülleri olarak bilinen Rhododendronlar Kuzey yarımkürede 850'den fazla tür ile temsil edilir. Avrupa'da Alp Dağları, Doğuda Kafkas Dağları ve Himalaya dağları olmak üzere geniş bir alanda yayılış gösteren ormangülleri, Güneydoğu Asya'da Tayland, Vietnam, Malezya ve Filipinler'de yayılış alanı bulur.

Daha güneyde Endonezya adalar grubuna kadar inen ormangülleri, Avustralya kuzeyinde yayılış alanlarının en güneyine de sokulmuş olur.

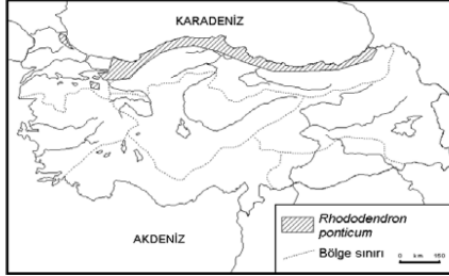
Çok geniş alanlara yayılan ormangüllerinin yaşam şekilleri de farklıdır. Çoğunlukla çalı ya da küçük ağaçlar olan ormangüllerinin bazı türleri epifit yaşam şekillerine sahiptir. Bilindiği gibi epifit bitkiler doğrudan toprağa bağlı olmayan bitkilerdir. Bunlar çoğunlukla ağaçların gövdeleri ya da dalları üzerine yerleşerek, gıda emici organları ile üzerine yerleştikleri bitkiden beslenir.

Fundagiller (Ericaceae) grubuna ait olan ormangüllerinin bilimsel adı (Rhododendron), gül ağacı anlamına gelmektedir (Yunanca rhodon: gül; dendron: ağaç). Ormangüllerinin çoğunluğu daima yeşil yapraklıdır. Bu yapraklar deri gibi sert ve genellikle ovaldir. Ormangülü yaprakları uçucu yağ, erikolin, arbutin ve andomedal türevleri (andromedatoksin = grayanotoksin-I ve diğerleri) gibi etken maddeler içermektedir. Yaprak ve çiçeklerinde zehirli bileşikler (andromedotoksin ve diğerleri) taşıması nedeniyle genç yaprak ve sürgünlerle beslenen keçi ve koyunlarda tehlikeli zehirlenmeler görülmektedir. Ormangülleri yayılış alanlardaki bazı yörelerde tıbbi bitki olarak da kullanılmaktadır. Örneğin, Karadeniz bölgesinde yetişen *R. ponticum* yöre halkı tarafından tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Ormangülleri nem oranı yüksek, organik madde bakımından zengin, derin ve iyi drenaja sahip olan asit topraklarda iyi gelişim göstermektedir.

2.10.1. Mor Çiçekli Ormangülü (*Rhododendron ponticum*)

Türkiye'nin kuzey kıyılarını bir kuşak halinde kaplayan nemli orman formasyonu içinde en dikkat çekici cinslerden birisi, kuşkusuz ormangülleri (*Rhododendron L.*)'dir. Türkiyedeki ormangüllerinden en yaygın olanı mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron Ponticum*)'dur. *Rhododendron ponticum* Türkiye'de batıda Istranca dağlarından başlayıp, doğuda doğu Karadeniz kıyı dağlarına kadar (Şekil 2.16), dağların kuzey yamaçları boyunca yayılışını sürdürür. Genellikle kayın ormanlarında hakim olan ormangülüdür. Dikey yöndeki dağılışı çoğu yerde deniz seviyesi ile 1800 metreler arasında olmakla beraber nadiren 2000 metrelik yükseltilere de erişir. Ormancılar tarafından “inatçı bir diri örtü” olarak tanınan *R. ponticum*, önemli bir siper bitkisidir. Bulunduğu alandaki bitkisel döküntüler çoğu zaman ayrışamaz. Bu nedenle yayılış alanında hem diğer bitkilerin gençleşmesine engel olur, hem de toprak faunasının fakirleşmesine yol açar. Proje kapsamında yer alan bölgelerin fazla

yağış alması, rakımın yüksek olması ve yıllık sıcaklık ortalamasının düşük olması nedeniyle mikroorganizma faaliyetleri yavaş olacağından organik madde (humus) kalınlığının 20 cm üzerinde olacağı tahmin edilmektedir.



Şekil 2.16 Mor çiçekli ormangülünün Türkiye’de yayılışı

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasalların hemen hemen tamamı yurtdışından satın alınmak suretiyle temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların markası Merck, Aldrich, Fluka ve Alfa-Aesar'dır.

NaOH; humus numunesinden humik ve fulvik asitleri ekstrakte etmek için Aldrich marka NaOH kullanıldı.

HCl; humik ve fulvik asit karışımından humik asiti çöktürmek için Merck marka %37'lik HCl kullanıldı.

NaHCO₃; elde edilen humik asit numuneleri Fluka marka NaHCO₃'ün çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerinde çözülerek UV analizine hazırlandı.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

3.1.2.1. Santrifüj cihazı

Humik madde ve humin içeren çözelti karışımından humini çökmesini sağlamak için, humik ve fulvik asit içeren çözelti karışımından humik asidi çöktürmek için ve humik asidin yıkanması aşamalarında Hettich Zentrifugen ROTINA 420 marka max:11000 rpm gücünde santrifüj cihazı kullanıldı.

3.1.2.2. Çalkalayıcı

Toprak humusundan humik maddeyi çekmek için humusun NaOH çözeltisi ile çalkalanması aşamasında, humik asitin çöktürülmesi ve yıkanması aşamalarında BİOSAN-OS-10 marka max:300 rpm gücünde çalkalayıcı kullanıldı.

3.1.2.3. pH metre

pH ölçümlerinde Hanna instruments pH 211 Microprocessor marka pH metre kullanıldı.

3.1.2.4. Termometreli ısıtıcı

Humik asitin kurutulması aşamasında sıcaklığı 70 °C' ye sabitlemek amacıyla Heidolph MR Hei-standart marka termometreli ısıtıcı kullanıldı.

3.1.2.5. Vakum pompası

Humik asidin kurutulması aşamasında NaOH çözeltisi ve diğer safsızlıkları, humik asidin bozunmayacağı bir sıcaklıkta uzaklaştırabilmek için, dış basıncı düşürmek amacıyla Heidolph marka vakum pompası kullanıldı.

3.1.2.6. Etüv

Laboratuar malzemelerinin kurutulması için Heraeus Thermo (Electron Corporation) marka etüv kullanıldı.

3.1.2.7. Hassas terazi

Tartım işlemleri AND GX-200 marka max:2100 g, min:0,01 g, e=0,1 g, d=0,01 g özelliklere sahip hassas terazi kullanıldı.

3.1.2.8. Elek

İstenilen tanecik boyutunda humus numunelerinin elde edilebilmesi ve gereksiz materyallerden ayrılması için 2 mm çapındaki (10 mesh) elek kullanıldı.

3.1.2.9. Havan

Toprağın dövülmesi amacıyla yüzey alanı geniş özel yapı havan kullanıldı.

3.1.2.10. Toprak küreği veya beli

Tarlanın değişik noktalarından örneklerin toplanması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.11. Kova ya da leğen

Alınan numuneler kova ya da leğen içerisinde iyice karıştırılarak paçal (karışım) işlemi gerçekleştirildi.

3.1.2.12. Naylon torba

Hazırlanan örnekler ağzı bantlı naylon torbalara koyuldu.

3.1.2.13. Etiket

Torbanın içerisine tarla bilgilerini yazabilmek ve torbanın ağzını bağlamak için etiket kullanıldı.



Şekil 3.1. Toprak numunesi almada kullanılan çeşitli alet ve malzemeler

3.1.3. Spektroskopik yöntemler

Elde edilen humik ve fulvik asidin yapısında bulunan fonksiyonel grupların belirlenebilmesi ve yapı karakterizasyonu için çeşitli spektroskopik yöntemler kullanıldı.

3.1.3.1. UV

Shimadzu-UV-2401 PC (UV-VIS Recording Spectrometer) marka UV spektrofotometresi kullanılarak humik asitlerin UV analizleri yapıldı.

3.1.3.2. IR

Hümik aside ait yapısal bilgiler azaltılmış diffüze reflektans Foriyer Transform Infrared (ATR-FTIR) kullanılarak araştırıldı.

3.1.3.3. NMR

Bruker AMX 300 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten D) marka NMR kullanılarak ^{13}C CPMAS NMR spekturumu alındı.

3.1.3.4 ESI-MS

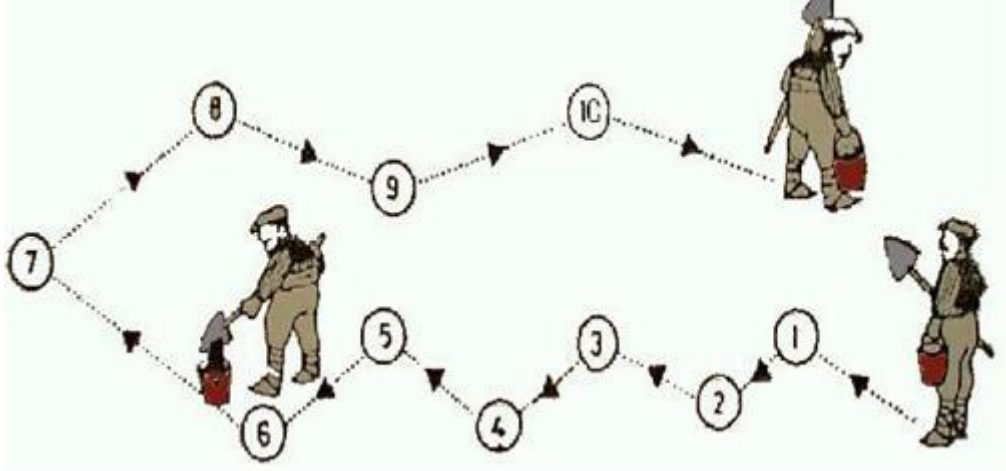
ESI-MS spektrumları Esquare 3000^{plus} ion-trap (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) kütle spektrofotometresi kullanılarak alındı.

3.2. Metot

3.2.1. Humus numunelerinin toplanması

Değişik tarlaların topraklarında farklı miktarlarda bitki besin maddesi bulunmaktadır. Bunun için her tarladan ayrı ayrı toprak örneği alınması gerekir. Aynı tarla içinde, değişik özellik gösteren kısımlar bulunabilir. Mesela tarla toprağının bir kısmı açık renkli, diğer bir kısmı koyu olabilir. Bu renk farklılığı bize tarlanın bu iki kısmında organik madde demir gibi birçok madde bakımından farklılıklar olduğunu gösterir. Tarlanın bir kısmı düz bir kısmı eğimli olabilir veya tarlanın bir kısmı çorak, diğer bir kısmı nispeten daha verimli olabilir. Eğer aynı tarlanın içinde böyle farklı yerler varsa bu alanlardan da ayrı ayrı toprak örneği alınmalıdır.

Tek Yıllık Bitkiler İçin; Kompoze (karışık) toprak örneği, örnek alınacak yerin büyüklüğüne göre, 8-10 noktadan alınan toprakların birbirleriyle karıştırılması suretiyle meydana getirilen örnektir. Toprak örneği alınacak saha bir tarla ise, örneklenecek kısmın bir tarafından başlanır ve Resim 3.2'de görüldüğü gibi zig zag bir hat oluşturularak V harfi şeklinde ve 20 cm derinliğinde çukurlar açılır. Sonra çukurun düzgün tarafından 3-4 cm kalınlığında bir toprak dilimi bahçe küreği veya bel ile kesilerek kürek üzerine alınır. Kürek üzerine alınan toprak sağından, solundan ve küreğin ucuna gelen kısımlardan tıraş edilmek suretiyle düzgün bir hale getirilir.



Şekil

3.2. Karışık toprak örneklerinin tarlanın bir ucundan diğer ucuna doğru zig-zag çizilerek açılan çukurlardan alınması

Burada dikkat edilecek husus; tarlanın üst kısmını temsil eden ve küreğin sap kısmına yakın olan toprak kısmının atılmamasıdır. Bu şekilde alınan toprak bir bez üzerine veya bir kova içerisine alınarak, aynı işlem tarlanın 8-10 kısmında da tekrarlanır. En sonunda bez üzerinde veya kova içerisinde biriken yaklaşık 1 kg toprak el ile iyice karıştırılır, kesekler parçalanır ve ele geçen taş ve bitki kök parçaları atılır.

Toprak numunesi alınırken Şekil 3.3'de görüldüğü gibi V harfi şeklinde bir çukur kazılır. Sonra çukurun düzgün yüzeyinden 3-4 cm kalınlığında 18-20 cm boyunda bir toprak dilimi alınır.



Şekil 3.3. Toprak numunesi alınması

Çok yıllık bitkiler için; tek yıllık bitkilerden farkları toprağın sadece 20 cm derinliğinden (pulluk sürüm derinliğinden) değil toprağın derinlemesine de örnek alınması gerekir. Çok yıllık bitkilerde genellikle 0-20, 20-40, 40-60 cm derinlikten örnek almakla birlikte gerekli görülürse 60-90 veya 90-120 cm derinliklerden de toprak örneği alınır. Tabi ki bu derinliklerden toprak örneklerinin alınmasında kürek yeterli değildir. Bu örnekler çeşitli tipte burgularla alınabileceği gibi tarlada bu derinliklere kadar bir çukur (boy çukuru) kazılarak bu çukurun düzgün bir kenarından örnekler alınabilir.

3.2.2.Örneklerin etiketlemesi

Hazırlanmış ve torbalanmış olan toprak örneğinin etiketlenmesi numunenin kime ait olduğunu hangi tarladan alındığı belirlemek için yapılır. Bunun için bir kağıda kurşun kalemle numunenin adı soyadı, toprak örneğinin nereden alındığı (tarlanın adı veya aynı tarladaki değişik yerlerin adları) ve önümüzdeki ekim döneminde bu tarlaya hangi bitkiyi ekeceği, geçen yıl bu tarlaya hangi bitkiyi ektiği bilgileri yazılır. Hazırlanan bu kağıt torbanın içine konur. Eğer yapılabılırsa aynı kağıttan bir tane de torbanın dışına bağlanır.

3.2.3.Örneklerin torbalanması

Toprak örnekleri eğer naylon torbalara konulmuşsa naylonlar birkaç yerinden kalemle delinir. Böylece topraktan çıkacak nemin bu deliklerden uçması sağlanır. Aynı zamanda içine koyduğumuz kağıt etiketin nem dolayısıyla parçalanması engellenmiş olur.

3.2.4. Humus numunelerinin kurutulması

Toplanan humus numuneleri bir ay boyunca havada kuru hale gelene kadar kurutuldu.

3.2.5. Humus numunelerinin dövülmesi ve elenmesi

Humus numuneleri havada kuru hale getirildikten sonra, istenilen tanecik boyutunda numuneler elde edebilmek için yüzey alanı geniş özel yapım havan kullanılarak dövüldü.

3.2.6. Humus numunelerinden humik asidin ekstraksiyonu

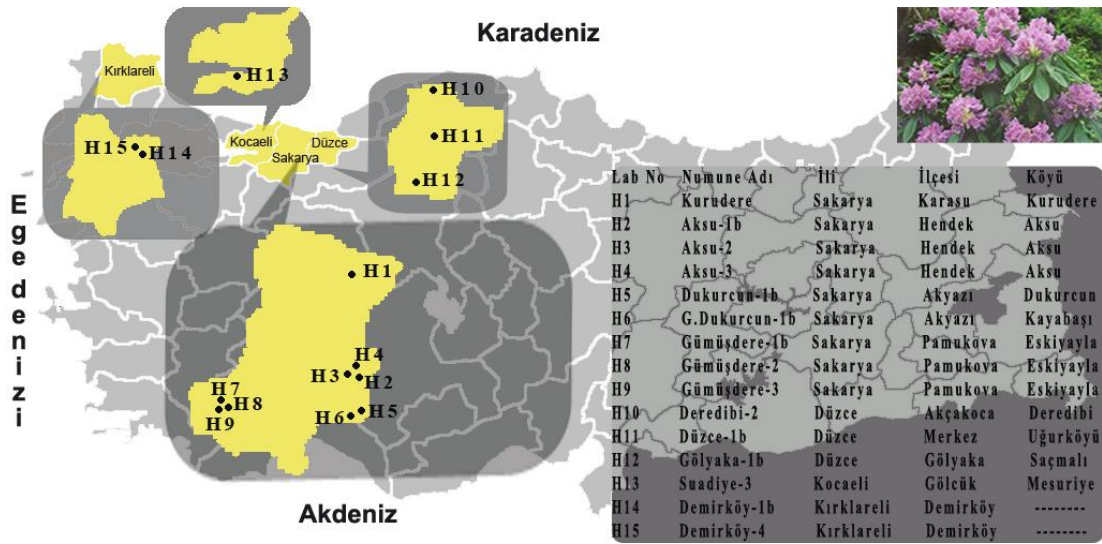
Kullanılan metot Schnitzer ve Khan (1978) tarafından önerilmiş ve Tatzber ve arkadaşları (2007) tarafından geliştirilmiştir. Bu metotta, her bir örnekten 10 g alınır ve 1 molar NaOH çözeltisi ile bir gece boyunca çalkalayıcıda çalkalanır. Daha sonra 11,000 devirde yarım saat boyunca santrifüj edilir ve çökelti ile süzüntüler birbirinden ayrılır. Süzüntüler koruyucu bir kapta saklanırken çökelti kısımları tekrar NaOH çözeltisi ile çözündürülür ve bu şekilde ekstraksiyon iki kez daha tekrarlanır. Üçüncü ekstraksiyonla birlikte ele geçen bütün süzüntüler birleştirilir ve karışıma %37'lik konsantre HCl eklenerek humik asidin çökmesi sağlanır. Bu karışım 6 saat çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 20 dakika 11,000 devirde santrifüj edilir. Katı ve sıvı kısımlar ayrılır. Katı kısım humik asittir ve saflaştırılması gerekmektedir. Schnitzer ve Khan (1978) tarafından uygulanan saflaştırma aşaması ile Tatzber ve arkadaşları(2007) tarafından uygulanan saflaştırma metodu arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Schnitzer ve Khan (1978) tarafından uygulanan saflaştırma

metodunda humik asit örneği 1 molar NaOH çözeltilsinin 5 mL'si ile çözümlürölür yaklaşık 29 mL saf su eklenir ve 0,4 mL HCl ile humik asit çöktürölür ve bu işlem iki kez daha tekrarlanır. Tatzber ve arkadaşları (2007) tarafından uygulanan saflaştırma metodunun ilk basamağında humik asit örneği 20 mL sodyum hidroksit çözeltilsi ile çözümlürölüp, saf su ile 200 mL'ye tamamlanır ve ardından 3 mL HCl kullanılarak humik asit çöktürölür. Santrifüj ve dekantasyon işleminin ardından humik asit ayrılarak saflaştırma işleminin ikinci basamağına geçilir. Bu aşamada humik asit örneği 10 mL sodyum hidroksit çözeltilsi ile çözümlürölerek 1,5 mL HCl ile çöktürölür ve üçüncü yıkamada humik asit örneği yalnızca saf su ile yıkanarak 10 damla HCl ile çöktürölür. Elde edilen saf humik asit örneği kurutularak saklanır.

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Numune Yerlerinin Seçimi

Yapılan çalışmada Batı Karadeniz Bölgesinde bulunan Düzce, Sakarya, Kocaeli ve Kırklareli illerinin şekil 4.1. 'de harita üzerinde gösterilen ilçelerinden mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron Ponticum* L.) bitkisine ait humus örnekleri toplandı.



Şekil 4.1. Humus numunelerin alındığı bölgelerin haritada gösterimi

4.2. Humus Örneklerinin Toplanması

Düzce, Sakarya, Kocaeli ve Kırklareli illerinin şekil 4.1. deki haritada gösterilen köylerinde bulunan ormangülü bitkisine ait humus örnekleri literatürde belirtilene bağlı kalınarak toplandı. Numune alınırken tarlanın özelliklerini bütünüyle yansıtmayı açısından homojen bir şekilde numune alınmasına özen gösterildi. Alınan numuneler herhangi bir karışıklığa imkan vermemek için etiketlendi. Bunun için bir kağıda kurşun kalemle numunenin adı soyadı, toprak örneğinin nereden alındığı

(tarlanın adı veya aynı tarladaki değişik yerlerin adları) yazıldı. Hazırlanan bu etiketler daha sonra bilgisayar ortamına geçirilerek tablo 4.1.'de görüldüğü gibi düzenlendi.

Tablo 4.1. H1 numunesine ait etiket bilgileri

Numune Adı	Kurudere
Laboratuvar No	H1
Numunenin Alındığı Tarih	31.10.08
Numunenin Alındığı İl	Adapazarı
Numunenin Alındığı İlçe	Karasu
Numunenin Alındığı Köy	Kurudere
İşletme Müdürlüğü	Karasu İşl. Müd.
İşletme Şefliği	Kurudere İşl. Şef.
Mevkii	Acılma
Bölme No	4
Bakı	K.Doğu
Rakım	-
Raftası	E25d3
Koordinatları	Y: 36T3085173 X: 4542148
Numune Noktasının Mesçere Tipi	Knc3
Numune Noktasının Ağaç Türü	Kayın
Bitki Örtüsü	Kn/Rh
Toprak Profil Türü	O ₂
O ₂ Profil Kalınlığı	30 mm

4.3. Humus Örneklerinin Kurutulması

Şekil 4.1'deki haritada görülen bölgelerden alınan orman gülü humusu laboratuvar bençlerinin üzerine serilerek 15 gün boyunca kuruması sağlandı. Bu şekilde humus numuneleri havada kuru hale getirilmiş oldu.

4.4. Humus Örneğinin Dövülmesi ve Elenmesi

Laboratuarda havada kuru hale getirilen orman gülü humusu, yüzey alanı geniş özel yapım havanda tokmak ile dövüldü. Ardından belirli tanecik boyutunda humus numunelerinin elde edilebilmesi ve yabancı materyallerin humus örneğinden uzaklaştırılabilmesi için 2mm çapında (10 mesh) elekten geçirilerek elendi.

4.5. Orman Gülü Humusundan Humik Asidin Ekstraksiyonu

Belirtilen bölgelerden toplanan dövölüp elenmiş Ormangülü humusundan 10'ar gram tartılarak 5 ayrı erlene koyuldu. Örneklerin üzerine 1 molar NaOH çözeltisinden 50'şer mL eklendi ve bir gece boyunca çalkalayıcıda 200 devirde (rpm) çalkalandı. Ertesi gün her bir numune 2'şer tane 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Her bir numuneye ait birinci süzüntüler koruyucu bir kap içerisinde birleştirilerek saklandı. Aynı numuneye ait çökeltiler birleştirildi ve her bir numuneye tekrar 1 molar NaOH çözeltisinden 50'şer mL eklendi. Bir gece boyunca çalkalayıcıda 200 devirde (rpm) çalkalanması sağlandı. Ertesi gün yine her bir numuneye ait karışım 2'şer tane 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Her bir numuneye ait ikinci süzüntü ve çökeltiler birbirinden ayrıldı. Ayrılan ikinci süzüntüler birinci süzüntülerin bulunduğu toplama kabına alındı. Aynı numuneye ait çökeltiler birleştirildi ve her bir numuneye tekrar 1 molar NaOH çözeltisinden 50'şer mL eklendi. Bir gece boyunca çalkalayıcıda 200 devirde (rpm) çalkalanmaya bırakıldı. Ertesi gün yine her bir numune 2'şer tane 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. elde edilen süzüntü ve çökeltiler birbirinden ayrıldı. Her bir numuneye ait üçüncü süzüntüler de daha öncekilerle birleştirildi. Bu süzüntüler humik ve fulvik asitlerin karışımını içerirken çökelti kısmı humini ifade etmektedir.

4.6. Humik ve Fulvik Asit Karışımından Humik Asidin Çöktürülerek Ayrılması

Her bir numune için ayrı ayrı elde edilen humik ve fulvik asitlerin karışımına 25'er mL %37'lik konsantre HCl katıldı. Çökelme gözlemlendi ve karışımlar çalkalayıcıda 6 saat boyunca 200 devirde (rpm) çalkalandı. Daha sonra her bir numune 2'şer adet 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 11000 devirde (rpm) 20 dakika santrifüj edildi. Çöken kısım humik asit, süzüntü ise fulvik asittir. Humik asit yıkama işlemi için ayrıldı.

4.7. Humik Asidin Yıkaması

Çöktürülerek fulvik asitten ayrılan humik asitler 1 molar NaOH çözeltisinin 20 mL'si ile çözüldü ve saf su ile 200 ml'ye tamamlandı. Karışıma humik asidi çöktürmek için 3 mL %37'lik konsantre HCl eklendi. Çökeltmenin başladığı gözlemlendi ve çalkalayıcıda 30 dakika 200 devirde (rpm) çalkalandı. Sonra her bir numune 4'er tane 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde santrifüj edildi. süzüntüler atılırken, aynı numune ye ait çökelti birleştirilerek ikinci yıkama işlemine geçildi. İkinci yıkamada humik asit çökelti 1 molar NaOH çözeltisinin 10 mL'si ile çözüldü ve saf su ile 200 mL'ye tamamlandı. Humik asidi çöktürmek için 1,5 mL %37'lik konsantre HCl çözeltisi eklendi. Çöken humik asidi ayırmak için her bir numune 4'er tane santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Süzüntüler atılırken aynı numuneye ait çökelti birleştirilerek üçüncü yıkamaya geçildi. Çökeltiye bu defa 80'er mL saf su eklendi ve humik asidi çöktürmek için 10 damla %37'lik konsantre HCl eklendi. Çöken humik asit 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Süzüntüler atılırken elde edilen humik aside içerisindeki safsızlıkların giderilmesi için kurutma işlemi uygulandı.

4.8. Humik Asidin Kurutulması

Elde edilen humik aside, içindeki çeşitli çözücü ve safsızlıkların uzaklaştırılması için vakuma altında kurutma işlemi yapıldı. Elde edilen humik asit örneği çift boyunlu vidalı balona alındı. Balonu bir boynuna septum takılırken diğer boynuna vidalı kapak takıldı ve vakum koluna vakum pompası bağlandı. Isıtıcının üzerine yağ banyosu koyularak sıcaklık 70°C'ye sabitlendi. Vakum destilasyonu metoduyla humik asit içerisindeki çeşitli çözücü ve safsızlıklar humik asidin bozunmadığı bir sıcaklıkta uzaklaştırıldı. Kurutma işlemi 3-4 saat boyunca devam ettirildi. Kuruyan humik asitlerin nem kapmaması için balonun septum takılı olan boynuna azot balonu takılarak, kuru humik asit azot atmosferi altında kahverengi şişelere alınıp desikatörde saklandı.

4.9. Spektroskopik Sonuçlar

Saflaştırılan humik asit yapılarının karakterizasyonu için başta ESI-MS ve MALDI-TOF kütle spektroskopisi olmak üzere katı hal ^{13}C NMR, FTIR ve UV gibi çeşitli spektroskopik yöntemlerden faydalanıldı.

Humik maddelerle ilgili yapısal ve bileşim özellikleri konusunda en genel bilgiler elementel analiz, UV-Visible, IR ve ^{13}C NMR teknikleri ve bazı bozulma metotları kullanılarak elde edilir.

Hümik maddelerin karbon hidrojen oksijen ve azot bileşimleri onların yapısı ve nereden geldikleri konusunda bilgiler verir. Burada elde edilen veriler H/C, O/C ve N/C şeklinde ele alınır ve buradan farklı hümik asitler konusunda bilgi edinilir, topraktaki ve sedimentlerdeki humatların yapısal değişimleri ve yapısal formülleri konusunda bilgi edinilir.

4.9.1. Uv-Visible spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

UV-Visible spektroskopi farklı fonksiyonel grupların verdiği bantların oluşturduğu spektrumlarda piklerin çok fazla örtüşmelerinden dolayı fazla önerilen bir teknik olmamasına rağmen humik maddelerin karakterize edilmesinde ve belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir.

Seyreltik hümik madde çözeltilerinin 446 ve 665 nm dalga boyu absorbanlarının oranı, E4/E6 hümik maddelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılır. Elde edilen oran miktarı humik maddelerin toplam karbon miktarı, aromatik grup miktarına karşı alifatik grup miktarını ve molekül ağırlıkları konusunda bilgi verir.

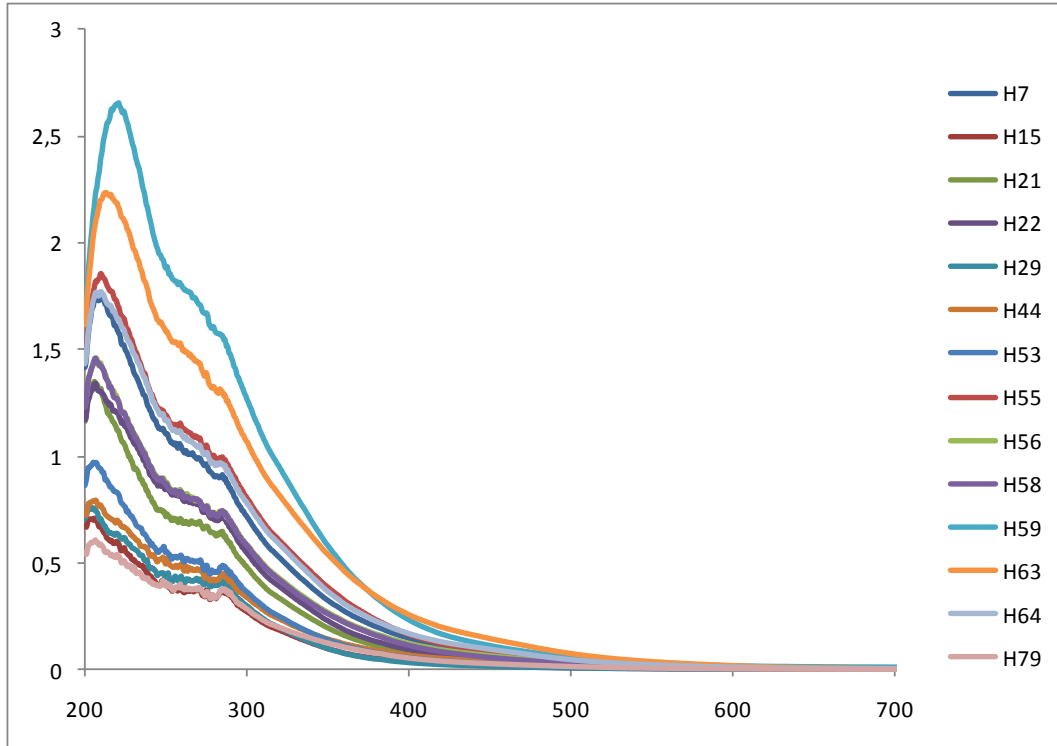
Tüm humik maddeler sahip oldukları molekül yapısı gereği birçok fonksiyonel gruplar içerirler. Bu fonksiyonel gruplar farklı bölgelerde absorpsiyon gösterirler. Bu absorpsiyon değerleri yüksek dalga boylarına doğru azalma gösterir. Elde edilen absorpsiyon spektrumlarında genel olan dalga boyu 270-280 nm dalga boyu aralığındaki $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleridir. Bu dalga boyu aralığında tüm aromatik gruplar

absorpsiyon verirler. Burada ölçülen değerler humik asit moleküllerindeki aromatik yapıların miktarlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Humik asitin yapısındaki (fenolik bileşikler, anilin türevleri, benzoik asit, polienler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar) çeşitlilik, farklı bölgelerdeki absorpsiyon piklerinden anlaşılabilir. Bu yapıların belirlenmesinde numunelerin nerelerden geldiği konusunda bir fikir verecektir. Molar absorptivite ler humik asitlerin aromatiklik derecelerini, hü mikleşme miktarlarını ve molekül ağırlıkları konusunda bilgi verecektir. Yapılarında barındırdıkları çok farklı gruplardan dolayı hü mik asitler çok farklı maddelerle etkileşim yapabilirler. Bunlar, polar olmayan maddeler, organik kirleticiler, metaller ve radyoaktif çekirdekler şeklinde sıralanabilir.

Bu çalışmada izole edilen humik asitler için absorpsiyon spektrumları 200 nm ile 700 nm aralığında kaydedildi. Literatürde aromatik miktarların belirlenmesinde farklı yöntemlerin takip edildiği görülmektedir. Bunlardan birincisi molar absorbanların belirlenmesinde sonra 280 nm numunelerin absorbanlarının ölçülmesi ve aromatik miktarın hesaplanması için türetilmiş formülün kullanılmasıdır. Bu formül Traina ve arkadaşlarının kullandığı formüle yakın bir formüldür. Formülde verilen ϵ değeri molar absorptiviteyi gösterir.

$$\text{Aromatiklik} = 0.05 \epsilon + 6.74$$

Aromatiklik derecesini belirlemede kullanılan ikinci bir yol ise ve 665 ve 465 nm dalga boylarında absorpsiyonların ölçülmesi ve bu dalga boylarına göre $E4/E6$ oranların bulunması esasına dayanır. Yu-Ping ve arkadaşları bu ikinci yöntemden elde edilen veriler arasındaki korelasyonun birinciye göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Fakat birinci yöntemin tam doğru olduğunu söyleyebilmek için molar absorptivitenin nasıl belirlendiğinin belirlenmesi gerekir. Hü mik asitler çok farklı molekül yapıları içerdiğine göre hangi yapıya göre ve hangi molekül ağırlığına göre molar absorptivitenin belirlenmesi gerektiği bilinmelidir.



Şekil 4.2. Bazı humik asitlerin UV spektrumları

4.9.2. FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Hümik aside ait yapısal bilgiler azaltılmış diffüze reflektans Foryier Transform Infrared (ATR-FTIR) kullanılarak araştırıldı. Tüm numunelerden ekstrakte edilen hümik asitler kurutulduktan sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan spektrumları alındı. Her bir numuneye ait fonksiyonel grup analizleri spektrumların karşılaştırılması ile yapıldı. Yapılan ölçümler aynı pH değerlerinde hazırlanmış numunelerle yapıldı. Elde edilen spektrumlar ticari olarak elde bulunan humik asit spektrumu ile karşılaştırıldı.

FTIR spektroskopi ölçümleri IR Prestije-21 kullanılarak MID IR bölgesinde 600 ile 4000 cm^{-1} aralığında ve her numune için 25 tarama yapılarak gerçekleştirildi. Değişik bölgelerden toplanan numunelere ait FTIR spektrumlarının bir birine benzerlik gösterdiği tespit edildi. Genel olarak bakıldığında 3600-2000 cm^{-1} bölgesinde geniş ve örtüşmüş piklerin varlığı görülmektedir. 3400-3000 cm^{-1} aralığındaki geniş bant hidrojen bağı yapmış hidroksil guruplarını göstermektedir. 3100-3000 bölgesinde ortaya çıkması gereken aromatik C-H gerilme titreşimleri ise

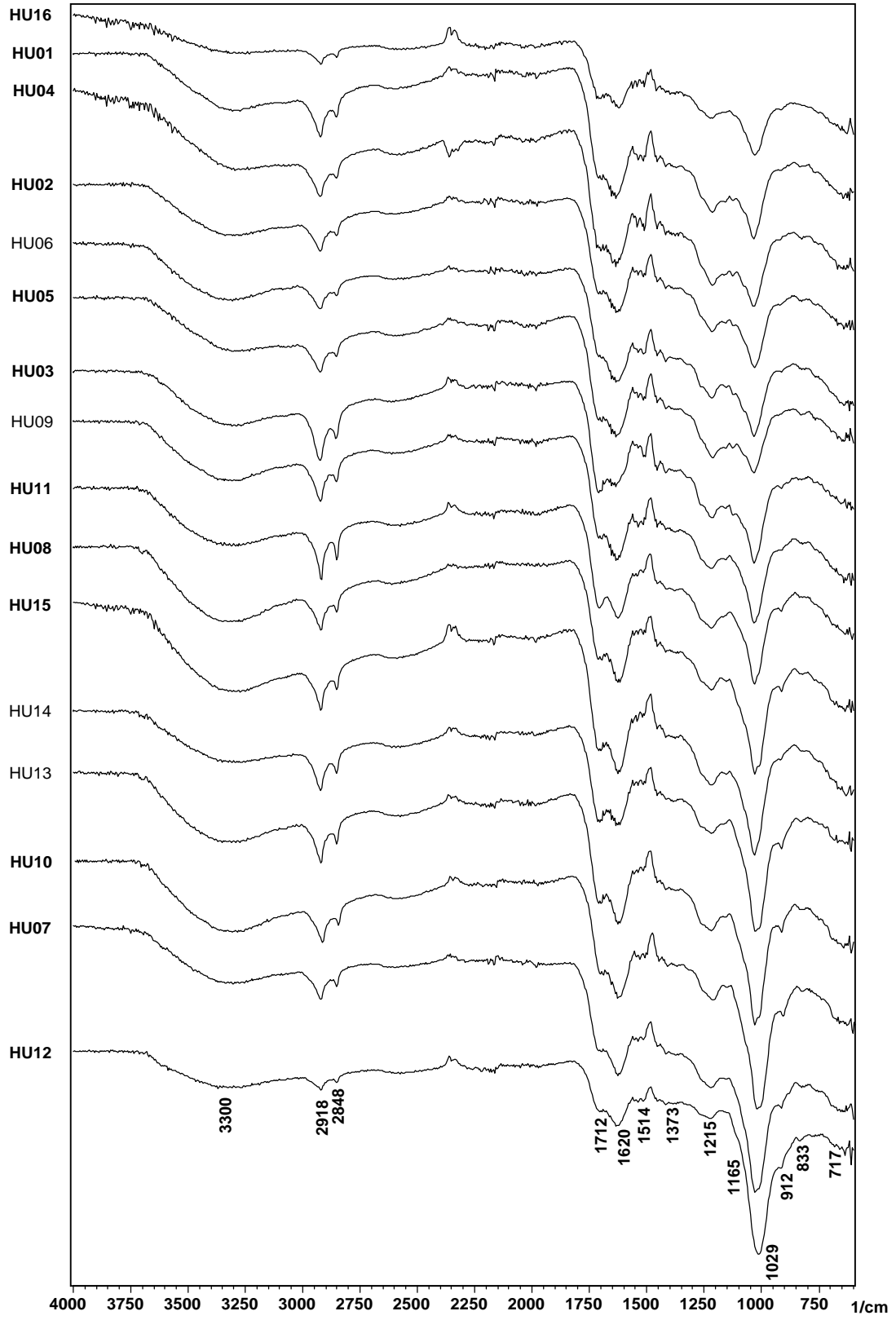
geniş bant içerisine kaybolmuş durumdadır. 2920-2850 cm^{-1} bölgesindeki pikler aromatik gruplara bağlı olan alifatik CH, CH₂, CH₃ gruplarına ait gerilme titreşimlerini göstermektedir. 2570 cm^{-1} bölgesindeki omuz karboksil gruplarındaki OH titreşimidir. Spektrumlarda ortak görülen bantlardan 1712 cm^{-1} bandı karboksil, aldehit ve keton karbonillerine ait piki göstermekte, ama karboksil grubunun durumuna göre bu pikin yüksekliği hidrojen bağlamış durum veya iyonlaşmış duruma göre değişmeler görülmekte ve değişik bölgelerden izole edilen hümik asitlerde bu pik yükseklikleri bazılarında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık COOH grubunun asit ve tuz formlarının titreşim farklılıklarından kaynaklanmaktadır. COOH gruplarının COO⁻ ye dönüşmesi durumunda 1380 cm^{-1} pikinin yüksekliğinde 1712 cm^{-1} pikine göre artmalar meydana gelmektedir. Bu durumda farklı bölgelerden elde edilen numunelerdeki karboksil grup miktarları arasında farklar olacağını göstermektedir. Çünkü hümik asitlerin izole edilmesinde aynı basamaklar ve aynı kimyasallar kullanılmıştır. 1620 cm^{-1} piki ise amit gruplarına ait karbonil gurupları, kinonlar ve nitratlardan gelmektedir. 1600 cm^{-1} deki pik ise aromatik yapıda yer alan C=C grubundan ve hidrojen bağlı C=O grubundan ortaya çıkmaktadır. Yaklaşık 1540 civarında ortaya çıkan bant ise peptit gruplarından ortaya çıkan amit bantları ve 1510 civarındaki pik ise aromatik C=C grubu olabilir. 1460 cm^{-1} piki ise alifatik C-H eğilme titreşiminin kaynaklandığı düşünülmektedir. 1290-1220 cm^{-1} civarındaki pik grubu ise C-O gerilme ve OH bozulmasından ortaya çıktığı kabul edilebilir. 1120 cm^{-1} deki pik ise alifatik CH₂, OH veya C-O grupları ve 1028 deki geniş pik grubu ise karbonhidratlara ait C-O gerileme titreşiminden ve silikatlara ait Si-O ortaya çıkmaktadır.

Elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında alifatik grupların yapıdaki miktarları bölgesel farklılıklar göstermektedir. Bu durumda büyük olasılıkla bazı numunelerde tam hümik madde oluşumunun tamamlanmamış olması olabilir. Ayrıca, 1028 cm^{-1} piki yüksekliğinde ise belirgin bir farklılık ortaya çıkmaktadır. Bu pik büyük olasılıkla izolasyon işleminde numune içerisindeki kil minerallerinden gelen piklerdir. Tablo 4.2. de humik asitin FTIR spektrumunda ortaya çıkabilecek mümkün olan titreşimler ve hangi gruplara ait olduğunu göstermektedir. Aşağıdaki tablo literatürden alınmıştır.

Tablo 4.2. Humik Asit FTIR Spektrumunda Gözlenen Pikler ve Grupları

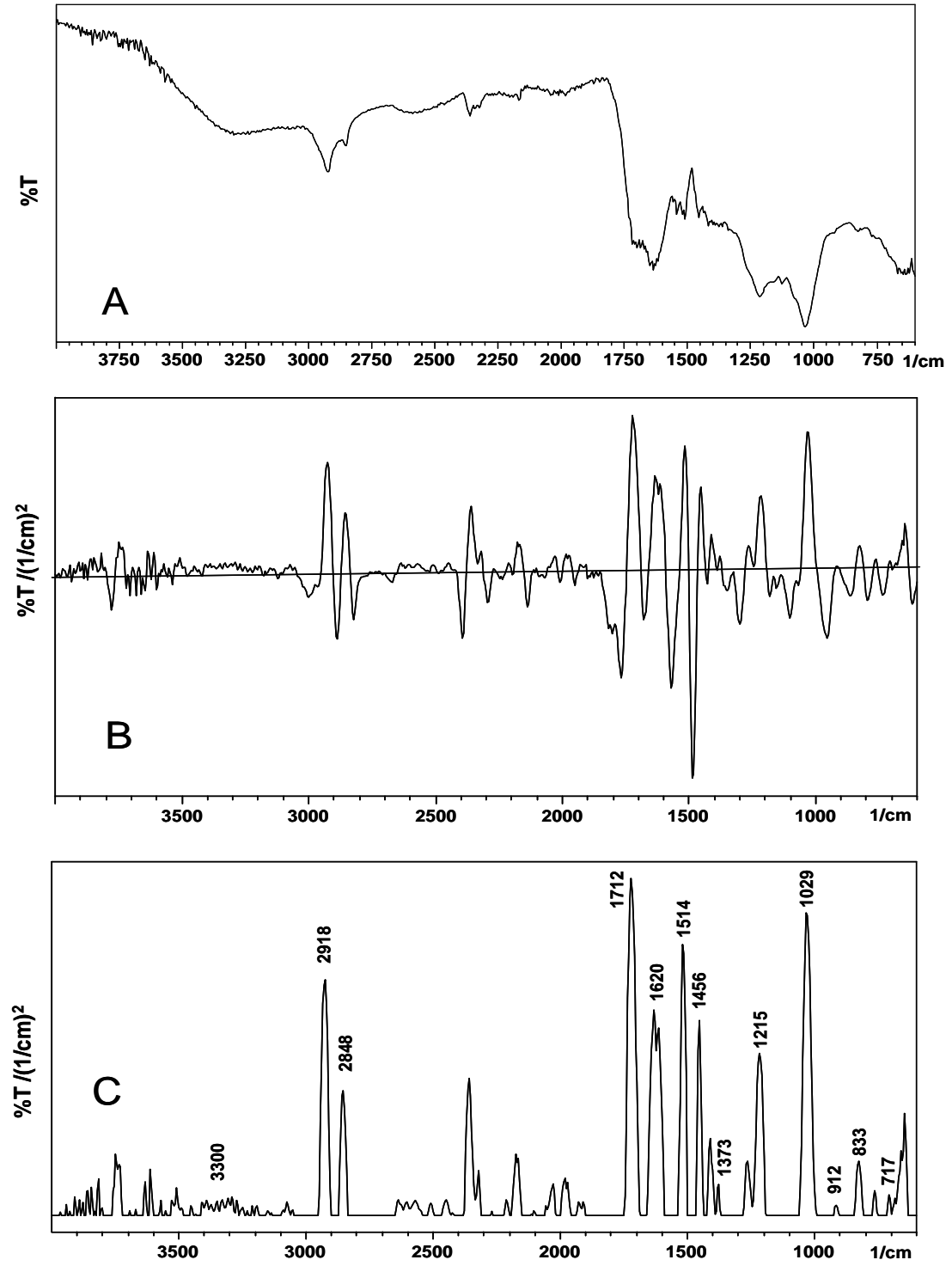
Dalga Sayısı	Piklere ait titreşim grupları
3700-2200	OH, bu pike katkısı olan diğer gruplar $m-NH_3^+$, $-NH_2^+$, $-CO-NH_2$, $-CO-NH-$, $S-H$
3050	Aromatik gruplar
2920, 2850	Alifatik gruplar, bazı metoksi gruplar
1700	Karboksil grupları karbonil titreşimleri, aldehit ve ketonlar, esterlerin karbonil gruplarındanda katkılar gelebilir
1620	amid gruplarına ait karbonil grupları ve kinon gruplarının katkılan. Nitratlar ($R-O-NO_2$), nitritler
1550 (omuz)	$COO-$, $-C-$, $-NO_2$, ve $C=C$
1515	$N-H$, $C=N$, amid II bandı ve $C=C$
1450	Alifatik C-H
1420	$C=N$ bandı (Amid III bandı) $COO-$ grubundan katkılar olabilir.
1360	$CO-CH_3$ ve nitrat gruplarındanda katkılar olabilir
1310	Sulfon grupları (SO_2), Bu aynı zamanda 1330-1050 cm^{-1} bölgesinde ester gruplarından ortaya çıkan iki bant
1270 (omuz)	Nitratlar ($R-O-NO_2$), $C-O-C$ grupları, ve büyük olasılıkla $P=O$ grupları. C-O fenolik grupları.
1220	$COOH$ grubundaki C-O ve OH, C-O aromatik esterleri ve fennoller. Aynı zamanda aril P-O titreşimleri
1120	alifatik C-OH grupları -OH titreşimleri ve sülfonlar
1080 (omuz)	alkollerden gelen C-O ve alifatik esterlerin C-O titreşimleri
1028	Polisakkarit ve benzer maddeler ve silikatlara ait Si-O ve mümkün olan diğer katkılar $S=O$
910	$R_2C=CH_2$ grupları
873-728	Aromatik C-H, daha az dallanmış halkalar
766	CH_2 ve komşusunda 4 veya 5 H bulunan benzen halkaları

Farklı bölgelerden toplanan orman gülü humusundaki humik asitlerinin IR spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 4.3 de görülmektedir. Şekil 4.3 den de anlaşılacağı gibi 16 farklı numunenin FTIR spektrumu da benzer olduğu görülmektedir. Bu da humikleşme sürecinin benzer olduğunu göstermektedir



Şekil 4.3. Farklı Humik asitlerin FTIR spektrumları

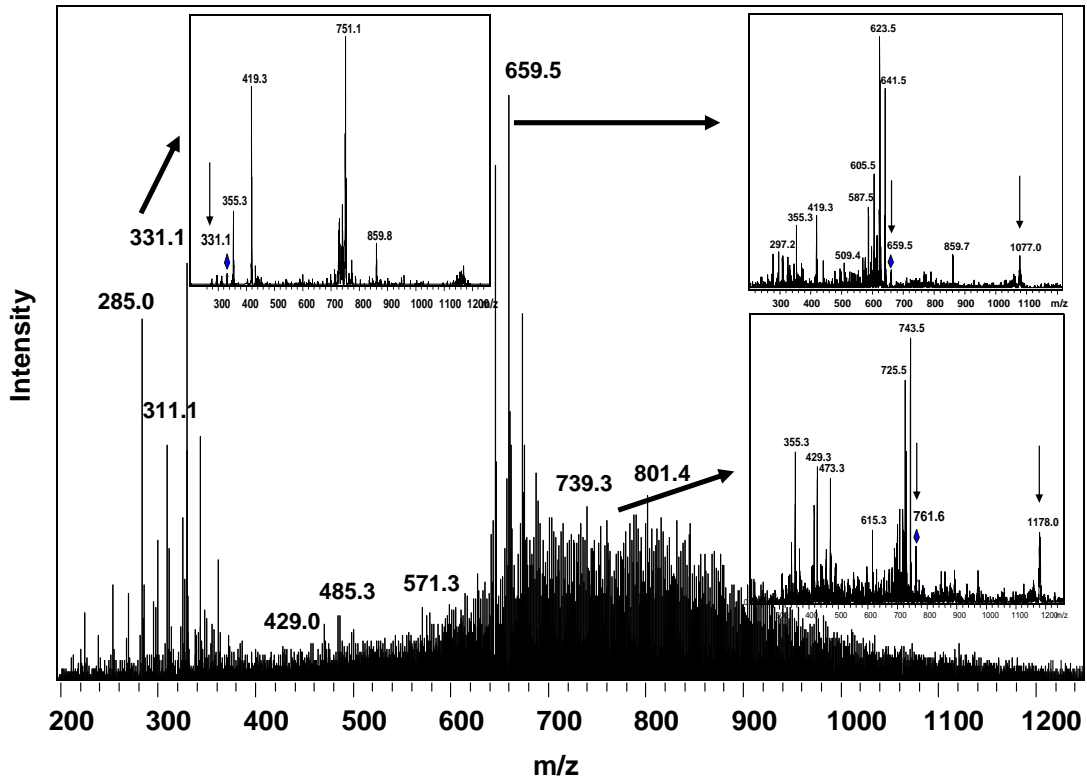
Şekil 4.4 C de FTIR spektrumlarının ikinci türevlerinin pozitif kısmı görülmektedir.



Şekil 4.4. Örnek numunenin FTIR spektrumunun (A) normal spektrumu, (B) ikinci türevi ve (C) ikinci türevinin pozitif kısmı

4.9.3. Kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Şekil 4.5 de değişik bölgelerden elde edilen numunelerden izole edilen hümitik asitleri temsil etmek üzere alınmış kütle spektrumlarından bir tanesi görülmektedir. Spektrumlar elektro sprey iyonlaşma tekniği kullanarak pozitif ve negatif metotlar kullanılarak alınmıştır. Spektrumların genelinde pikler m/z 750 bölgesinde yoğunlaşmıştır. Çok fazla piklerin görülmesinin nedeni çok farklı kütlede bir birine benzeyen moleküllerin olmasından ve bu moleküllerinde birden fazla yüklenebilmesinden dolayı çok karmaşık bir spektrum elde edilmektedir. Şekil 4.5. de verilen iç spektrumlar farklı m/z değerindeki iyonlara ait MS/MS spektrumlarını göstermektedir. Verilen MS/MS spektrumları ise değişik bölgelerden seçilen belirli iyonlara ait parçalanma ürünlerini göstermektedir. Spektrumlara bakıldığında seçilen ana iyondan daha büyük iyonların ortaya çıktığı görülmektedir. Bu durum da bu iyonların hepsinin birden fazla yük taşıdığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Orman gülü humusundan ekstrakte edilen hümitik asitin ESI-MS spektrumu

Tablo 4.3 de proje kapsamında farklı bölgelerden alınan orman gülü humuslarından ekstrakte edilen örnek hümitik asit için yapılan MS/MS deneylerinden elde edilen

parçalanma iyonları görülmektedir. MS/MS spektrumlarında genelde gözlenen durum yapıdan su moleküllerinin ve CO₂ gruplarının ayrılması ile oluşan iyonları göstermektedir. Bunların haricinde Tablo 4.3 de verilen yüksek m/z değerinde verilen iyonlar ya çok yüklü iyonların parçalanması ile ya da gaz fazındaki iyonların kombinasyonu ile oluşmuş olabilirler.

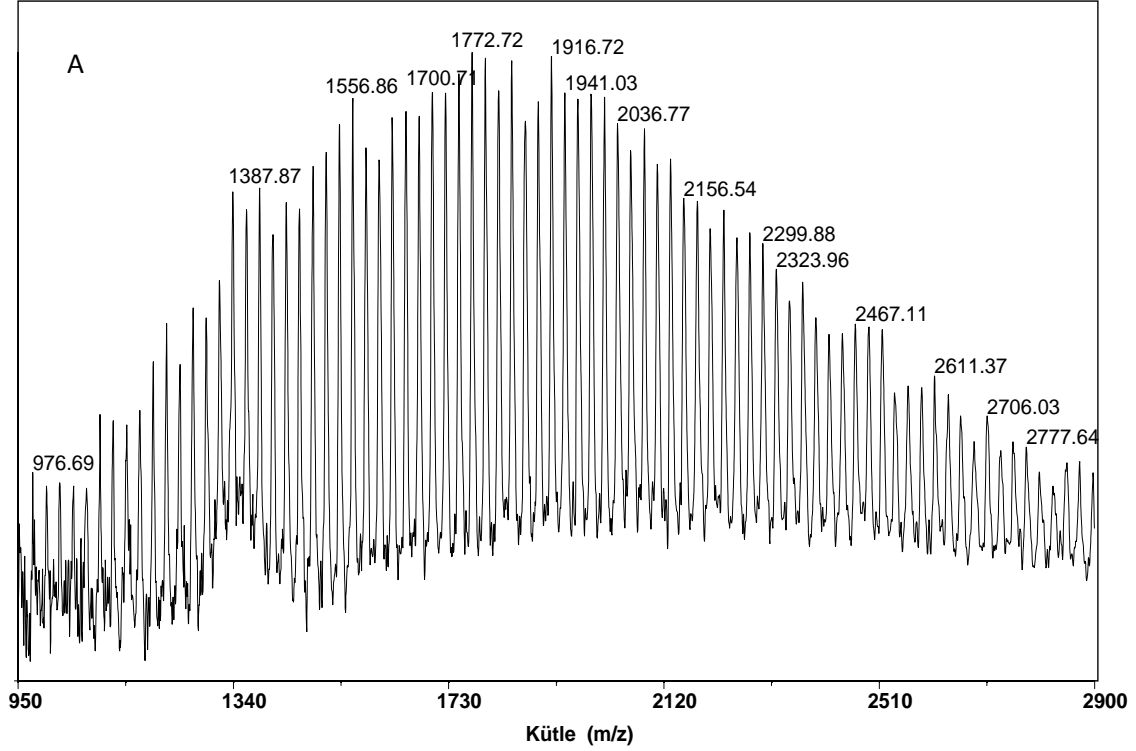
Rakamlar dikkatlice incelendiğinde aralarında belirli bir korelasyonun olduğu görülmektedir. Oluşan parçalanma ürünlerine bakıldığında belirli parçalanma ürünlerinin m/z=1276, 859, 441 gibi değerler birçok humik asit spektrumunda aynı olmasının yanında diğer iyonlardan da çok sayıda benzer iyonların oluştuğu görülmektedir. Bu aynı türdeki iyonların oluşumu aslında hümik asit moleküllerinde belirli bir ana iskelet yapısının olduğunu ispat etmektedir.

Kütle spektrumlarından elde edilen sonuç, moleküllerin çoklu iyonlar oluşturarak daha düşük m/z iyonları vermeleri olabilir. Fakat literatürde verilen değerlere göre boyut eleme kromatografisine göre değişik çalışmalarda farklı moleküler ağırlıklarda olduğu belirtilmiştir. Literatürlerde 1500-5000 amu ya da 800-18000 olarak verilmektedir. Bazı araştırmacılara göre ise humik asitin bu derece makro moleküler yapıda olamayacağıdır. Kütle spektrumlarında büyük molekül parçacıklarının görünmesinin nedeni, humik asitlerin yapısında çok fazla miktardaki OH ve COOH grupları olması ve bunların da kuvvetli hidrojen bağları yapmasıdır. Elde ettiğimiz kütle spektrumlarına bunu doğrulamaktadır. ESI-MS tekniği yumuşak bir iyonlaşma tekniği olduğu için moleküllerin parçalanmalarına neden olmaz. Moleküler iyonların görülebilmesinin yanında komplekslerin görülebilmesine de olanak sağlar. Bu nedenler elde edilen spektrumlara göre humik asitin literatürde verilen aksine büyük molekül ağırlıklı değil daha küçük molekül ağırlıklı oldukları düşünülebilir.

Anne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar bizim elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir. Söz konusu grubun yaptığı bir çalışmada, FT ICR-MS cihazı kullandıkları için yüksek çözünürlüklere çıkabilmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda iki yüklü iyonların yine 750 amu civarlarında pik yoğunluğu gösterdiği ve bunun iki katı büyüklükteki m/z değerlerinde ise tek yüklü iyonlar gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Bizim de ESI-MS çalışmalarında belirttiğimiz nokta 750 m/z değerindeki iyonların çift yüklü oldukları ki bu iki protonun bağlanması ile ya da iki sodyum veya başka bir iyonun humik aside bağlanması ile oluşmuş olabilir. Fakat Anne ve arkadaşları MS/MS çalışmalarında ayrıntılı parçalanma ürünleri konusunda yeterli bilgi vermemişlerdir.

Aynı numunelerin MALDI-TOF spektrumları incelendiğinde, literatürde rastlanmayan bir sonuca ulaşmaktayız. Şekil 4.6. numunelerden bir tanesine ait MALDI-TOF spektrumunu göstermektedir. Bu teknikte genelde bir matriks kullanılır. Fakat, matriks iyonları spektrumları daha karmaşık hale getireceğinden çalışmamızda spektrumlar herhangi bir matriks kullanılmadan alındı. Yani humik asidin kendisi, aynı zamanda matriks olarak kullanıldı. Yapılan deneyde değişik lazer gücü ve aletsel gecikme zamanları kullanılarak spektrumlar alındı. Elde edilen spektrumda oluşan pikler tüm numunelerde için aynı bölgede yaklaşık 1600 m/z

dolaylarında yoğunlaşmakta ve pikler arasındaki fark ise 24 m/z değerinde ortaya çıkmaktadır.

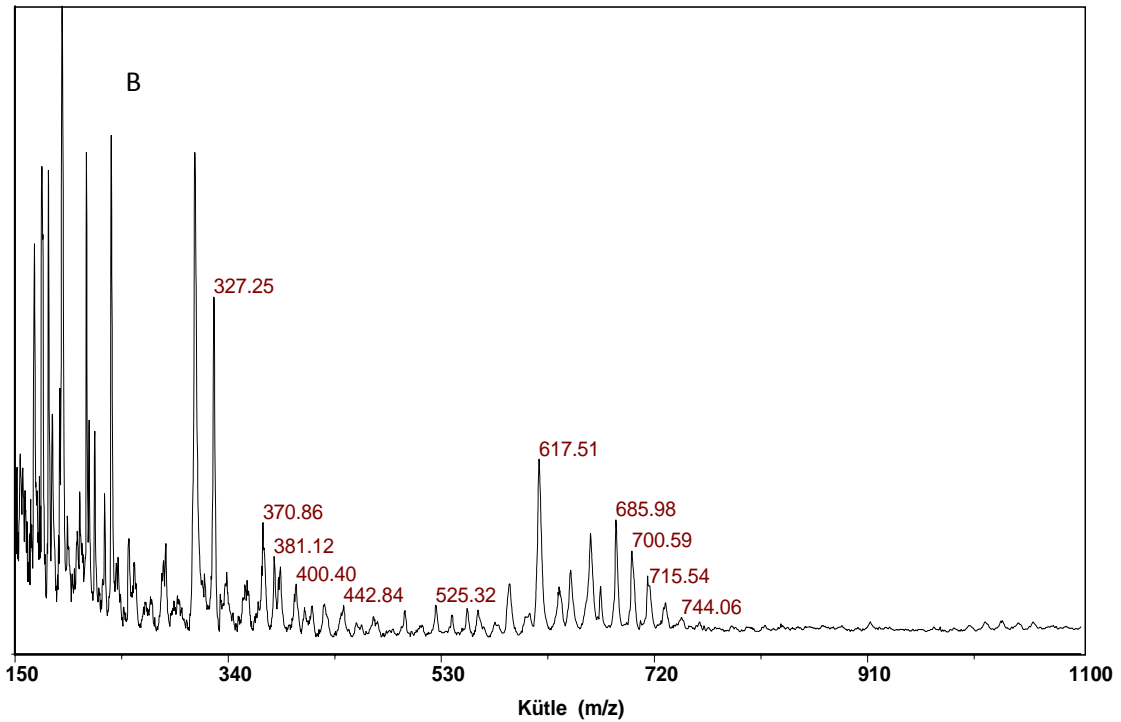


Şekil 4.6. Örnek bir humik asitin yüksek enerjide MALDI-TOF-MS spektrumu

Bu spektrumun daha ileri yorumlanabilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Beklide elde edilen spektrum gerçekten humik asit spektrumunu ifade etmekte olup elimizde buna ait yeterli sonuç bulunmamaktadır. Bu piklerin her birinin sodyum bağlanmış humik asitler olduğu düşünülürse, kütle farklarının hep 23 ve katları olması gerekir ve bu durumda humik asitin proteinler gibi tek tür moleküllere sahip olduğunun söylenmesi gerekir. Bu durum ise gerçek olmayabilir. Ya da humik asit moleküllerinin polimer yapısında olup her biri aynı sayıda sodyum veya proton bağlanmış da olduğu düşünülebilir. Eğer bu spektrum daha büyük molekül ağırlıklı humik asitlerin parçalanması ile oluşmuş olsaydı, spektrum sıfır noktasına kaymış olarak elde edilmesi gerekirdi. Burada spektrumda iyonlar sanki 900 ile 2750 m/z değerleri arasına dağılmış olarak görülmektedir. Burada yapılan yorumların desteklenmesi için ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir. Literatürde şimdiye kadar bu şekilde verilmiş bir humik asit spektrumuna rastlanılmamıştır. Bu spektrumun elde edilmesinde, önemli nokta kullanılan lazer

ışınlarının enerjisidir. Sadece belirli bir değer aralığında bu sonuçlara ulaşılması mümkün olmaktadır. Humik asitle literatürde verilen MALDI-TOF-MS spektrumları tam bir uyuşma göstermemektedir. Bizim elde ettiğimiz spektrumda ortamdaki humik asit miktarına bağlı olarak tüm numuneler aynı spektrumu vermekte ve bu değerleri aynı m/z değerlerinde okunabilmektedir.

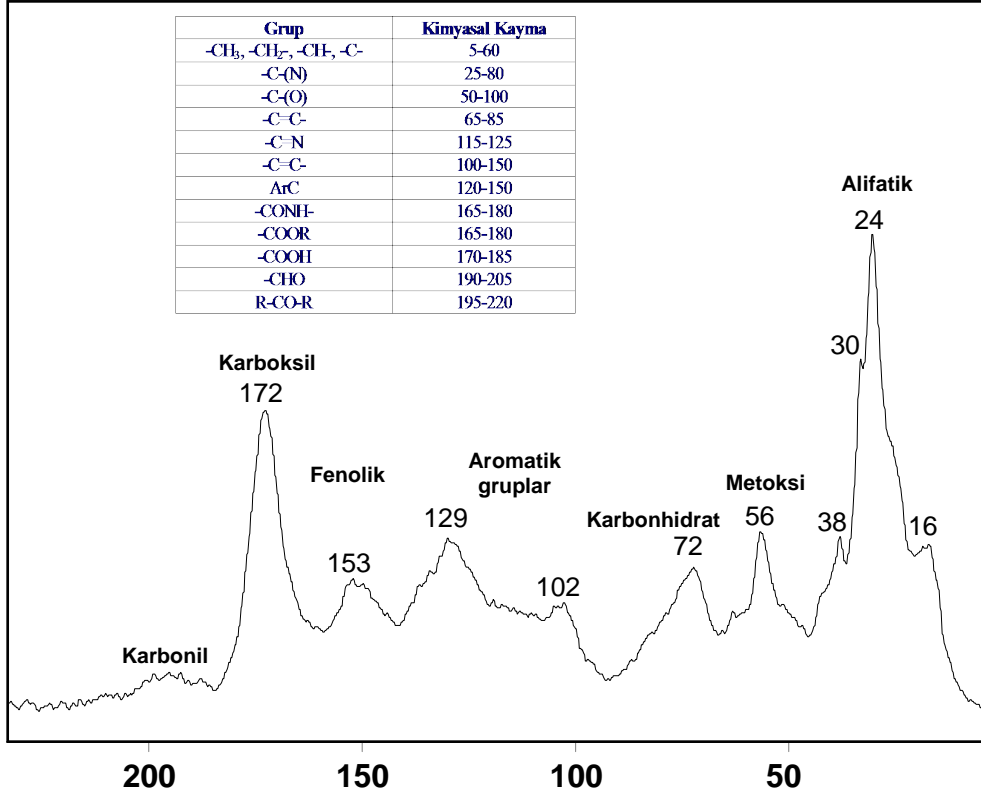
MALDI-TOF-MS spektrumlarına aynı zamanda düşük lazer ışınları ile elde edilen spektrumu da göstermekte yarar vardır. Şekil 4.7 de düşük lazer enerjisi ile elde edilmiş bir spektrumu göstermektedir. Bu spektrum genel olarak literatürde verilenlere benzemektedir. Elde edilen pikler bakıldığında, pikler arasında 15 ve 17 m/z değerlerinde farklar görülmektedir. Bu farklarda metil grubu ya da OH grubu farklılıkları olacağı düşünülebilir.



Şekil 4.7. Örnek bir humik asitin düşük enerjide MALDI-TOF-MS spektrumu

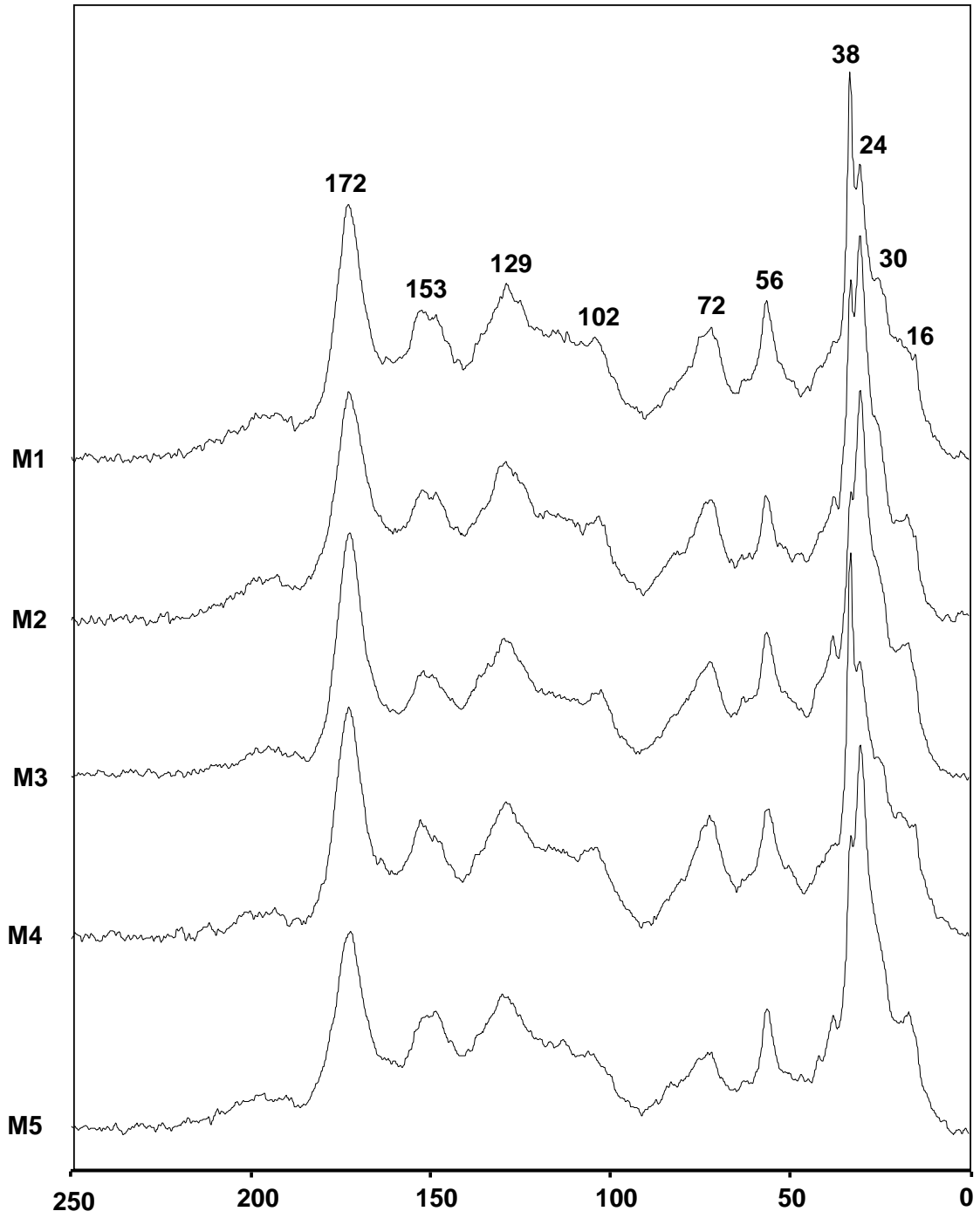
4.9.4. NMR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Katı hal NMR spektrumları hümik asitlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan bir başka önemli bir tekniktir. Şekil 4.8 izole edilen hümik asitlerden bir tanesinin ^{13}C katı hal NMR spektrumunu göstermektedir.



Şekil 4.8 Ormangülü humusundan elde edilen hümik asitin katı hal ^{13}C NMR spektrumu

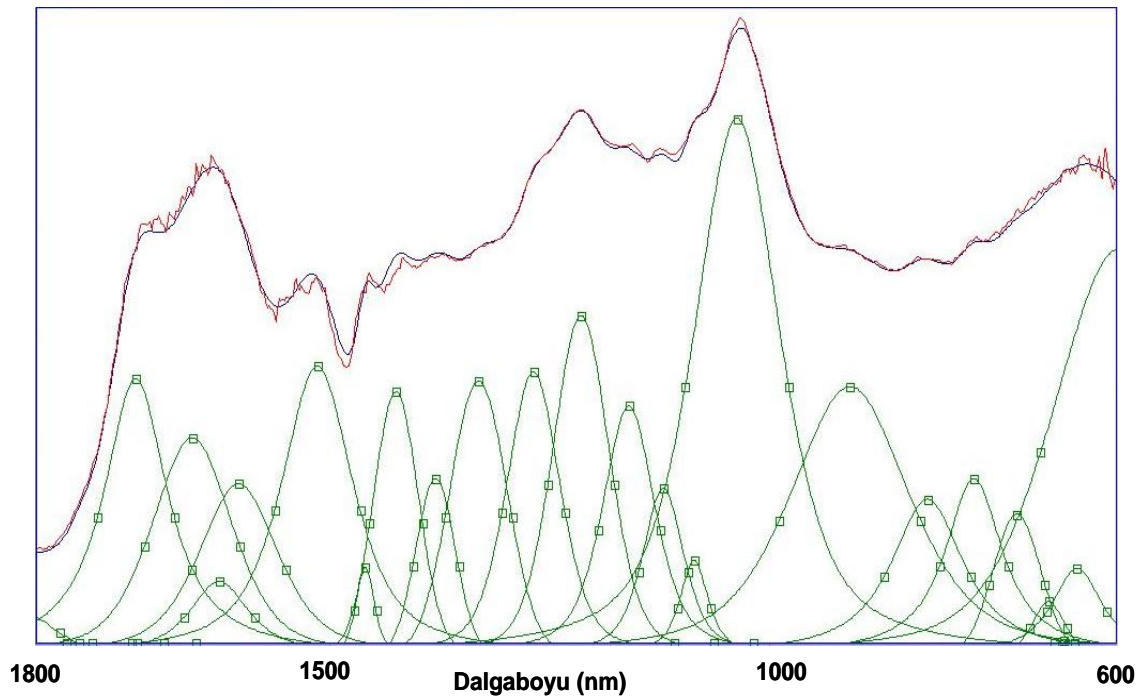
Şekil 4.8 ise farklı bölgelerden alınan orman gülü humusundaki hümik asitlerin katı hal ^{13}C NMR spektrumlarını topluca göstermektedir. Spektre bakıldığında belirli gruplara ait pikler açıkça görülebilmektedir.



Şekil 4.9 Farklı bölgelerden alınan ormangülü humuslarından ekstrakte edilen humik asitlerin katı hal ^{13}C NMR spektrumları

4.9.5. FTIR ve NMR sonuçlarına uygulanan pik tanımlanması çalışması ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Kantitatif çalışmalar için FTIR ve NMR spektrumlarına pik ekstraksiyonu uygulandı (GRAMS 32) ve her bir grubun pik alanları çıkartıldı. Şekil 4.10 FTIR pik spektrumunun göstermektedir.



Şekil 4.10. Katı hal ^{13}C NMR pik spektrumunu vermektedir

Bu spektrumlardaki her bir pike ait pik alanları hesaplanarak aromatik ve alifatik gruplara ait oranlar tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. NMR ve FTIR spektrumlarından hesaplanan alifatik/aromatik ve aromatik/karbonil oranları

	Alifatik/Aromatik		Aromatik/Karbonil	
	NMR	FTIR	NMR	FTIR
M4	1,28	1,12	2,26	1,06
M9	0,92	1,25	2,05	0,93
M14	1,02	1,45	1,89	0,76
M15	1,23	0,75	2,10	1,53
M16	1,07	0,73	1,88	1,12

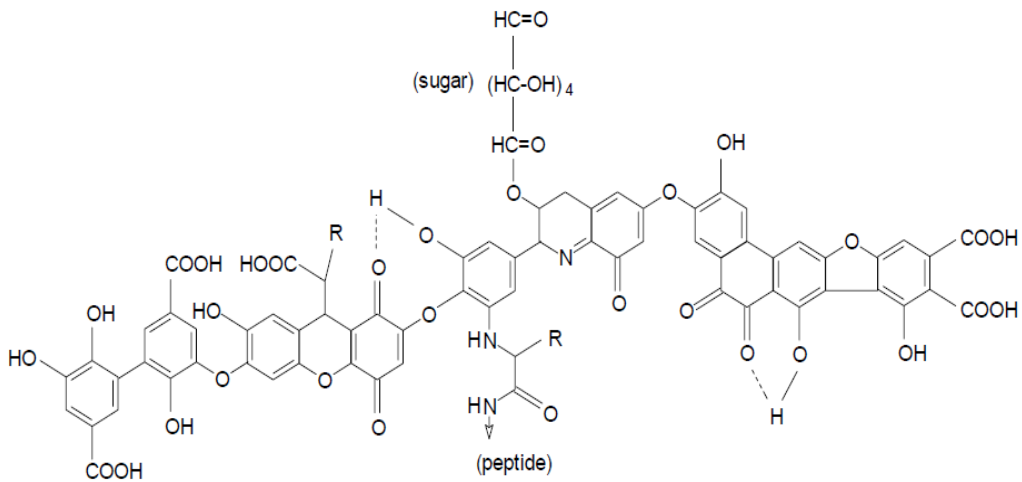
Humik asit yapılarının karakterizasyonu için, ESI-MS ve MALDI-TOF kütle spektroskopisi tekniklerinden istifade edildi. Katı hal ^{13}C NMR spektrumları alındı.

FTIR ve UV spektrumları incelendi. Elde edilen sonuçlar literatür ile mukayese edildi. Yapılan detaylı incelemeler sonucunda bölgeden aldığımız humik asit yapılarının literatürde önerilen yapılara uygunluğu tespit edildi. Yine, proje kapsamında yer alan bölgenin farklı bölümlerinden alınan orman gülü humusundaki humik asitlerin spektrumları karşılaştırıldı ve hemen hemen aynı yapıya sahip olduğu belirlendi.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada Batı Karadeniz Bölgesinde bulunan Düzce, Sakarya, Kocaeli ve Kırklareli illerinin Karasu, Hendek, Akyazı, Pamukova, Akçakoca, Gölyaka, Gölçük ve Demirköy ilçelerinden mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron Ponticum* L.) bitkisine ait humus örnekleri toplandı. Bu numuneler literatürde belirtilen ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri uygulanarak humik asit saf olarak izole edildi. Elde edilen humik asidin yapı karakterizasyonu başta katı hal ^{13}C NMR spektroskopisi olmak üzere UV, FTIR, ESI-MS gibi spektroskopik metotlarla yapıldı. Elde edilen sonuçlar literatürde önerilen yapılarla karşılaştırıldı ve sonuçların uyumluluğu anlaşıldı. Yapılan bu çalışmalar sonucunda orman gülü humusundaki humik asidin yapısı literatürde önerilen yapı (şekil 5.1) ile uyumlu olduğu görüldü.



Şekil 5.1. Humik asit yapısı

5.2. Öneriler

Başta organik tarım olmak üzere endüstride ve tıpta etkinliği literatürlerde rapor edilen humik asit karakterizasyonu ile ilgili Türkiye'deki ilk çalışmadır. Bu çalışmada Türkiye ye özgü ve Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak bulunan orman gülü humusundaki humik asit karakterizasyonu yapıldı. Genel itibarıyla farklı bölgelerden alınan orman gülü humusundaki humik asitlerin yapısının benzer olduğu anlaşıldı. İklim ve yer şekillereine göre farklılık arzeden ve her bir humik asidin farklı uygulama alanları olması nedeniyle buna benzer çalışmalar desteklenmeli ve yaygınlaştırılmalıdır. Humik asitlerin insan sağlığı üzerine etkileri detaylı bir şekilde araştırılmalıdır. Dünyada birçok ülkede humik asit araştırma merkezleri bulunmasına rağmen Türkiye'de böyle bir araştırma merkezi yoktur. Acilen humik asit araştırma merkezi kurulmalı ve humik asitle ilgili tüm çalışmalar tek elden kontrol edilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] OK, S.S. Humik maddelerin yapısal özellikleri ve tarımsal önemi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bölümü, Basılmamış Ders Notları, Ankara, 2007.
- [2] ANDRIESSE, K., Nature and management of tropical peat soils, FAO Soils Bulletin 59, Rome, 165, 1988.
- [3] STEVENSON, F.J., Humus Chemistry, Genesis, composition, reactions. Wiley- Interscience, New York, 1982.
- [4] GAJDOSOVÁ, D., POKORNÁ, L., LÁSKA, S., PROSEK, P., HAVEL, J., Are there humic acids in Antarctica? In Ghabbour E.A. and Davies G. (E): Humic Substances. Structures, Models and Functions. RSC, Cambridge, 121-131, 2001
- [5] CHİOU, C.T. Theoretical Considerations in The Partition Uptake of Nonionic Soil Compounds, in B.L. Sawley and K.Brown (ed). Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. SSSA Spec. publ. ASA, CSSA, and SSSA, 1-23, Madison Wl., 1989.
- [6] NİCOLAS, R.E. Hermann, 147-153 Paris, 1968.
- [7] KİM H. Tan Humic Matter in Soil and the Environment, Marcel and Dekker, Inc, New York, 2003
- [8] SCHNİTZER, M. and KHAN, S.U. Soil Organic Matter. Academic Pres, New York, 1978.
- [9] SCHNİTZER, M. Significance of soil organic matter in soil formation, transport processes in soils and in the formation of soil structure. Soil Utilization and Soil Fertility, 4, Humus Budget, 206, 63-81, 1992.
- [10] BRANDY, N.C., The nature and properties of soils., Macmillon Publ. Co., NY., 75, New York, 1990.
- [11] TAN, K.H., BİNGER, A., Effects of humic acid on aluminum toxicity in corn plants., 14, Soil Sci., 20-25, 2003
- [12] FORTH, H.D., Fundamental of soilscience., John Wiley and Sons. Inc., New York, 1990.
- [13] STEWENSON, F.S., Humus Chemistry, Jhon Wiley and Sons Inc., NY, 496, New York, 1994.

- [14] GOLDBERG, E.D., Black carbon in the environment, John Wiley and Sons., NY, 198, New York, 1985.
- [15] SHNEOUR, E.A., Oxidation of graphitic carbon in certain soils science, 15, 991-992, 1996.
- [16] ORLOV, D.S., Problems of identification and nomenclature of humic substances, 4, Poch vovedenie, 48, 1975.
- [17] HAYES, M.H.B., DAVIES, G., GHABBOUR, E.A., Humic substances; progress towards more realistic concepts of structure, Humic substances, properties and uses, The royal society of chemistry, 1-28, Cambridge UK, 1998.
- [18] CABANNIS, S.E., ZHOU, Q.H., MOURICE, P.A., A log normal distribution model for the molecular weight of aquatic fulvic acids, 34, Environ sci. Technol, 1103-1109, 2000.
- [19] MAO, J., W. Hu and ROHR, K.S., Structure and elemental composition of humic acids, Comparison of solid-state ^{13}C NMR calculations and chemical analyses, Humic substances structure, properties and uses, RSC, 79, 90, 1998.
- [20] DAI, X.Y., PING, C.L., CANDLER, R., Characterization of soil organic matter fractions of tundra soil arctic alaska by carbon-13 NMR spectroscopy, 65, Soil sci. Soc. Am.j, 87-93, 2001.
- [21] HUANG, W., P. Peng. Z. Yu and J. Fu., Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soil and sediments (review), Applied Geochem., 18, 955-972, 2003.
- [22] NOVAKOV, T., The role of saas and primary oxidants in atmospheric chemistry, Sci. Total environ., 36, 1-10.
- [23] GLASER, B.L., HAVMAIRER and GUGGENBERGER, G., Black carbon in soils, The use of benzenecarboxylic acids as specific markers, Org. geochem, 29, 811-819.
- [24] KING- ALLEN, R.M., GRATHWAHL, P. BALL, W.P., New modeling paradigms for the sorption of hydrophobic organic chemicals to heterogeneous carbonaceous matter in soils, sediments and rocks, Advances in water resources, 25, 985-1016.
- [25] HUNT, M.J., Petroleum geochemistry and geology, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1979.
- [26] DURAND, B., Kerogen insoluble organic matter from sedimentary rocks, Technip, Paris, 1980.

- [27] CORRELISSSEN, G., GUSTAFSSON, O., Sorption of phenanthrene to environmental black carbon in sediment with and without organic matter and native sorbates, *environ. SCI. Technol.*, 38, 148-155, 2004.
- [28] IKAN, R. LOSELIS, P., RUBINSZTAIN, Y., AIZENSHTAT, Z., PUGMINE, R., ANDERSON, L.L., ISHIWATARI, NATURWISS, R., 73, 150-151, 19986.
- [29] SUSIĆ, M., BOTO, K. and ISDALE, P. *Mar. Chem.* 33, 91-104, 1991.
- [30] SWAIN, F.M., *Humic Substances*, Golterman, Wageningen, The Netherlands, 1975.
- [31] MAYER, L.M., *Humic Substances in Soil*, Wiley-Interscience, New York, 1985.
- [32] JACKSON, T.A., *Humic Matter in Natural Waters and Sediments*, 119, 56-64, 1975.
- [33] CHOUDRI, M. B., ve STEVENSON F. J., *Chemical and Physico-Chemical properties of soil colloids*, *Soil Sci.Soc.Am.Proc.*, 21, 508-513, 1957.
- [34] TAN, K.H., *Soil Sampling, Preparation and Analysis*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [35] FILIP, Z., SEMOTAN, J., KUTILEK, M., *Thermal and Spectrophotometric Analysis of some Fungal Melanins and Soil Compounds*, *Geoderma*, 15, 131-142, 1976.
- [36] HAIDER, K., MARTIN, J.P., FILIP, Z., FUSTEC-MATHON, E., *Humic Substances*, Goleman, Wageningen, The Netherlands, 1972.
- [37] WAKSMAN, S.A., *Humus*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD., 1932.
- [38] KONONOVA, M.M., *Soil Organic Matter*, Pergamon Press, Oxford, England, 1961.
- [39] FLAIG, W., BEUTELSPACHER, H., RIETZ, E., *Soil Components*, Vol. 1. *Inorganic Components*, Springer-Verlag, New York, 1975
- [40] HEDGES, J.I., *Humic Substances and their Role in the Environment*, Wiley Interscience, New York, 1988.
- [41] KUJANINSKI, E.B., HATCHER, P.G., FREITAS, M.A., *High resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids, improvement and comparisons* *Anal. Chem.*, 74, 413-419, 2002.
- [42] STENSON A.C., A.G. MARSHALL, W.T. *COPPER: Exact masses and chemical formulas of individual suwannee river fulvic acids from ultrahigh resolution ESI FT-ICR mass spectra.* *Anal. Chem.* 75: 1275-1284, 2003

- [43] BROWN, T.L., RICE, J.A., Effect of experimental parameters on the ESI FT-ICR mass spectrum of fulvic acid. *Anal. Chem.* 72: 384-390, 2000.
- [44] KUJAWINSKI, E.B., FREITAS, M.A., ZANG, X., The application of electrospray ionization mass spectrometry to the structural characterization of natural organic matter. *Org. Geochem.* 33: 171-180, 2002b.
- [45] STENSON, A.C., LANDING, W.M., MARSHALL, A.G., COPPER, W.T., Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 4397-4409, 2002.
- [46] LOTOSH, T.D., Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. (In Russian) *Nauch. Dokl. Vyss. Skoly. Biol. Nauki* 10: 99-103, 1991.
- [47] ZHANG, M., HE Z., Long-term changes in organic carbon and nutrients of an Ultisol under rice cropping in southeast China. *Geoderma* 118: 167-179, 2004.
- [48] KLÖCKING, R., Humic substances in the global environment and implications in human health. *Monopoli* 1992, p. 129.
- [49] THIEL, K.D., HELBIG, B., KLÖCKING, R., WUTZLER, P., SPROSSIG, M., SCHWEIZER, H., Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus. *Pharmazie* 36: 50-53, 1981.
- [50] BONDIETTI, E., Environmental migration of long-lived radionuclides. IAEA, Vienna 1982.
- [51] SAMANIDOU, V., PAPADOYANNIS, I., VASILIKIOTIS, G., Mobilization of heavy-metals from river sediments of Northern Greece, by humic substances. *J. Environm. Sci. Health A26*: 1055-1068, 1991.
- [52] GHABBOUR, E.A., DAVIES, G. (Eds.), Humic substances: structures, models and functions. Based on proceedings, RSC, Cambridge 2001, p. 401.
- [53] VERSTRAETE, W., DEVLIEGHER, W., Formation of nonbioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation* 7: 471-485, 1997.
- [54] GREEN, J.B., MANAHAN, S.E., Absorption of sulphur dioxide by sodium humates. *Fuel* 60: 488-494, 1981.
- [55] SHIN, D., CHUNG, Y., CHOI, Y., Assessment of disinfection byproducts in drinking water in Korea. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 9: 192-199, 1999.

- [56] LOFFREDO, E., PEZZUTO, M., SENESI, N., Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soils and Water. E.A. Ghabbour and G. Davies (Eds.): RSC, Cambridge, 2000.
- [57] BENZ, M., SCHINK, B., BRUNE, A., Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4507-4512, 1998.
- [58] BHARDWAJ, K.K., GAUR, A.C., Studies on the growth stimulating action of humic acid on bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 126:694-699, 1971.
- [59] MUND-HOYM, W.D., The effect of salumin baths on rheumatic and traumatic joint diseases. *Med. Welt.* 32: 1378-1381, 1981.
- [60] BRZOZOWSKI, T., DEMBINSKI, A., KONTUREK, S., Influence of Tolpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers. *Acta Pol. Pharm.* 51:103-107, 1994.
- [61] YAMADA, E., OZAKI, T., KIMURA M., Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water. *Anal. Sci.* 14: 327-332, 1998.
- [62] GADZHIEVA N.Z., TSOI E.P., TUROVSKAIA S.I., AMMOSOVA, I.M., The antibacterial activity of a humic preparation made from the therapeutic peat mud of the Dzalal Abad deposit in Kirgizia. *Naucn. Dokl. Vyss. Skoly Biol. Nauki* 10:109-113, 1991.
- [63] ANSORG, R., ROCHUS, W., Studies on the antimicrobial effect of natural and synthetic humic acids. *Arzeimittelforschung* 28:2195-2198, 1978.
- [64] SKLIAR, T.V., KRYSENKO, A.V., GAVRILIUK, V.G., VINNIKOV, A.I., A comparison of the developmental characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus* cultures on nutrient media of different compositions. *Mikrobiol. Z.* 60: 25-30, 1998.
- [65] SCHNEIDER, J., WEIS, R., MANNER, C., Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology* 218: 389-395, 1996.
- [66] VAN RENSBURG, C.E., DEKKER, J., WEIS, R., SMITH, T.L., VAN RENSBURG, J., SCHNEIDER, J., Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy* 48: 138-143, 2002.
- [67] JOONE, G.K., DEKKER, J., VAN RENSBURG C.E., Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Z. Naturforsch.* 58:263-267, 2003.
- [68] HO, K.J., LIU, T.K., HUANG, T.S., LU, F.J., Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro: a possible mechanism for humic acid-induced cytotoxicity. *Arch. Toxicol.* 77:100-109, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

Gölnur Yazıcı, 21.03.1987'de İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul Küçükçekmece'de tamamladı. 2004 yılında Halkalı Toplu Konut Lisesi, Fen Bölümünden mezun oldu. 2004 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Kimya bölümünü 2008 yılında bitirdi. 2008 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı ve 2010 yılında mezun oldu.