

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

**ORMANGÜLÜ HUMUSUNDAKİ FULVİK ASİT  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Selçuk KARAKAYA**

**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 FULVİK ASİT  
KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Selçuk KARAKAYA**

**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**



**Yrd. Dr. Ayhan HORUZ**  
**Üye**



## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK (108T073) tarafından desteklenen projenin bir bölümünü kapsamaktadır. Desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Bilgisini, deneyimini, teknik donanımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımın olumlu sonuçlanmasında en büyük pay sahibi sayın danışman hocam Prof. Dr. Ahmet TUTAR'a, tezimin hazırlanması sırasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar analizleri konusunda yol gösteren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Abdil Özdemir'e, ayrıca çalışmamızda desteğini eksik etmeyen Yrd. Doç. Ayhan Horuz'a, Sakarya Üniversitesi'nde yüksek lisans eğitimimi almak için yönlendiren, siz değerli hocalarımla tanışıp, aynı laboratuvarında çalışma imkânı sunan, hiçbir zaman güler yüzünü, yakın ilgi ve desteğini eksik etmeyen çok sevdiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU 'na, laboratuvar çalışmalarında tecrübesinden ve fikirlerinden yararlandığım candan yaklaşımıyla ilgisini ve desteğini hissettiğim, çok sevdiğim değerli hocam Arş. Gör. Can Serkan KESKİN'e, tezim süresince yakın ilgisi ve bilgisiyle destek olan değerli hocalarım Arş. Gör. Fatih SÖNMEZ 'e ve postdoktor Melek Gül'e, ayrıca grubumuz doktora öğrencisi Cihansel Sancak Ünlü'ye, Arif BALKANCI, Gülnur YAZICI, Makbule YILMAZ'a, tezim süresince grafik tasarım konusunda Tahir ÖZDEMİR'e , makale çevirilerinde doktora öğrencisi Sezen SİVRİKAYA, Hacer KOÇ, Bilal DENİZ, Hilal DURMAZ 'a yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Mesleğime saygı duymayı ve sahip çıkmayı öğreten, çalışma azmini ve iş disiplini örnek aldığım, babam Halil KARAKAYA'ya, tezim esnasında ve hayatım boyunca desteğini, özverisini esirgemeyen ve en zor anlarımda yanımda olan canım annem Fatma KARAKAYA'ya, o müthiş enerjisiyle beni daima keyifli kılan, her zaman yanımda olduğunu bildiğim canım kardeşim Seda KARAKAYA'ya maddi ve manevi açıdan desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Selçuk KARAKAYA

## 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.....	5
2.1. Toprağın Yapısı ve Özellikleri.....	5
2.1.1. Toprağın bileşimi.....	5
2.1.2. Toprak horizonları.....	6
2.1.3. Toprak organik maddesi ve organik madde terimi.....	7
2.1.4. Toprak organik madde fraksiyonlarının şematik olarak gösterilmesi.....	9
2.2. Ormangülleri (Rhododendron L.).....	10
2.2.1. Mor çiçekli ormangülü (Rhododendron Ponticum L.).....	11
2.3. Humik Madde Kavramı.....	12
2.3.1. Humik kavramının oluşması.....	12
2.4. Humik Madelerin Sınıflandırılması.....	14
2.4.1. Karasal veya karasal kökenli humik maddeler.....	14

2.4.2. Sudaki humik maddeler.....	15
2.4.3. Sulak alan humik maddesi.....	16
2.4.4. Jeolojik humik madde.....	16
2.4.5. Zirai humik madde.....	17
2.5. Humik Maddelerin Öncü Molekülleri .....	17
2.5.1. Lignin.....	18
2.5.2. Fenoller ve polifenoller.....	19
2.5.2.1. Lignin türevi fenoller ve polifenoller.....	19
2.5.2.2. Mikrobiyal fenoller.....	20
2.6. Humuslaşma Teorileri.....	22
2.6.1. Ligno-protein teorisi.....	22
2.6.2. Fenol-protein teorisi.....	24
2.6.3. Şeker-amin yoğunlaşma teorisi.....	26
2.7. Humik Maddelerin Kısımlara Ayrılması.....	28
2.7.1. Humik asit.....	28
2.7.2. Fulvik asit.....	29
2.7.3. Humin.....	29
2.7.4. Siyah karbon ve kerogen.....	30
2.8. Humik Maddelerin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması.....	30
2.8.1. Ekstrakt reaktiflerinin seçimi.....	31
2.8.2. Karasal humik maddelerin ekstraksiyon metotları.....	31
2.8.3. Humik asidin saflaştırılması.....	33
2.8.4. Fulvik asidin saflaştırılması.....	35
2.9. Günümüzde Kabul Gören Humik ve Fulvik Asit Yapıları.....	35
2.10. Humik Maddelerin Uygulama Alanları.....	37
2.10.1. Tarım uygulamaları.....	37
2.10.2. Endüstriyel uygulamaları.....	39
2.10.3. Çevresel uygulamaları.....	40
2.10.4. Biyomedikal uygulamaları.....	42

## BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT.....	44
3.1. Materyal.....	44
3.1.1. Kimyasallar.....	44
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	44
3.1.2.1. Santrifüj cihazı.....	44
3.1.2.2. Çalkalayıcı.....	45
3.1.2.3. pH metre.....	45
3.1.2.4. Freeze dryer.....	45
3.1.2.5. Etüv.....	47
3.1.2.6. Hassas terazi.....	47
3.1.2.7. Elek.....	47
3.1.2.8. Havan.....	47
3.1.2.9. Toprak küreği veya beli.....	47
3.1.2.10. Kova ya da leğen.....	47
3.1.2.11. Naylon torba.....	47
3.1.2.12. Etiket.....	48
3.1.3. Spektroskopik yöntemler.....	48
3.1.3.1. UV spektroskopisi.....	48
3.1.3.2. IR spektroskopisi.....	49
3.2. Metot.....	49
3.2.1. Humus numunelerinin toplanması.....	49
3.2.2. Numunelerin etiketlenmesi.....	51
3.2.3. Numunelerin torbalanması.....	52
3.2.4. Humus numunelerinin kurutulması.....	52
3.2.5. Humus numunelerinin dövülmesi ve elenmesi.....	52
3.2.6. Humus numunelerinden fulvik asidin ekstraksiyonu.....	52

BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	54
4.1. Numune Yerlerinin Seçimi.....	54
4.2. Humus Numunelerinin Toplanması.....	54
4.3. Humus Numunelerinin Kurutulması.....	55
4.4. Humus Numunelerinin Dövülmesi ve Elenmesi.....	55
4.5. Ormangülü Humusundan Fulvik Asidin Ekstraksiyonu.....	56
4.6. Humik ve Fulvik Asit Karışımından Fulvik Asidin Ayrılması.....	56
4.7. Fulvik Asidin Saflaştırılması.....	57
4.8. Fulvik Asidin Freeze Dryer İle Dondurarak Kurutulması .....	59
4.9. Spektroskopik Sonuçlar.....	60
4.9.1. UV-Visible spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	60
4.9.2. FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar.....	62
 BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR.....	67
 BÖLÜM 6.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	68
 KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

amu	: Atomic Mass Unit
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
kg	: Kilogram
max	: Maximum
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
m/z	: Kütle Yük Oranı
N	: Normal
nm	: Nanometre
rpm	: Devir
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
<sup>13</sup> 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
ICR-MS	: İyon Siklotron Rezonans
IHSS	: International Humic Substance Society
IR	: Infrared Spektroskopi
LDI-TOF-MS	: Kütle Spektroskopisi
LMAN	: Düşük Molekül Ağırlıklı Bileşikler



LMN	: Düşük Molekül Ağırlıklı Doğal Bileşikler
MID-IR	: Middle Infrared Spektroskopisi
NMR	: Nükleer Manteyik Rezonans Spektroskopisi
SOM	: Soil Organic Matter
SSSA	: Soil Science Society of America
TOM	: Toprak Organik Madde
TPP	: Tiyamin Pirofosfat
UV	: Ultraviyole Spektroskopisi
$\epsilon$	: Epsilon
$\pi$	: Pi

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Toprak horizonlarının üç boyutlu ve çizgisel görünümü.....	6
Şekil 2.2.	Orlov(1975) tarafından önerilen humik maddelerin tipik isimsel şeması.....	10
Şekil 2.3.	Mor çiçekli ormangülünün Türkiye’de yayılışı.....	12
Şekil 2.4.	Yumuşak ağaç, sert ağaç ve çimen bambu ağaçlarından elde edilen lignin monomerleri.....	18
Şekil 2.5.	Ligninin bozunmasıyla pirogallol oluşumu.....	20
Şekil 2.6.	Asetat malonat yolu ile resorsinolün oluşumu.....	21
Şekil 2.7.	Shikimik asit yolu ile pirogallol oluşumu.....	21
Şekil 2.8.	Ligno-protein konseptine göre humik molekülünün oluşum şeması.....	23
Şekil 2.9.	Humik maddelerin diagenetik değişimi.....	24
Şekil 2.10.	Shikimik asit yoluyla lignin monomerlerinden ligno-protein kompleksinin oluşumunun sadeleştirilmiş şeması .....	25
Şekil 2.11.	Fenol-protein teorisine göre humikleşmenin olası reaksiyonu...	26
Şekil 2.12.	Glikoz ile amin arasında ve glikoz ile glisin arasında gerçekleşen reaksiyon ile humik madde öncülerinin oluşumu.....	27
Şekil 2.13.	Topraklardan turbalardan ve diğer karasal tortulardan ekstrakte edilen humik maddelerin ekstraksiyonunun akış diyagramı.....	33
Şekil 2.14.	Stevenson’a göre humik asidin yapı modeli.....	36
Şekil 2.15.	Buffel ve ark. Göre fulvik asidin yapı modeli.....	36
Şekil 2.16.	LDI-TOF-MS mass spectra of HA soil (IHSS).....	37
Şekil 3.1.	Toprak numunesi almada kullanılan çeşitli alet ve malzemeler....	48
Şekil 3.2.	Karışık toprak örneklerinin tarlanın bir ucundan diğer ucuna doğru zig-zag çizilerek açılan çukurlardan alınması .....	50
Şekil 3.3.	Toprak numunesi alınması.....	51

Şekil 4.1.	Humus numunelerinin alındığı bölgelerin haritada gösterimi.....	54
Şekil 4.2.	Ekstrakte edilen fulvik asit numuneleri .....	57
Şekil 4.3.	Katyon değiştirici reçine ile hazırlanan kolona verilen fulvik asit .....	58
Şekil 4.4.	Freeze dryer cihazı ile fulvik asitlerin kurutulması.....	59
Şekil 4.5.	Bazı fulvik asitlerin UV spektrumları.....	62
Şekil 4.6.	Farklı Fulvik asitlerin FTIR spektrumları.....	65
Şekil 4.7.	Farklı Fulvik asitlerin FTIR spektrumlarının literatür ile karşılaştırılması.....	66
Şekil 5.1.	Buffel ve ark. Göre fulvik asidin yapı modeli.....	67

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1.	H1 numunesine ait etiket bilgileri.....	55
Tablo 4.2.	Peuravuori ve Pihlaja'ya göre aromatiklik derecesini belirlemede kullanılan E <sub>2</sub> /E <sub>3</sub> oranları.....	61
Tablo 4.3.	Fulvik asit FTIR spektrumunda gözlenen pikler ve grupları.....	64

## ÖZET

Anahtar kelimeler: Fulvik 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. Fulvik 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 fulvik asit ekstraksiyonu ve yapı karakterizasyonu çalışıldı. Yapı karakterizasyonu için FTIR ve UV gibi çeşitli cihazlar kullanıldı.

# **EXTRACTION OF HUMIC MATTER FROM SOIL**

## **SUMMARY**

Key Words: Fulvic acid, Humic substances, *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 FAs. *Rhododendron* is a highly celebrated ornamental genus because of its spectacular flowers, species-richness, ease of hybridization and broad geographical range. 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 fulvic acid fractions isolated from humus soil collected under the *Rhododendron ponticum* L. in Turkey by a combination of spectroscopic techniques comprising UV-Visible recording spectrometer, Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopies.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Organik maddeler genel olarak iki gruba ayrılır: Humik olmayan maddeler ve humik maddeler.

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.

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 [1].

Topraktaki humikli yapılar Antartika kıtasında bile ortaya çıkarılmaktadır. Antartika koşulları altında humikleşme süreci spesifik ve diğer kıtalardan farklıdır [2,3,4].

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 [5].

Humikli yapılar organik maddenin kabasını oluşturur. Toprak, linyit, turba kömürü, kanalizasyon suları, kaynak suları ve çökeltilerinden oluşan organik maddelerin çoğunu temsil eder. Humik maddeler üçe ayrılır: Fulvik asitler (FAs), humik asitler (HAs) ve humin [6]. Humik asit, fulvik asit ve humin temel humik madde

fraksiyonları olup çoğu topraklarda humik maddelerin yaklaşık olarak %50 humin, %40 humik asit, %10 fulvik asit şeklinde dağıldığı tahmin edilmektedir [7].

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. Moleküler yapılarından dolayı ürün elde etmede birçok yarar sağlar. Onlar kil ve sıkı toprakların bozunmasına yardım eder, küçük besin parçalarının topraktan bitkiye geçişini sağlar, su birikimini artırır. Tohum çimlenme yüzdesini artırır ve topraktaki küçük bitki türlerinin gelişimini teşvik eder [6].

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 [8].

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 düşünülmese de, 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.

Humik asit bileşiğinin kül oranı genellikle düşük olur. Eğer saflaştırma esnasında seyreltilmiş HCl - HF karışımı tedavi için kullanılırsa, humik asit genellikle NaOH metodu ile ekstrakte olan humik asitten daha yüksek oranda kül içerir. Bu polifosfat, ekstrakte yüksek metal oranından kaynaklanır ve kül oranını düşürmek için yapılan tedaviler humik asit kaybına neden olur.

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 [9].

Humik asitlerin toprakların fiziksel ve kimyasal özelliklerini olumlu yönde etkilediği uzun yıllardan beri öne sürülmektedir [10].

Humik asitler metal iyonlarla kompleks oluşturarak toprağın mikrobesein maddelerince zenginleşmesini sağlamaktadır. Bu kompleks oluşturma yeteneği yapısından kaynaklanmaktadır [11].

Humik asit, fulvik asit gibi ısınınca erimez. Fakat, hava atmosferinde veya vakum içinde ısınınca bozular. Vakum içinde ısıtma sırasında reçinenin benzer bir madde oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu madde su salımı ile meydana gelir. Fulvik asite benzer olarak, humik asit de yanmaz. Fakat, 150-240<sup>0</sup>C arasında oksitlenmeyle yanmaya başlayabilir. Geri dönüşü olmayan değişiklikle, 105<sup>0</sup>C ısıtma da görülebilir fakat humik asitlerin çalışmalarında yüksek sıcaklıkların kullanımını tavsiye edilmemektedir. Humik asit kurutması daha iyi bir yöntem olarak önerilir. Bu yöntemde, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> üzerine 50<sup>0</sup>C de bir vakum içinde yürütülür.

Klasik terminolojide humik asit, alkali çözelti ile ekstrakte olup asit koşullarda çöken maddeler olarak tanımlanır. Fulvik asit ise hem alkalide hem de asitte çözünen maddelerdir [9].

Fulvik asitler, humik asitler gibi alkali çözeltide çözünür fakat alkaline 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 sarıdan 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 [12].

Her iki asitte toprak ve topraktaki mikro organizmalar için yararlıdır. 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 [13]. 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 [12].

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**

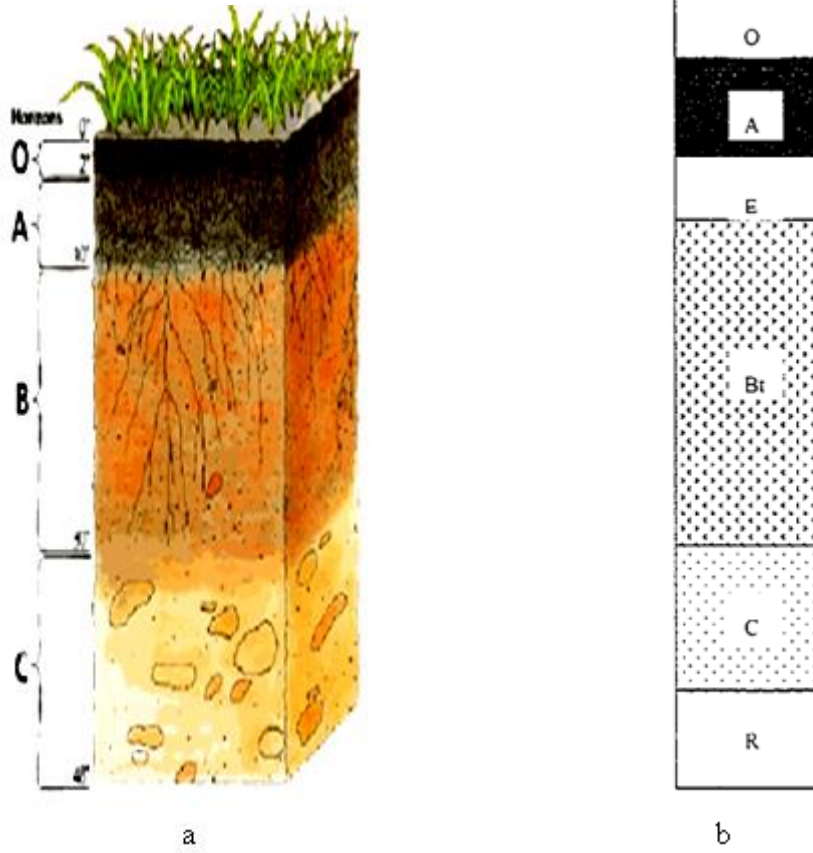
#### **2.1.1. Toprağın bileşimi**

Toprak inorganik ve organik katı materyaller ile su ve hava boşlukları olmak üzere dört temel bileşenden meydana gelmiştir [14]. Toprağın inorganik kısmı kayaların parçalanma ürünlerinden oluşur ve farklı hacim ve bileşimlerdeki kaya parçaları ve minerallerden ibarettir. Toprağın inorganik maddeleri kum, silt ve kil'den oluşmuştur. Bunlar toprağın tekstürel fraksiyonları olarak adlandırılır. Kum tanecikleri hacim ve biçim olarak düzensizdirler. Kimyasal olarak inerttirler ve elektrik yükü taşımazlar. Kil toprağın en küçük ve kimyasal olarak en aktif parçacığı olup kolloidal özelliklere sahiptir. Daha çok negatif yük taşımakla beraber az miktarlarda pozitif yükleri de bulundurabilir. Silt parçacık olarak orta büyüklükte olup kum ve kil arasındaki karakteristiklere sahiptir [15].

Toprakta hava makro boşluklarda su ise mikro boşluklarda bulunur. Toprak havası atmosferdeki gazların benzer türlerini içerir ve boşluklardaki hava miktarı topraktaki su miktarı tarafından kontrol edilir. Su arttığında boşluklardaki hava dışarıya itilir ve tersi de geçerlidir. Topraktaki su besin ve diğer maddeler için önemli bir taşıma aracıdır [15]. Toprak aynı zamanda yer altı sularının kirlenmemesi için bir süzgeç görevine sahiptir. Toprak mikroorganizmaları (mikrofaune ve mikroflora) toprağın önemli bir kısmını oluşturur. Toprak bileşenlerin konsantrasyonları topraktan toprağa veya horizonton horizontona değişebilir. Toprak bileşenlerin konsantrasyonları iklim, organizmalar, ana materyal, topografya ve zaman olarak tarif edilen toprağın oluşum proseslerine bağlıdır [15]. Alternatif olarak, toprak oluşumu litosferin, biosferin, hidrosferin ve atmosferin bir fonksiyonu olarak görülebilir.

### 2.1.2. Toprak horizonları

Toprak horizonları kara yüzeyine paralel genetik (toprak oluş süreçleri) olarak oluşmuş toprağın enine kesiti ile ilgili birbirinden farklı 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 [16].



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 horizontan B horizona taşınır. Böylelikle B horizonu Bt horizona 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 konsantrasyonu ile 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.

### **2.1.3. Toprak organik maddesi ve organik madde terimi**

Toprağa intikal eden çeşitli bitkisel ve hayvansal dokuların ayrışmaya başladığı andan, mineralize oluncaya kadar geçen dönem arasında uğradıkları değişimlere (ayrışma ve birleşmeler) bağlı olarak ortaya çıkan farklı yapıdaki organik bileşiklerin tümüne toprak organik maddesi denir. Organik madde içerisinde bitkisel kökenli kısım hayvansal kökenli kısımdan fazladır. Toprak organik maddesi çok kompleks bir yapıya sahiptir. Basit yapılı bileşiklerden tutunda kompleks yapılı çeşitli polimerler içermektedir. Kk moleküllü organik bileşikler mikro organizmalara dolayısıyla bitkilere kolayca yem olurlar. Fakat büyük moleküllü organik komplekslerin mikroorganizmaların ve bitkilerin yararlanacaklara formlara dönüşebilmesi için bir dizi enzimatik değişikliklere uğraması gerekmektedir. Organik maddenin znrlğ güç olan kompleks kısımlar ise toprağın fiziksel özellikleri yanında iyon değişim özelliği göstermeleri nedeniyle değişebilir özellikteki besin elementlerinin depolanmasına yardımcı olmaktadır. Toprak organik maddesi ile humus kavramı çoğu kez birbirine karıştırılmaktadır. Yapısı tam olarak

bilinmemekle beraber genel anlamda humus organik maddenin tanınmayacak düzeyde parçalanmış halidir. Ayrıca humusla ilgili birçok tanımlamalar yapılmıştır. Bunlar özetlendiğinde humus “toprağa intikal etmiş ölü biyolojik maddelerle bunların mikroorganizmalar yardımıyla ayrışma ve birleşme ürünlerinden oluşmuş mevcut ortam şartları altında orijini tanınmayacak düzeyde güç ayrışabilir hale gelmiş, koyu kahverengiden siyaha kadar değişen renkler almış, kendine özgü makroskopik ve mikroskopik özellikler kazanmış ve oluştuğu yöre topraklarına özel karakterler kazandırmış maddeler toplamıdır” [17].

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 [5]. Toprak organik maddenin sınıflandırılması bazik ekstraksiyon sonucunda asidik şartlarda çözünebilirliğe göre yapılmıştır. Humin aromatikliğin en büyük derecesine ve oksijen konsantrasyonunun en küçük miktarına sahip dev molekülden oluşmuştur [5].

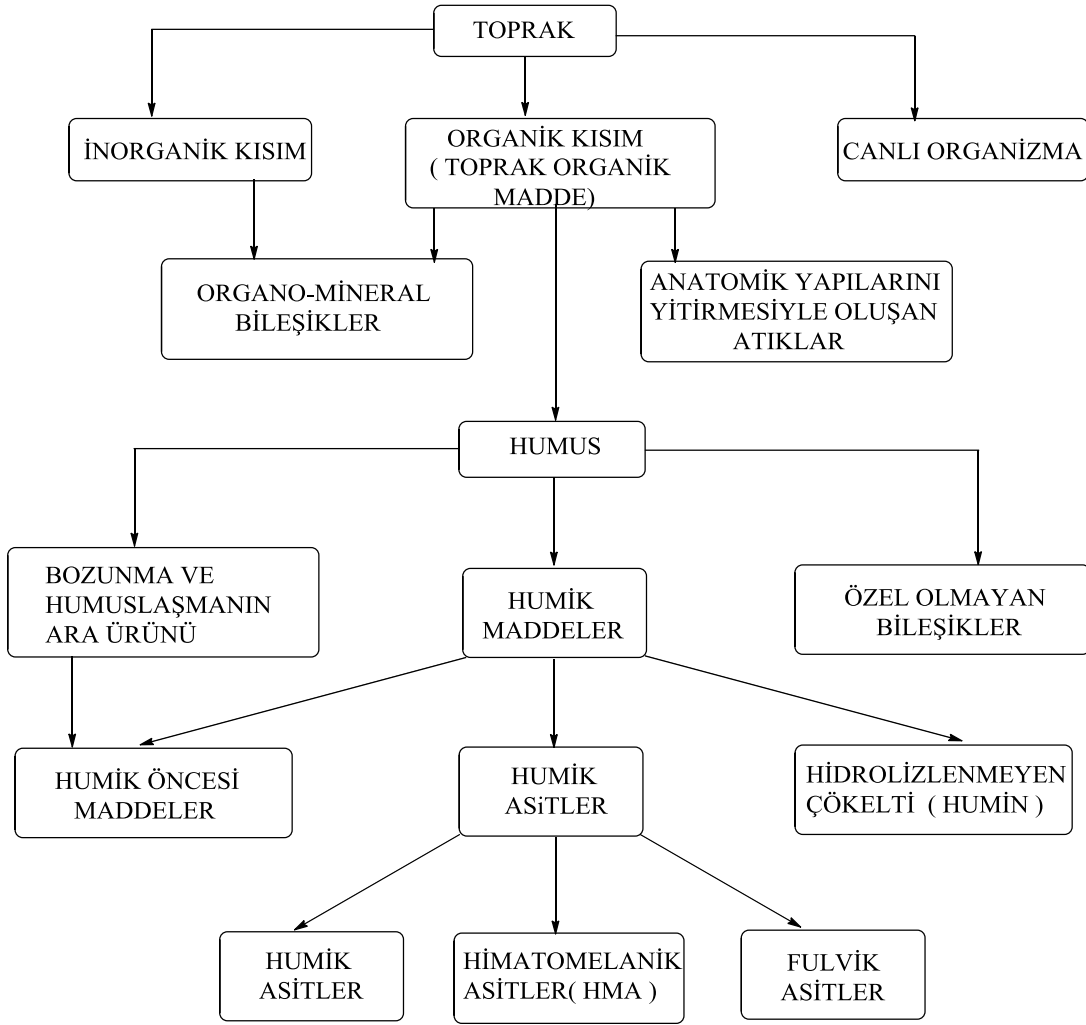
Genellikle humin toprakta çok kararlı olan ve bazik olarak ekstrakte edilmeyen mineral yüzeyleri ilgilendirir. Mineral toprakta huminin analogları olan ve O horizontunda çözünmeyen materyaller çoğunlukla selüloz ve ligninden ibarettir. Humik asit (HA) bazik şartlarda çözünen, asidik çözeltide çöken ve 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, aromatiktir ve biyokütle yanmasının karbonca zengin kalıntısıdır. Ayrıca kömür is ve grafiti içeren fosil yakıttır [18]. Kömür kütlenin yanmasından sonra geriye kalan kül ve kalıntının önemli bir kısmıdır. İs 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 [19,20].

#### **2.1.4. Toprakta organik madde fraksiyonlarının şematik olarak gösterilmesi**

Toprak organik maddesini oluşturan fraksiyonlar Şekil 2.2’de verilen şemada gösterilmiştir. Orlov’a göre, humus, spesifik humik maddeler, non-spesifik humik maddeler, bozunma ve humifikasyon ara ürünlerinden oluşmuştur. En son stabil organik ürün hidroliz, oksidasyon, demeoksilasyon ürünleri ve lignin, protein, karbohidratlar ve bazı doğal bileşiklerin diğer türevlerini içerir. Organik maddenin non spesifik bileşikleri lignin, selüloz, protein, aminoasitler, monosakkaritler ve parafin gibi maddelerden oluşmaktadır [21].

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 [15].



Şekil 2.2. Orlov (1975) tarafından önerilen toprakta organik madde fraksiyonlarının şeması

## 2.2. Ormangülleri (*Rhododendron L.*)

Orman gülleri olarak bilinen *Rhododendron*lar Kuzey yarımkürede 850'den fazla tür ile temsil edilir [22]. 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 [23].

Çok geniş alanlara yayılan ormangüllerininin 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

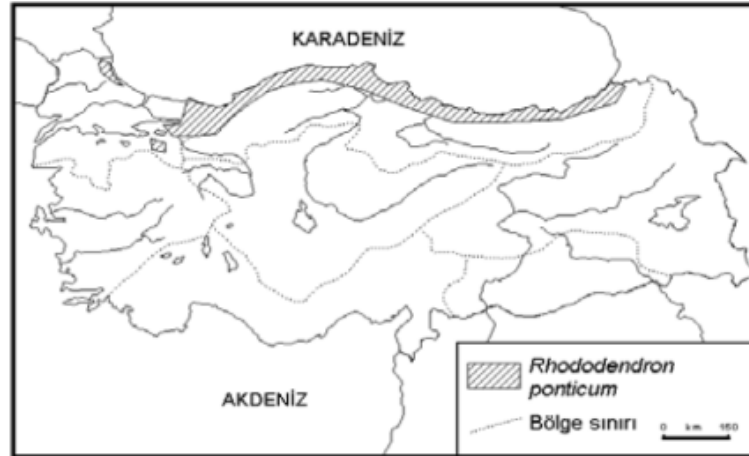


bitkilerdir. Bunlar çoğunlukla ağaçların gövdeleri ya da dalları üzerine yerleşerek, gıda emici organları ile üzerine yerleştikleri bitkiden beslenir [23].

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 [24]. 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 [25,26].

### **2.2.1. Mor çiçekli ormangülü (Rhododendron ponticum L.)**

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 L.*)'dur. *Rhododendron ponticum* Türkiye'de batıda Istranca dağlarından başlayıp, doğuda doğu Karadeniz kıyı dağlarına kadar (Şekil 2.16), dağların kuzey yamaçları boyunca yayılışını sürdürür [23]. 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 2.3. Mor çiçekli ormangülünün Türkiye’de yayılışı

## 2.3. Humik Madde Kavramı

### 2.3.1. Humik kavramının oluşması

Toprak organik maddesi veya humus “humin olmayan maddeler” ve “humin” maddeler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Humin olmayan maddeler ölü organizma artıkları ile bunların polimerize olmamış ayrışma ürünlerini, huminler ise organik yapıda doğal olarak var olan veya yeniden oluşan dayanıklı, koyu renkli, yüksek moleküllü ve çoğu kez esmer polimerlerdir. Humin maddeleri birçok yapı elementi içerirler. Lignin, polisakkarid, ve proteinlerin büyük ayrışma ürünleri yanında özellikle OH içeren aromatik (poli-) karbon asitleri, kinonlar, şeker parçalanma ürünleri, O ve N içeren heterosiklikler ve çeşitli amino asitleri önemli maddelerdir. Bu molekül birimleri ile çeşitli köprülerle (-O-, -NH-, -N=, -CH<sub>2</sub>, -C=O-, -S-, hatta uzun hidrokarbon zincirleri) değişik miktarlarda bağlanmışlardır [17,27].

Toprağın humik maddesi tarımın ilk günlerinden bu yana büyük bir ilgi çekmiştir. Çünkü tarım yapılan arazilerde humik maddelerinin toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine belirgin bir etkisi olduğu görülmüştür. 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 humik 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 [28]. Buna karşı, Waksman tüm bu terimleri silmeyi tercih etmiştir ve humus adını, sadece hümik maddelerden bahsetmek için kullanılmasını önermiştir [29]. 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 [5]. 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 bileşikleri içerdiğine inanılmaktadır. Bu maddeler genellikle daha ileri çürüme ya da bozunma reaksiyonlarına maruz kalırlar. Humikleşmiş fraksiyonların sentezi ya da oluşumunun esas kaynağı olan bu sürece humikleşme süreci denir. Bunlar genellikle kil gibi topraktaki diğer anorganik maddelerden anaerobik şartlar altında adsorbe olurlar [28].

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 daltondur. 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.

## **2.4. Humik Maddelerin Sınıflandırılması**

Humik maddeleri 5 genel gruba ayırmak mümkündür. Bunlar; toprak humik madde, sudaki humik madde, sulak alanlardaki humik madde, jeolojik humik madde ve antropojenik humik madde olarak sınıflandırılabilir.

### **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, coniferil 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, coumaril alkol tarafından karakterize edilen, çimen ve bambu ligninidir. Sonuç olarak, bu öneride topraktaki humik maddeler 3 alt grupta incelenebilir [15].

Yumuşak ağaç (çam) toprak humik maddesi: Bu tip humik maddeler kozalaklı ağaç lignin monomerlerinden oluşmaktadır ve yapısal olarak koniferil alkol ile karakterize edilir.

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

Çimen veya bambu toprak humik maddesi: Bu 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 sarımtırak 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 Öncü Molekülleri**

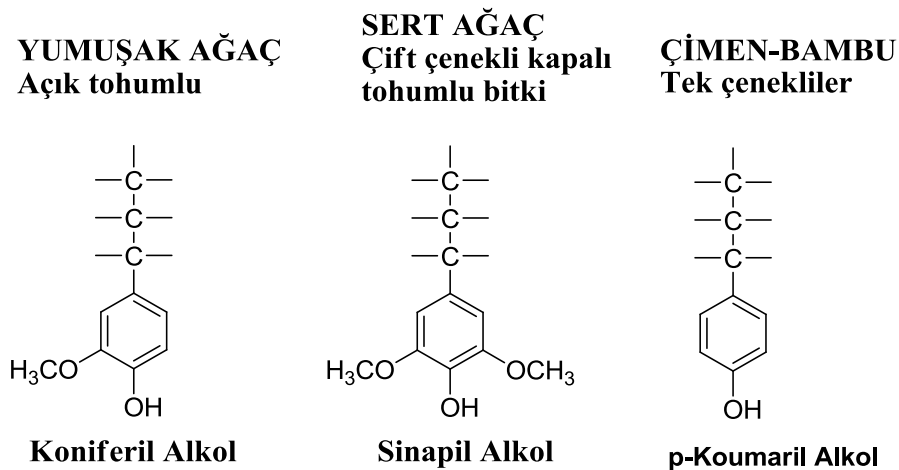
Humik maddelerin biçimlendirildiği işlem humifikasyon olarak adlandırılan işlemdir. Humik maddelerin sentezinde doğal kaynaklardan ve orijinal ham maddelerden farklı bir yolla yararlanıldığı düşünülmektedir. Öne sürülen teorilerin bir grubu humik maddelerin direkt dönüşümlerine biyopolimerlerin depolimerizasyonunun 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 monomerlere 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.

### 2.5.1. 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 [33]. 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 bitkisel dokulardaki temel fonksiyonu destek ve dayanıklılık sağlamasıdır. Bu yapısal karakteristik ve selülozun sebebiyet verdiği enkapsülasyon selülozik maddelerin nişastaya oranla hidrolizini oldukça zorlaştırmaktadır [34]. 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.

### 2.5.2. 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.

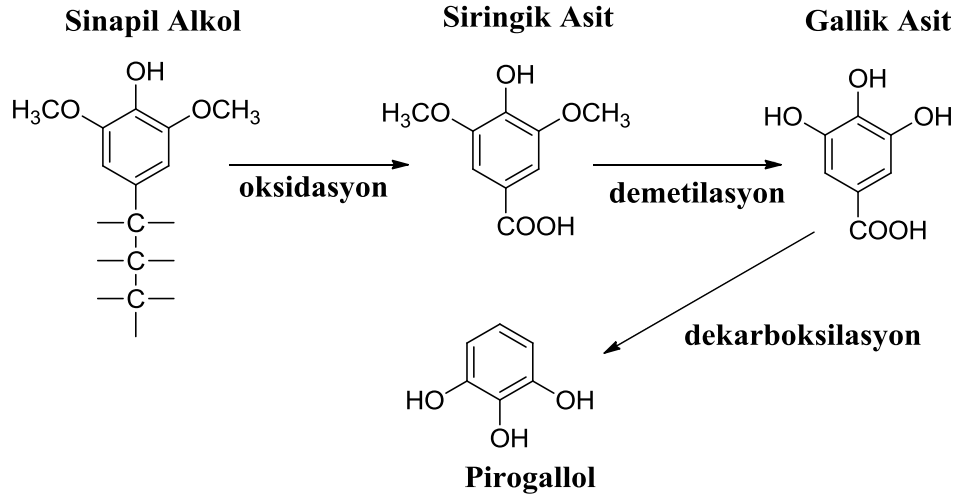
Birkaç monomerik fenolün birbirine bağlanmasıyla polifenoller oluşur. Daha öncede belirtildiği gibi fenoller ve polifenoller iki kaynaktan elde edilebilmektedir. Bunlardan biri ligninin bozunmasıyla oluşurken diğeri mikroorganizmalar vasıtasıyla oluşmaktadır. Stevenson serbest fenollerin yüksek bitkilerde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

#### 2.5.2.1. 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.

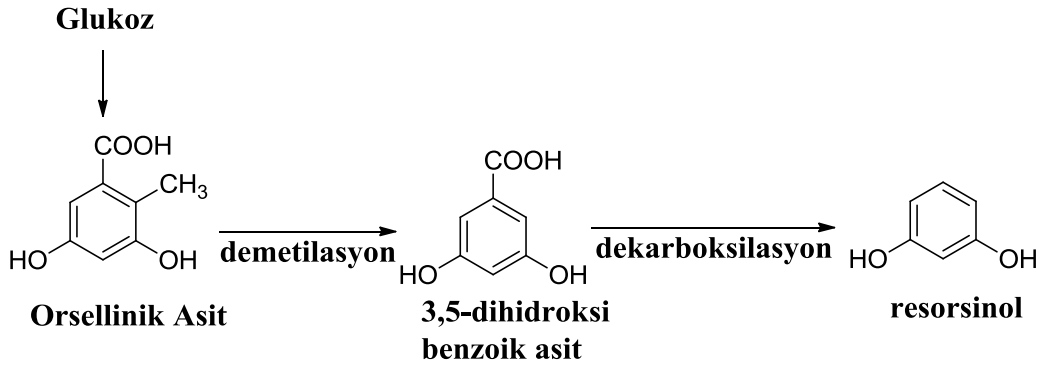


Şekil 2.5. Ligninin bozunmasıyla pirogallol oluşumunun basitleştirilmiş şeması

### 2.5.2.2. Mikrobiyal fenoller

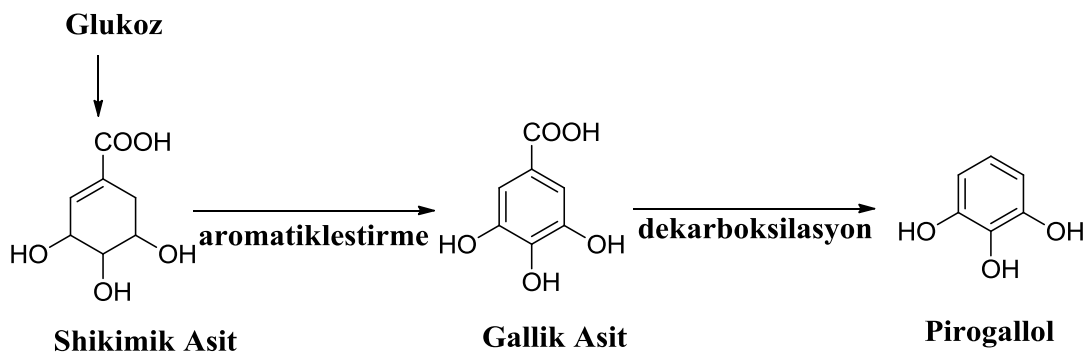
Mikroorganizmaların humik maddelerin öncülerinin üretimine katkıda bulunduğu daha önce belirtilmiştir. Fenolik ve hidroksi aromatik asit türlerin büyük kısmının, aromatik olmayan hidrokarbon maddelerden mikroorganizmalar aracılığıyla oluşturulduğu bilinmektedir. Çoğu mantar, aktinomisit ve bakterinin ikincil metabolik proses ile basit fenoller ve kompleks polifenoller sentezleyebileceği bilinmektedir. Bu özellik mantar ve aktinomisitler için daha karakteristiktir. Çeşitli toprak mantarlarının glikoz, glikoz- $\text{NaNO}_3$ , asparagin ve pepton içeren kültür ortamında humik asit benzeri maddeler ürettiği rapor edilmiştir [35,36]. Bu maddeler çeşitli kimyasal analizler sonucunda fenollere, orsellinik, p-hidroksibenzoik, p-hidroksi sinamik aside, antrakionlara 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 [15].

Humik maddelerin 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 orsellinik 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 pirogallol olduğu düşünülür. Görünüşe göre shikimik asitten aromatikleşme ile gallik asit oluşmakta ve buda dekarboksilasyona uğrayarak bir trihidroksifenol olan pirogallol 'ü vermektedir.



Şekil 2.7. Shikimik asit yolu ile pirogallolün oluşumu

Pirogallol ve resorsinol öne çıkan mikrobiyal fenollerdir ya da mikroorganizmaların ürettiği tipik fenollerdir. Pirogallol ligninin bozunmasında ve sentezinde yer alan önemli bir üründür. Bu basit fenollerin polimerizasyonu ile polifenoller oluşmaktadır [37].

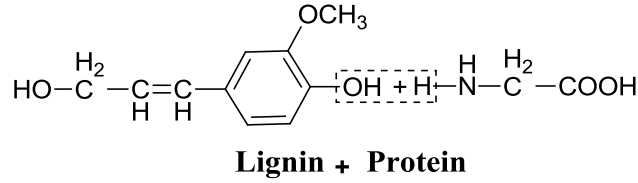
## 2.6. Humuslaşma Teorileri

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.

### 2.6.1. 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 [38,39,40]. Sebebini belirtmemesine rağmen teori Stevenson tarafından Lignin Teorisi olarak adlandırılmıştır [5]. Lignin ve amino asitler humik asitin özünü şekillendirmek için birlikte ele alınır. Humik maddelerin sentezi yalnızca lignin ve protein reaksiyonlarını kapsamaz lignin türevleri ve  $\text{NH}_3$  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.  $^{13}\text{C}$ -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 [41].

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



Şekil 2.8. Ligno-protein konseptine göre humik molekülünün 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.

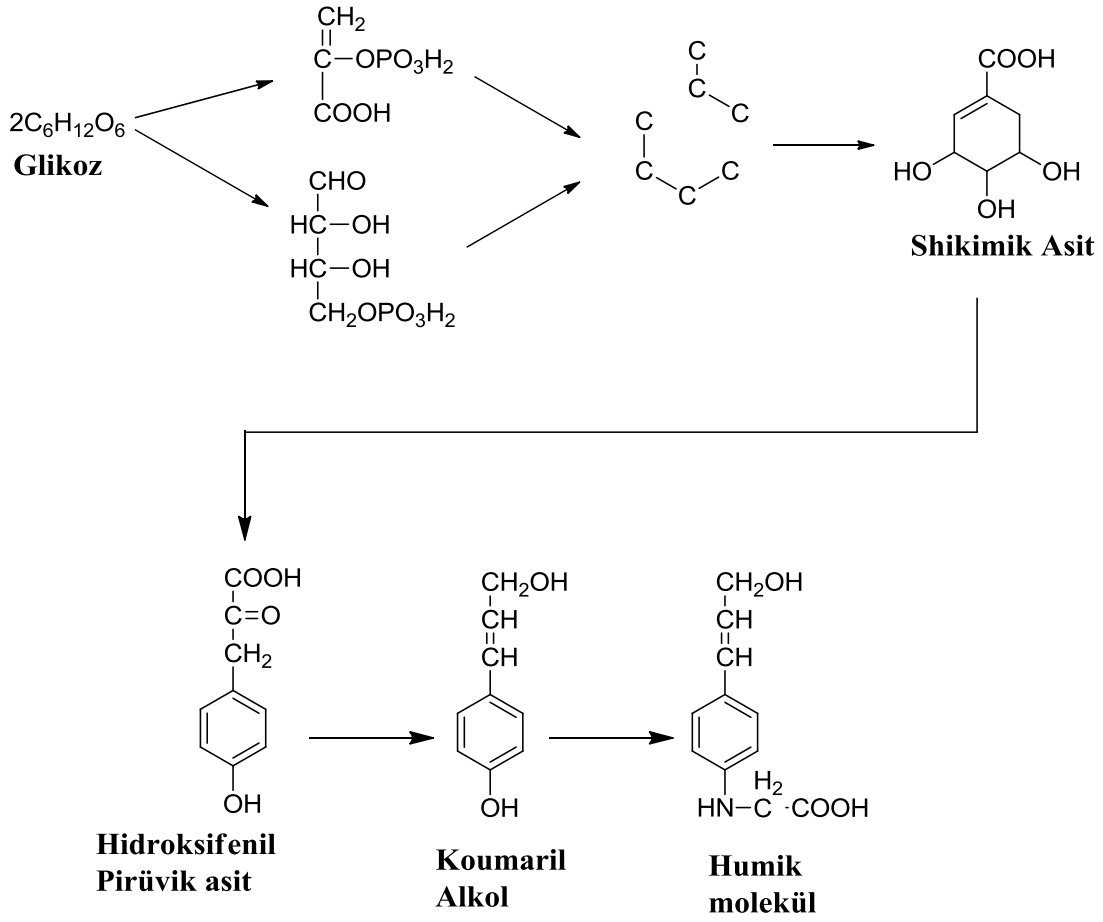
Flaig'in teorisine göre, propan kısmı bir COOH grubu tarafından karboksilasyonla oksitlendirilir, metil grubu hidroksilasyon ile OH grubuna dönüştürülebilir ve bu yolla fenolik OH grubu elde edilebilir.

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 [42].

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(1988) tarafından abiyotik polimerleşme süreci olarak adlandırılır [42].

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



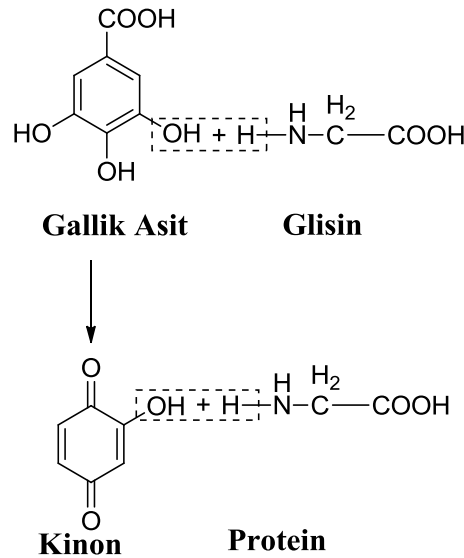


Şekil 2.10. Shikimik asit yoluyla lignin monomerlerinden ligno-protein kompleksinin oluşumunun sadeleştirilmiş şeması

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 asit 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 önce fulvik asit verdiğini ileri yoğunlaşma 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

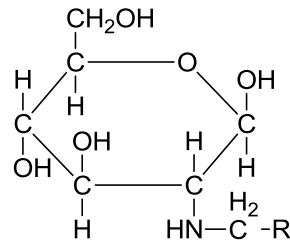
### 2.6.3. Şeker-amin yoğunlaşma teorisi

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 [5,43]. 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 glisinini ile amin grubu

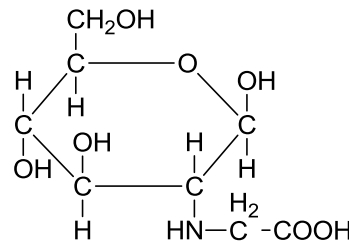


arasındaki etkileşimler ile glikozilamin oluşumunun gerçekleştiğini rapor etmiştir. Glikozilamin olarak adlandırılan kısım sonunda albüminlerden elde edilen melanine dönüştürülecektir ve melaninler sonra polimerleşme ve yoğunlaşma ile humik madde oluşturacaktır.

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 [5]. 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. Glikoz ile amin arasında ve glikoz ile glisin arasında gerçekleşen reaksiyon

## 2.7. Humik Maddelerin Kısımlara Ayrılması

Humik maddelerin klasik olarak kısımlara ayrılması farklı pH değerlerinde sulu çözeltilerinde çözünebilirlik farklılığına bağlıdır. Başlıca, zayıf HA kısımları pH değeri düşükçe 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 [44]. HA, FA, düşük molekül ağırlıklı asitler (LMAN), düşük molekül ağırlıklı doğal bileşikler (LMN), hidrofobik doğal bileşikler (HON) ve hidrofilik doğal bileşiklere (HIN) ayrılacak çözünebilir humikleşmiş ve nonhumik bileşenler içeren ekstrakte edilebilir toprak organik maddeyi 0,1 N NaOH çözeltilisi ile ekstraksiyon esasına dayalı modifiye edilmiş kısımlara ayırma şeması önerilmiştir [45]. Bu modifiye edilmiş yöntemde XAD-8 reçine kolonu kullanılmaktadır.

Humik maddeleri kısımlara ayıran diğer teknikler; jel kromatografisi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve elektroforezdir [44].

### 2.7.1. 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 [46].

Humik asitler siyah ve kahverengi 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 çözeltilisi ile tuzlandırarak yapılabilir. Bu durumda siyah humik asit pıhtılaşır ve çöker. Humik asit terimi bileşiklerin ekstraksiyon metodlarıyla 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 [44].

Günümüzde 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 [47].

### **2.7.2. 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 [46]. Humik maddelerden 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 [48]. 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 metallerin düşük konsantrasyonlarında çökmezler. Bununla beraber, mineral topraklardaki fulvik asitler inorganik kolloidler ve hidrofobik humik asitlerce tutulur ve böylece drenaj sularından atılamazlar. FA ve HA humik maddelerin en önemli kısımlarıdır. Toprakta toprağa çok farklı olmasına rağmen topraklarda büyük oranlarda vardır. 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 [15].

### **2.7.3. 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 [49].

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 [48].

#### **2.7.4. Siyah karbon ve kerogen**

Siyah karbon (black carbon, BC) Novakov tarafından “yanma ile oluşan grafitik mikroyapıya sahip siyah parçacık karbon” şeklinde tarif edilmiştir [50]. Literatürde kömür, is, elementel karbon veya pirojenik karbon gibi birkaç sinonimleri kullanılmaktadır [51]. Genellikle siyah karbon terimi kömürler, isler ve yüzeyleri elementel karbon için diğer materyalleri ifade etmek için kullanılır. Siyah karbon karasal organik maddenin tamamlanmamış yanması ve pirolizi ile elde edilir [52].

Kerogen, mono oksitleyici asitlerde, bazlarda ve organik çözücülerde çözünmeyen tortul kayalardaki karbon içerikli materyallerin bir kısmı olarak tarif edilir [53]. Olgunlaşmış kerogen tortul kayalardaki asıl doğal organik maddedir [54]. Siyah karbon ve kerogen sert karbon ve yumuşak karbonlu toprak organik madde yerine kullanılır. Tortullardaki toplam organik maddenin %1-20 siyah karbon ve kerogendir [55]. Humik maddelerden daha az polardır.

#### **2.8. 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 yüzden 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.

### **2.8.1. 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.

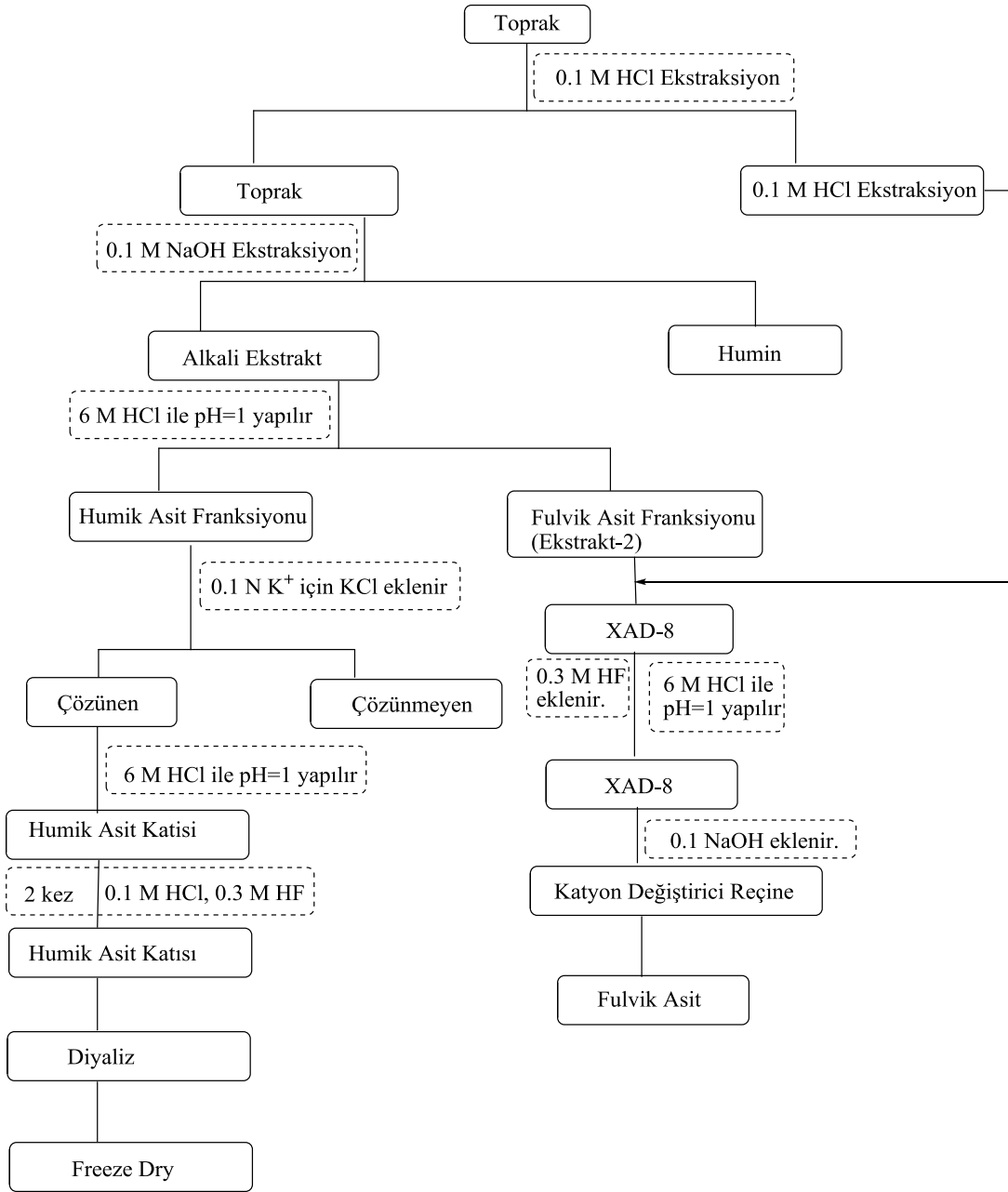
### **2.8.2. Karasal humik maddelerin ekstraksiyon metotları**

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 içeriğine 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 [56]. Bu yapılanlar 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 distile 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 içermekte olup, bu karışım 11,000 devirde 15 dakika santrifüj edilir. Humik çözelti alınır ve çöküntü atılır. Çözeltiyeye damla damla 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 2.13. Topraklardan, turbalardan ve diğer karasal tortulardan ekstrakte edilen humik maddelerin ekstraksiyonunun akış diyagramı

### 2.8.3. 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 distile su ile yıkanır, santrifüj edilerek 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 [15]. 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 renkli bir şişede saklanabilir.

Bir diğer saflaştırma işleminde katyon değiştirici kullanılmaksızın, humik madde HCl+HF ile muameleden sonra diyaliz tüpüne alınarak distile 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 [57].



#### 2.8.4. Fulvik asidin saflaştırılması

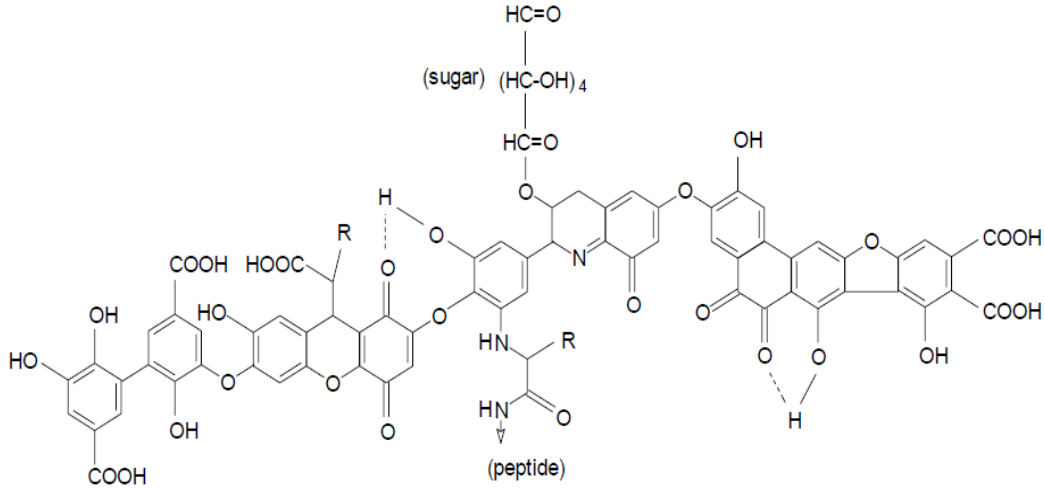
Fulvik asit içeren renkli süzüntü Uluslararası Humik Maddeler Topluluğu'nun önerdiği gibi XAD-8 amberlite kolonundan geçirilerek saflaştırılır. XAD-8 kolonu sudaki humik maddelerin ekstraksiyonu için hazırlanmaktadır. Fulvik asit XAD-8 reçinede tutulmakta ve iki kez su ile yıkanarak karbonhidratlar ve 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 Stevenson tarafından generic fulvik asit olarak adlandırılmıştır [58].

#### 2.9. Günümüzde Kabul Gören Humik Asit ve Fulvik Asit Yapıları

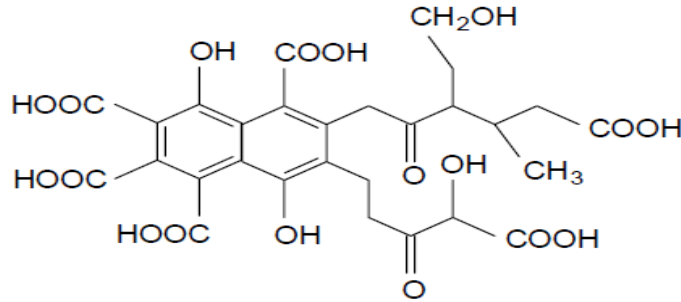
Bugünlerde fulvik ve humik asitlerin karışımının tanımlanması humik yapılar araştırmasındaki en önemli unsurlardan biri olduğu düşünülür. Analitik teknikler ve bilgisayar teknolojilerinin gelişmesinden dolayı fulvik ve humik asitlerin moleküler yapılarını açıklığa kavuşturmak için büyük çabalar sarfedilmektedir.

Stevenson (Şekil 2.13) ve Buffel'in (Şekil 2.14) çalışmasından tutun Schulten, Kujawinski 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 [59, 60].

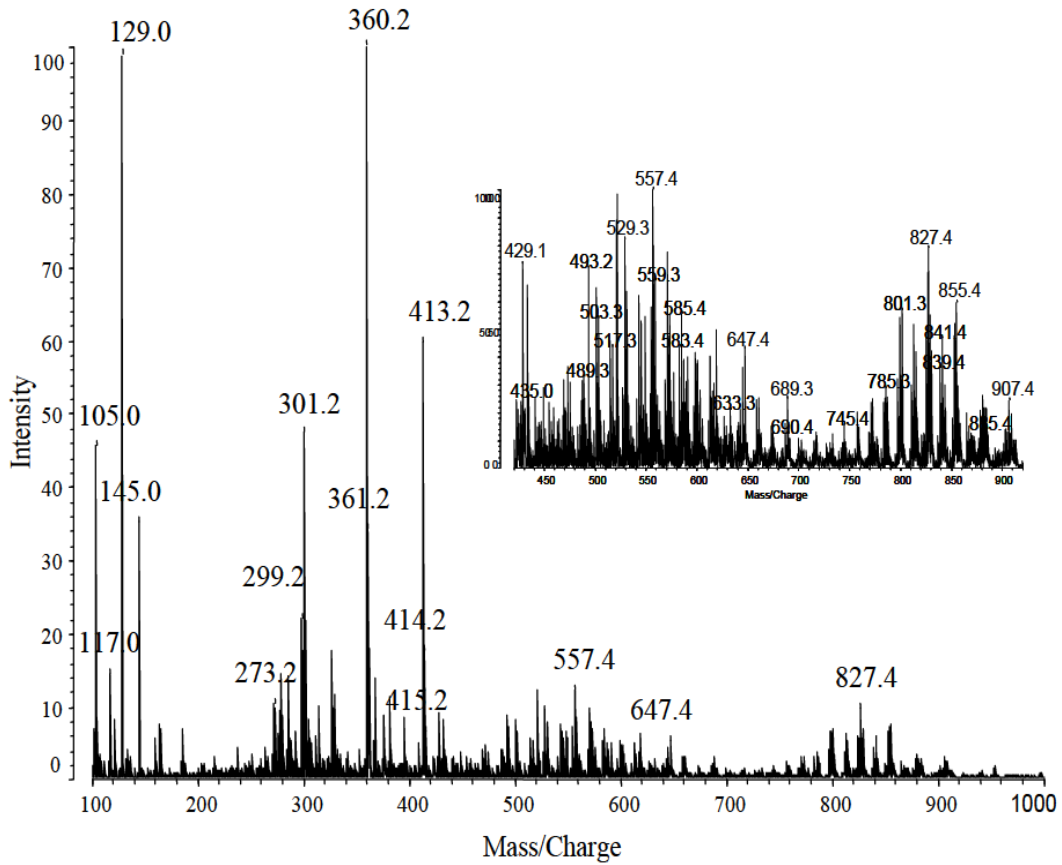


Şekil 2.14. Stevenson'a göre humik asidin yapı modeli: R alkali, aril alkil olabilir.



Şekil 2.15. Buffle ve ark. göre fulvik asit yapı modeli(1977)

Özgün fulvik asitlerin kimyasal formülleri belirlenmiştir [60]. 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 [59, 60, 61, 62, 63].



Şekil 2.16. LDI TOF MS mass spectra of HA soil (IHSS)

## 2.10. 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.

### 2.10.1. 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 yetiştirmede en önemli madde olarak kabul edilmektedir [13].

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 gevşetilmesini 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 [64,65].

Sodyum humatın ağaç yapraklarındaki dölleyici etkisi tanımlanmaktadır. Amonyum humatın önemli bir uyarıcı etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir [64].

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 [66].

### **2.10.2. Endüstriyel uygulamaları**

Humus ve humus içeren materyaller büyük ölçekli binalarda örneğin betonun sertleşme zamanını (priz sürati) kontrol etmek için katkı maddesi olarak kullanılabilir. Üstelik humukli materyaller derinin hazırlanmasında da kullanılır. Öncelikle deri boyası olarak diğer aşamada deriyi tabaklamak için bir etkin madde olarak ve son olarak da deri işlemini bitirmek için bir çözeltinin bileşeni olarak kullanılmışlardır.

Ağaç endüstrisi humik maddelerin kullanıldığı diğer bir alandır. Humik maddeler ağaç kaplamasını boyamak için ‘doğal çivit’ hazırlamada kullanılır. Bu kullanıma ek olarak humukli materyallerin suda çözünen boyaların bir bileşeni olarak ahşap mobilya için uygun etkin maddeler olduğu görülür.

Seramik endüstrisinde humukli maddeler başlıca işlenmemiş seramiklerin mekanik olarak dayanıklılığını artırmak, seramiklerin döküm özelliklerini verimli hale getirmek [67], balçık seramikleri boyamak için ve çanak çömleğin hazırlanmasında kullanılır. Buna ek olarak humik materyaller plastiklerin üretiminde özellikle Naylon 6 veya PVC plastikleri boyamak için boya olarak, poliüretan köpüklerin sertleştiricisi olarak veya PVC plastikler için akışkanlaştırıcı maddeler olarak kullanılmaktadır [68].

Humik maddeler kâğıt endüstrisinde de kullanılmaktadır. Humik maddeler farklı üretim işlemlerini kapsarlar. Örneğin humik maddeler elektriği ileten kâğıtların üretiminde, yüksek çekim direncine sahip kâğıdın üretiminde ve kâğıdın geri dönüşümünde de kullanılır. Humik maddelerin kullanıldığı diğer endüstriyel uygulamalardan bahsedecek olursak; iyon değiştirici olarak, sentetik hidrokarbonların ve akaryakıtın kaynağı olarak [69], yiyecek üretiminde veya uranyumun madenlerden çıkartılmasında kullanılan ekstraksiyon metodunun verimini artırmak için kullanılır [70]. Humik maddeler geçiş metallerini tutmak için, organometalik bileşikleri oluşturmada büyük kapasiteye sahiptir.

Atık işleme endüstrisinde atıklardan humik maddelerin üretilmesi ilginç olanaklardır. Sonuçlar humik asitin içerisindeki selülozun geri dönüşümü ile sıvı ambalaj kartonunun (LPB) üretiminin net bir şekilde mümkün olduğu gösterdi [71].

### **2.10.3. Çevresel uygulamaları**

Doğal organik kolloidler (humik ve fulvik asitler) oldukça önemlidir. Çünkü çoğu radyonüklidleri içeren metallerle kompleks oluşturarak suda çözünebilirler [3,72,73,74,]. 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 [75, 76].

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 [77]. 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 [78].

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 [79].

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 [80,81].

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 autokolojisi için önemli sonuçlar elde etmektedir. Asetatın kümülatif (birikici) üretimi sırasında bu prosesin fermantasyon bakterisine enerji avantajı sağladığı görülür [82]. Belirli bakteriler, mantar ve birçok mikroorganizma için enerji kaynağı olarak humiklerin kullanımı birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [83]. Fakat yiyecek kaynağı olarak humik materyalleri kullanamayacakları belirlenmiştir.

#### **2.10.4. 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 [84,85].

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 [86]. Ağır metallerle şelat bileşiklerini oluşturmak için humik maddelerin gücü ağır metallerin canlı organizmalardan ayıklanmasını sağlamaya fazlasıyla yeter [87]. Su



sistemleri ve su çözeltilerindeki humik materyallerin su tedavisi ve banyo tedavisi ile yakın bir şekilde bağı olduğu gözlemlendi [88].

Humik maddelerin anti bakteriyel ve antiviral özellikleri sayesinde yeni tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [89,90].

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 [91,92,93].

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 [94].

## **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.

Distile su; elde edilen fulvik asit numuneleri distile su ile seyreltilerek Shimadzu-UV-2401 PC (UV-VIS Recording Spectrometer) marka 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. Freeze dryer

Donma:

Dondurarak kurutma işlemi yapılmadan önce numuneler dondurulmalıdır. Numunenin tabakası mümkün olduğunca ince olmalıdır (20 mm' nin altında ). Dondurarak kurutma işleminin uzunluğu numunenin tabaka kalınlığı ve bu yüksekliğe bağlıdır. Tavsiye edilen değerler; kurutulacak numuneler freze dryer cihazına eşit bir şekilde dağılacak ve her kaptaki numune yüksekliği aynı olacak. Donma sıcaklığı numunenin katılaşma noktası sıcaklığı ile orantılıdır. Donma hızı kristalin büyüklüğünü etkiler ve sonuç olarak da süblimleşme hızını etkiler. Bu yüzden her numune için en uygun donma parametreleri belirlenebilir. Donma işlemi -20°C 'nin altında ve 3-4 saat aralığında uygulanması önerilir.

Dondurarak Kurutma:

Yoğunlaştırıcı programlanan sıcaklığına ulaştığında ve vakum pompası çalıştığında donmuş numuneler ile şişe veya balon yoğunlaştırıcı silindir valfine bağlanır. Valf açılır, kaplarda vakum oluşturulur ve süblimleşme başlar. Tüm balonlar ile bağlantı kuruluncaya kadar valfler açılır. Vakum 4 dakikada 10 mbar'dan daha az olmalıdır. Eğer vakum daha yüksek olursa pompa duracak ve vakum sisteminde alarm

görülebilecektir. Eğer bu olursa, sızdırma için valf-şişe bağlantıları kontrol edilir. İşleme devam etmek için ENTER tuşuna basılır.

Balon ile bağlantı kurulmak istendiğinde, dondurma kurutma işlemi başladığında işlem aşağıdaki basamaklar ile yapılır;

- 1) Yeni balon bağlanır ve bu valf açılır.
- 2) Vakum ile ünite arasında bağlantı sağlanıncaya kadar beklenir.
- 3) Diğer balonlar bağlanır.
- 4) Tüm balonlar bağlandığında, aparatlar numunenin tamamen kuruyuncaya kadar çalışır.

Kurutma sırasında kurutma işlemi hızlandırmak için dış ısıtma uygulanıyorsa, ısıtma sistemi kurutulacak numuneden uygun uzaklıkta olmalıdır. Isıtma aynı zamanda balonlara direkt uygulanabilir. Kabin dış kısmında buz tabakası oluşacaktır, kurutma işlemi devam ettikçe bu dereceli olarak kaybolacaktır. Buzun tamamen kaybolması kurutma işleminin normal atmosfer sıcaklığında bittiğini gösterir. İşlem bittiğinde, uygun manifold musluğu kapatılır, hava balonun içerisine girer sonra kaplar alınabilir.

Dondurarak kurutma sırasında esas kurutma işleminin uzunluğu temel olarak şu parametrelere bağlıdır:

1. Isıtma sıcaklığı numunelere uygulanabilir (aletin dışından ).
2. Numunelerin kabul edebileceği maksimum ısıtma sıcaklığı,
3. Beklenen en son derecedeki nem oranı,
4. Numunelerde katı madde oranı,
5. Elde edilen vakum oranı,
6. Her defada kurutulacak numune miktarı,
7. Yoğunlaştırıcı sıcaklığı.

### **3.1.2.5. Etüv**

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

### **3.1.2.6. 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.

### **3.1.2.7. Elek**

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

### **3.1.2.8. Havan**

Toprağın dövülmesi amacıyla yüzey alanı geniş özel yapı havan kullanıldı.

### **3.1.2.9. Toprak küreği veya beli**

Tarlanın değişik noktalarından örneklerin toplanması amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.2.10. Kova ya da leğen**

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

### **3.1.2.11. Naylon torba**

Hazırlanan örnekler ağzı bantlı naylon torbalara koyuldu.

### 3.1.2.12. 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 fulvik asitlerin UV analizleri yapıldı.

### 3.1.3.2. IR

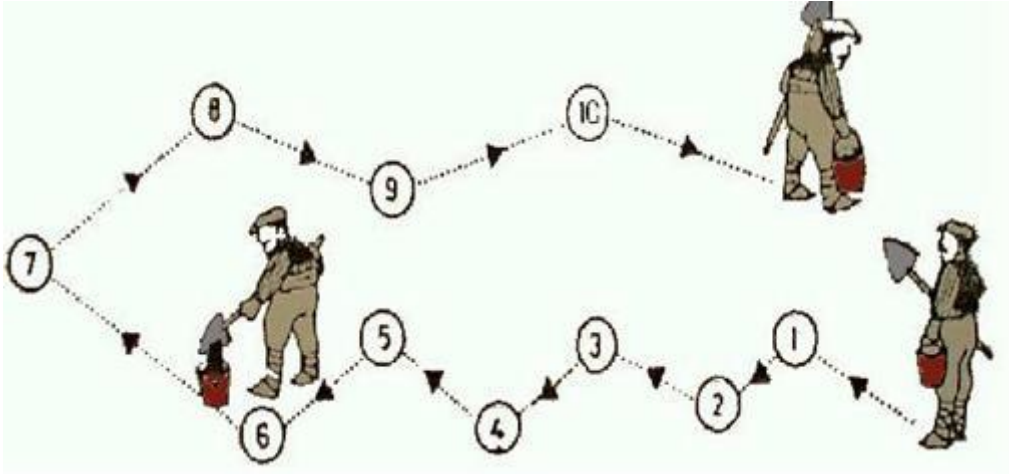
Fulvik aside ait yapısal bilgiler azaltılmış diffüze reflektans Foriyer Transform Infrared (ATR-FTIR) kullanılarak araştırıldı.

## 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. Numunelerin 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. Numunelerin 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 fulvik 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 kaptaki 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. Sıvı kısım fulvik asittir ve saflaştırılması gerekmektedir. Katı kısım humik asittir ve saflaştırılması gerekmektedir.

International Humic Substance Society(IHSS) metodu ışığı altında fulvik asitin saflaştırma işlemi; fulvik asit numunesi XAD-8 reçinesinden geçirildikten sonra,

fulvik asit XAD-8 reçinesi üzerinden 0.65 kolon hacmi miktarındaki distile su ile yıkanır. Daha sonra fulvik asit numunesi bir kolon hacmi 0.1 molar NaOH ile elute edilir. Sonra 2 kolon hacmi distile su ile yıkanır.

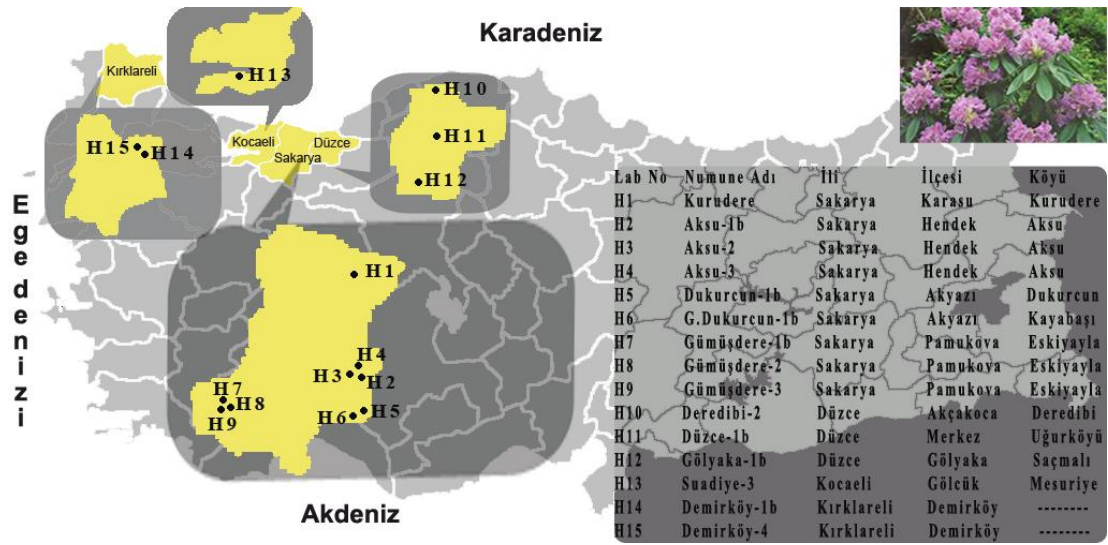
Elute edilen fulvik asit  $H^+$  ile doyurulmuş katyon değiştirici amberlit reçineden (IRA-67) geçirilir. Katyon değiştirici amberlit reçinenin miktarı çözelti içerisindeki  $Na^+$  iyonları konsantrasyonunun 3 katı kadar olmalıdır.

Fulvik asit numunesi son olarak freze dry işlemleri Telstar Cryodos -50 marka freeze dryer cihazı ile yapılır.  $H^+$  ile doyurulmuş fulvik asit 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 Numunelerinin 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 yansıması 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	Acıelma
Bölme No	4
Bakı	K.Doğu
Rakım	-
Raftası	E25d3
Koordinatları	Y: 36T3085173      X: 4542148
Numune Noktasının Meşçere Tipi	Knc3
Numune Noktasının Ağaç Türü	Kayın
Bitki Örtüsü	Kn/Rh
Toprak Profil Türü	O <sub>2</sub>
O <sub>2</sub> Profil Kalınlığı	30 mm

#### 4.3. Humus Numunelerinin Kurutulması

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

#### 4.4. Humus Numunelerinin 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 2 mm çapında (10 mesh) elekten geçirilerek elendi.

#### **4.5. Orman Gülü Humusundan Fulvik Asidin Ekstraksiyonu**

Belirtilen bölgelerden toplanan havada kurutulmuş humus numunesi dövüldükten sonra 2 mm'lik elekten elendi. 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 çökelti 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 çökelti birbirinden ayrıldı. Ayrılan ikinci süzüntüler birinci süzüntülerin bulunduğu toplama kabına alındı. Aynı numuneye ait çökelti 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 çökelti 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 Fulvik Asidin Ayrılması**

Her bir numune için ayrı ayrı elde edilen humik ve fulvik asitlerin karışımına 25'er mL %37'lik konsantre HCl katıldı. Çökeltme 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. Fulvik asit saflaştırma işlemi için ayrıldı.

#### 4.7. Fulvik Asidin Saflaştırılması

Elimizde bulunan 100 mL'lik fulvik asit ekstraktı için XAD-8 reçinesinden 35 ml (25,25 g) kullanıldı. Çözücülerin miktarı da fulvik asit ekstraktı ile birebir orantılı ölçüde ayarlandı.



Şekil 4.2. Ekstrakte edilen fulvik asit numuneleri

#### XAD-8 Reçinesi İle Kolon Hazırlanması;

XAD-8 reçinesinden 25,25 g tartılarak, kolona konuldu (boyu: 20 cm, çapı: 2,2 cm).

Sonra kolona sırasıyla;

- 1) 100 mL metanol,
- 2) 100 mL 0,1 molar NaOH,
- 3) 100 mL 0,1 molar HCl,
- 4) 100 mL distile su geçirilerek kolon hazırlandı. Sonra;
- 5) 100 mL fulvik asit ekstraktı kolona azar azar verildi.
- 6) 100 mL 0,1 molar HCl,
- 7) 100 mL distile su geçirildikten sonra,
- 8) 100 mL 0,1 molar NaOH ile kolondaki fulvik asit elute edilerek alındı.

Sonra elute edilen fulvik asidin pH metre ve UV spektrometre cihazları kullanılarak ölçümler alındı.

### Katyon Değiştirici Reçine ile Kolon Hazırlanması;

Katyon değiştirici reçineden 10 mL' lik mezüre 7 mL seviyesinde ( 4,5 g ) konuldu. Üzerine reçinenin 1 mL üzerinde olacak şekilde distile su ilave edildi. Sonra hazırlanan reçine kolona (boyu: 20,5 cm, çapı: 1,5 cm) konuldu. Reçine distile su ile iyice doyuruldu ve XAD-8 reçinesinden elute edilen fulvik asit, katyon değiştirici reçine ile hazırlanmış kolona tatbik edildi. Kolondan ilk gelen su olduğundan, ayrı kaba alındı ve atıldı. Sonra fulvik asit kolondan alındı ve ardından 0,1 molar HCl ile katyon değiştirici reçine yıkanarak, reçine rejenere edilmiş oldu. Katyon değiştirici reçine ile hazırlanan kolondan alınan fulvik asidin pH metre ve UV spektrometre cihazları kullanılarak ölçümler alındı.



şekil 4.3. Katyon değiştirici reçine ile hazırlanan kolona verilen fulvik asit

Tekrar ikinci bir katyon değiştirici reçine ile kolon hazırlandı. Katyon değiştirici reçineden 10 mL' lik mezüre 7 mL seviyesinde ( 4,5 g ) konuldu. Üzerine reçinenin 1 mL üzerinde olacak şekilde distile su ilave edildi. Sonra hazırlanan reçine kolona (boyu: 20,5 cm, çapı: 1,5 cm) konuldu. Reçine distile su ile iyice doyuruldu ve XAD-8 reçinesinden elute edilen fulvik asit, katyon değiştirici reçine ile hazırlanmış kolona tatbik edildi. Kolondan ilk gelen su olduğundan, ayrı kaba alındı ve atıldı. Sonra fulvik asit kolondan alındı ve ardından 0,1 molar HCl ile katyon değiştirici reçine yıkanarak, reçine rejenere edilmiş oldu. Katyon değiştirici reçine ile



hazırlanan kolondan alınan fulvik asidin pH metre ve UV spektrometre cihazları kullanılarak ölçümler alındı. Fulvik asit freze dry için saklandı.

#### 4.8. Fulvik Asidin Freeze Dryer İle Dondurarak Kurutulması

Elde edilen fulvik aside, içindeki çeşitli çözücü ve safsızlıkların uzaklaştırılması için freeze dry ile kurutma işlemi yapıldı.



Şekil 4.4. Freeze dryer cihazı ile fulvik asitlerin kurutulması

Elde edilen 100 mL fulvik asitin 50 mL'si erlene konularak freeze dryer cihazının valflerine bağlandı. Elimizdeki miktarın yarısının konulmasının nedeni, vakum uygulandığında cihazın geri soğutucu bölümü numuneyi içeri çekmesini önlemektir. Freeze dryer cihazının ana şalteri açıldıktan sonra on/off düğmesine basılarak çalıştırılır. Freeze dryer cihazının geri soğutucusu  $-45^{\circ}\text{C}$  'ye gelince  $5 \cdot 10^{-3}$  mbar vakum uygulanmaktadır. Numunelerin iyice kurutulması için cihazın 24 saat çalışması gerekti. Bu 24 saat çalışmanın sonunda numunelerimiz kuru hale geldi. Daha sonra kalan 50'şer mL'yi erlenlere konularak işlem tekrarlandı ve bütün numunelerin çözücü ve safsızlıklarından uzaklaştırılması sağlanarak, kuru halde fulvik asitler elde edildi.

## 4.9. Spektroskopik Sonuçlar

Saflaştırılan fulvik asit yapılarının karakterizasyonu için FTIR ve UV gibi çeşitli spektroskopik yöntemlerden faydalanıldı.

Humik maddelerle ilgili yapısal ve bileşim özellikleri konusunda en genel bilgiler UV-Visible, IR ve bazı bozulma metotları kullanılarak elde edilir.

Humik 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 fulvik 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 fulvik maddelerin karakterize edilmesinde ve belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir.

Seyreltik fulvik madde çözeltilerinin 250 ve 365 nm dalga boyu absorpsiyonlarının oranı,  $E_2/E_3$  fulvik maddelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılır. Elde edilen oran miktarı fulvik maddelerin humik maddelerden farkını gösterir [95].

Tüm fulvik 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 fulvik asit moleküllerindeki aromatik yapıların miktarlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Fulvik asitin yapısındaki (fenolik bileşikler, benzoik asit ve polienler ) çeşitlilik, farklı bölgelerdeki absorpsiyon piklerinden anlaşılabilir. Bu yapıların belirlenmesinde numunelerin

nerelerden geldiği konusunda bir fikir verecektir. Molar absorptivite ler fulvik asitlerin aromatiklik derecelerini, fulvikleşme miktarlarını ve moleköl ağırlıkları konusunda bilgi verecektir. Yapılarında barındırdıkları çok farklı gruplardan dolayı fulvik asitler çok farklı maddelerle etkileşim yapabilirler. Bunlar, polar olmayan maddeler, organik kirleticiler, metaller ve radyoaktif çekirdekler şeklinde sıralanabilir.

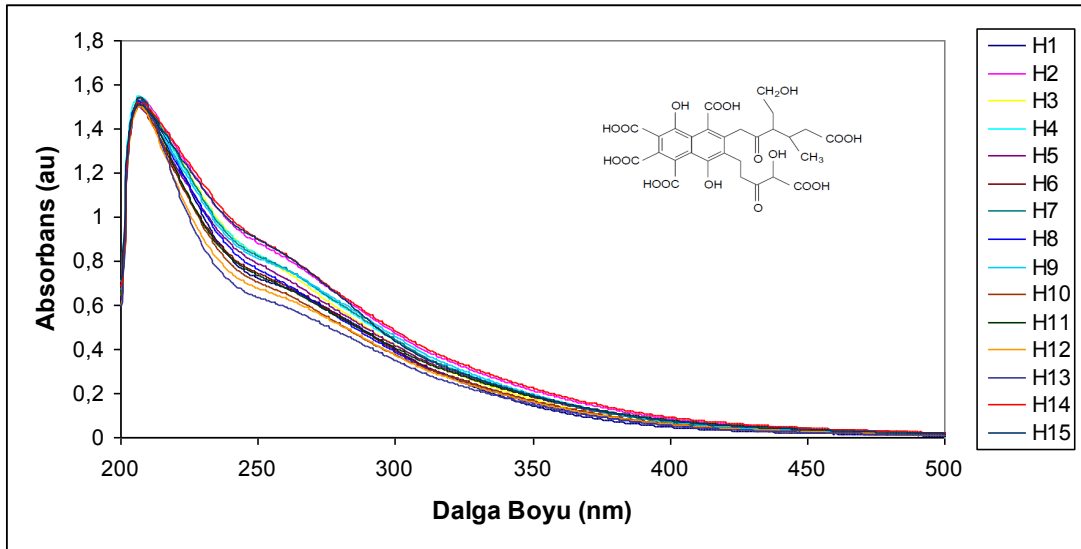
Bu çalışmada izole edilen fulvik asitler için absorpsiyon spektrumları 200 nm ile 800 nm aralığında kaydedildi. Literatürde aromatik miktarların belirlenmesinde farklı yöntemlerin takip edildiği görülmektedir. Bunlardan birincisi molar absorpsiyonların belirlenmesinde sonra 280 nm numunelerin absorpsiyonlarının ölçülmesi ve aromatik miktarın hesaplanması için türetilmiş formülün kullanılmasıdır. Bu formül Traina ve arkadaşlarının kullandığı formüle yakın bir formüldür. Formülde verilen  $\epsilon$  değeri molar absorptiviteyi gösterir.

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

Tablo 4.2. Peuravuori ve Pihlaja'ya göre aromatiklik derecesini belirlemede kullanılan  $E_2/E_3$  oranları

Numune	$E_2$ (250 nm' deki dalga boyundaki absorpsiyon değerleri)	$E_3$ (365 nm' deki dalga boyundaki absorpsiyon değerleri)	$E_2/E_3$ Oranı
H1	0,7225	0,1035	6,9806
H2	0,8816	0,1647	5,3527
H3	0,8266	0,1277	6,4729
H4	0,8293	0,1438	5,7670
H5	0,7871	0,1403	5,6101
H6	0,7458	0,1257	5,9331
H7	0,8223	0,1414	5,8154
H8	0,7617	0,1163	6,5494
H9	0,8120	0,1477	5,4976
H10	0,7048	0,1263	5,5803
H11	0,7367	0,1458	5,0528
H12	0,6759	0,1218	5,5492
H13	0,6348	0,1131	5,6127
H14	0,9016	0,1736	5,1935
H15	0,8990	0,1459	6,1617

Aromatiklik derecesini belirlemede kullanılan ikinci bir yol ise ve 250 ve 365 nm dalga boylarında absorpsiyonların ölçülmesi ve bu dalga boylarına göre  $E_2/E_3$  oranların bulunması esasına dayanır. Peuravuori ve Pihlaja, bu ikinci yöntemden elde edilen veriler arasındaki korelasyonun birinciye göre daha az olduğunu belirtmişlerdir [96]. Yüksek  $E_2/E_3$  oranı doğal humik maddede düşük aromatikliği göstermektedir. Buna karşın  $E_2/E_3$  oranı arttırıldığında ise moleküler ağırlığı azaldığı tespit edilmiştir. Fakat birinci yöntemin tam doğru olduğunu söyleyebilmek için molar absorptivitenin nasıl belirlendiğinin belirlenmesi gerekir. Fulvik asitler çok farklı molekül yapıları içerdiğine göre hangi yapıya göre ve hangi molekül ağırlığına göre molar absorptivitenin belirlenmesi gerektiği bilinmelidir.



Şekil 4.5. Bazı fulvik asitlerin UV spektrumları

#### 4.9.2. FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar

Fulvik aside ait yapısal bilgiler azaltılmış diffüze reflektans Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) kullanılarak araştırıldı. Tüm numunelerden ekstrakte edilen fulvik asitler freze drying işleminden 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 literatür de verilen verilerle karşılaştırıldı.

FTIR spektroskopisi ölçümleri IR Prestije-21 kullanılarak MID IR bölgesinde 600 ile 4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ve her numune için 25 tarama yapılarak gerçekleştirildi. Fulvik asitlerin izole edilmesinde aynı basamaklar ve aynı kimyasallar kullanılmıştır. Değişik bölgelerden toplanan numuneler ait FTIR spektrumlarının bir birine benzerlik gösterdiği tespit edildi. Genel olarak bakıldığında 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde geniş ve örtüşmüş piklerin varlığı görülmektedir, O-H gerilmesi fenol ve alkol veya karboksilik grup hatta amid ve amindeki N-H gerilmelerinden kaynaklanabilir. 3200-3050  $\text{cm}^{-1}$  piki bölgesinde aromatik C-H simetrik-asimetrik gerilme titreşimleri görülmektedir. 2990-2900  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki pikler ise aromatik gruplara bağlı olan alifatik CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> doymuş C-H' e ait gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1660-1630  $\text{cm}^{-1}$  pikleri aralığında ikili ya da üçlü karbonil gruplarına ait C=O gerilme titreşimlerini görmekteyiz. 1590-1550  $\text{cm}^{-1}$  deki pik ise aromatik yapıda yer alan C=C grubundan ve hidrojen bağlı C=O grubundan ortaya çıkmaktadır. 1450-1425  $\text{cm}^{-1}$  piki ise alifatik C-H eğilme titreşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. 1340-1320  $\text{cm}^{-1}$  piki O-H bandına ait olup ya fenolik grup içeren karbonil gerilimi ya da antisimetrik gerilim olarak ise asit ve alifatik C-H bandına aittir. Özellikle 1080-1020  $\text{cm}^{-1}$  piki polisakkarit gruplarına ait olup spektrumda 1200-1150  $\text{cm}^{-1}$  pikinin de olması alkol grup titreşimlerini ispatlamaktadır. 860 ve 820 deki geniş pik grubu ise karbonhidratlara ait C-O gerilme titreşiminden, substitute aromatik C-H bağ gerilimine ait ve silikatlara ait Si-O ortaya çıkarmaktadır.

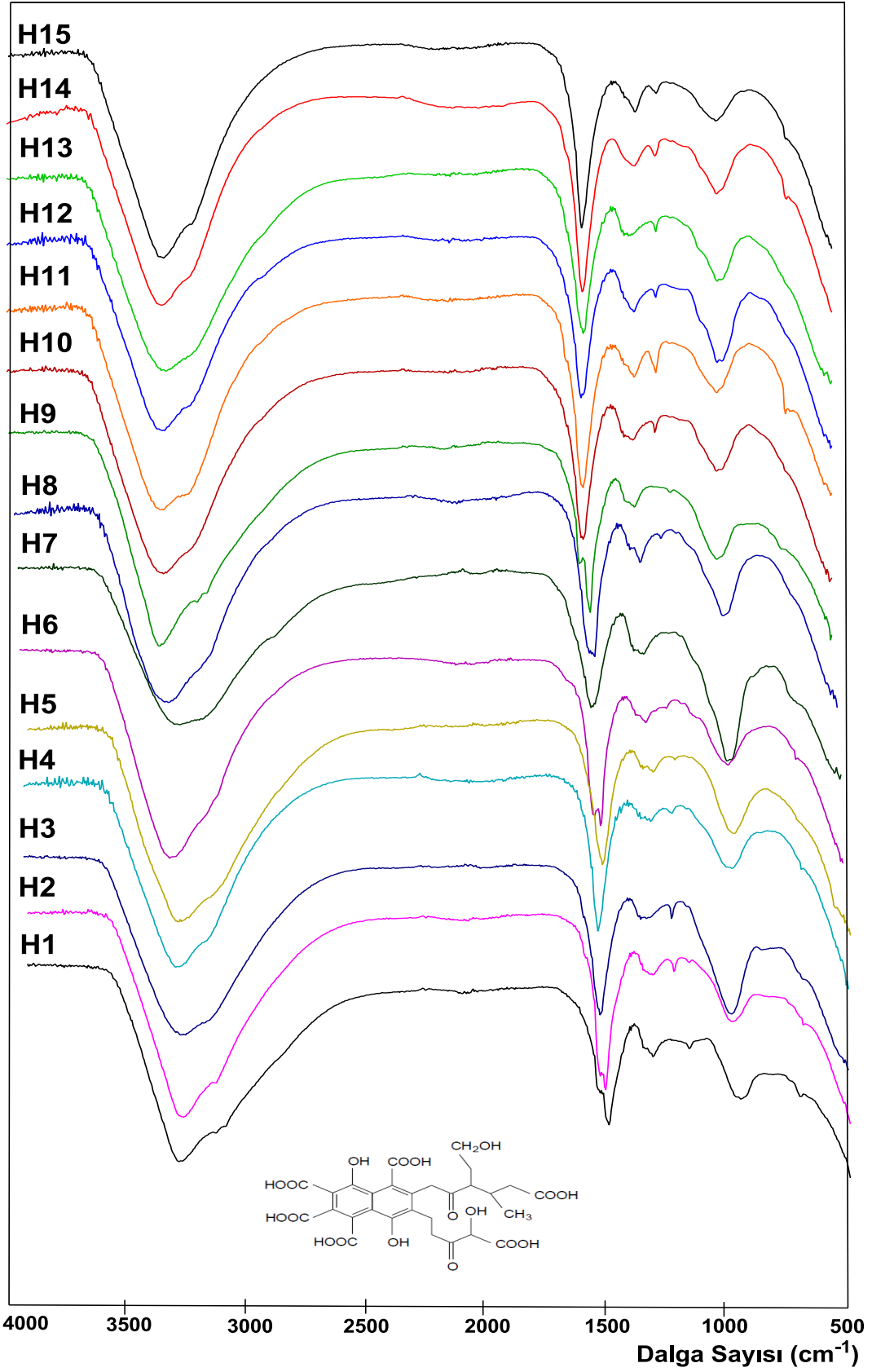
Elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında aromatik grupların, hidroksi yaygın şekilde gözlenen gerilme titreşiminin, karbonil gruplarına ait sinyallerin üçlü, ikili, tekli gözlenmesi yapıdaki miktarları bölgesel farklılıklar göstermektedir. Bu durumda büyük olasılıkla bazı numunelerde tam fulvik madde oluşumunun tamamlanmamış olduğunu FTIR sonuçlarına bağlı olarak düşünmekteyiz [98]. Tablo 4.2. de fulvik asitin FTIR spektrumunda ortaya çıkabilecek mümkün olan titreşimler ve hangi gruplara ait olduğunu göstermektedir. Aşağıdaki tablo literatürden [97] alınmıştır.

Tablo 4.3. Fulvik Asit FTIR Spektrumunda Gözlenen Pikler ve Grupları

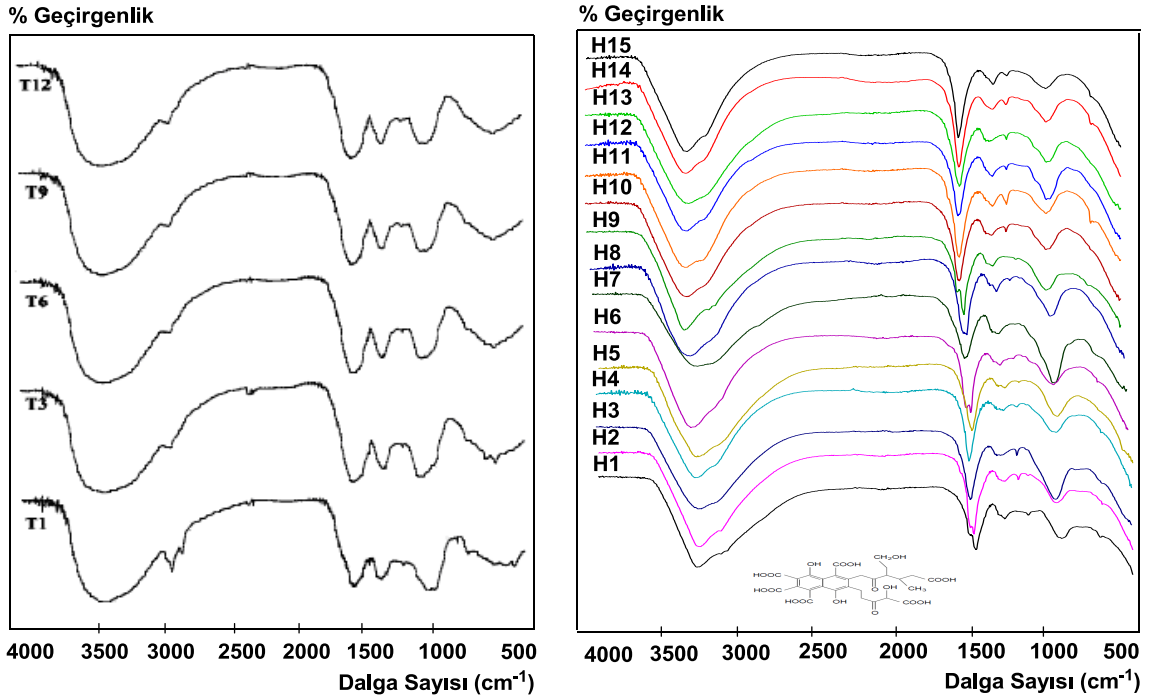
Dalga Sayısı	Piklere ait titreşim grupları
3500-3200(yüksek derecede ve çok geniş)	Hidrojen bağı içeren karboksilik asitler, fenoller, alkoller ve kısmen amidlerin ve aminlerin N-H gerilmesi.
3100-3000	Aromatik ve doymamış C-H gerilmesi (genellikle OH/NH gerilme bölgesinin geniş ve şiddetli pikleri)
3000-2800	CH <sub>3</sub> ve CH <sub>2</sub> 'nin alifatik C-H gerilim titreşimleri. CH <sub>3</sub> 'ün 2960 cm <sup>-1</sup> ve 2890 cm <sup>-1</sup> 'de asimetrik ve simetrik gerilimi. CH <sub>2</sub> 'nin 2921 cm <sup>-1</sup> ve 2850 cm <sup>-1</sup> 'de asimetrik ve simetrik gerilimi. (OH/NH gerilim bölgesi geniş ve yüksek şiddetli pikleri)
2650-2400 (omuz)	Karboksilik asidin OH'a bağlı gerilimi.
1790-1775	Karboksilik asit anhidritin asimetrik C=O gerilimi.
1730-1700	COOH ve ketonların C=O gerilimi.
1630-1590	Aromatik ve doymamış yapıların C=N ve C=C ile asimetrik COO- ve amidlerin C=O örtüşmesi.
1515-1490	Aromatik halka C-H gerilimi.
1450-1380	Karboksilik asitlerin C-O-H ile düz durumda bükülmesiyle, simetrik COO- 'nun C=O örtüşmesine alifatik C-H gerilmesi.
1378	CH <sub>3</sub> 'ün simetrik bozunumu.
1230-1200	Karboksil gruplarının C-O gerilimi ve O-H bozunumu.
1200-1100	Esterler, eterler, fenoller ve alkollerin C-O ve C-O-H gerilimi. Aminler ve amidlerden C-N gerilimi.
1100-1000	Silikat kirliliğinin Si-O ve polisakkaritlerden dolayı C-O gerilimi.
900-600	Çeşitli substituentler içeren aromatik halkaların C-H bozunum pikleri.

Farklı bölgelerden toplanan orman gülü humusundaki fulvik asitlerinin IR spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 4.6'da görülmektedir. Şekil 4.6'dan da anlaşılacağı gibi 15 farklı numunenin FTIR spektrumu da benzer olduğu görülmektedir. Bu da fulvikleşme sürecinin benzer olduğunu göstermektedir.

% Geçirgenlik



Şekil 4.6. Farklı Fulvik asitlerin FTIR spektrumları



Şekil 4.7. Farklı Fulvik asitlerin FTIR spektrumlarının literatür ile karşılaştırılması

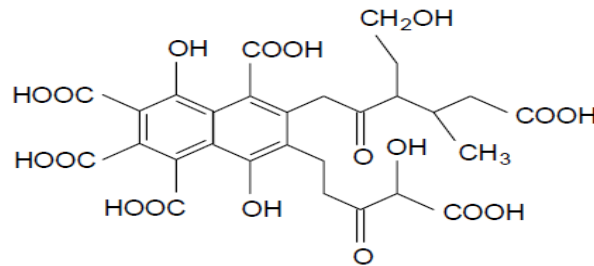
G. Ait Baddi ve arkadaşları tarafından fulvik asitler üzerine yapılan çalışmalarda Şekil 4.7.'de sol tarafta görülen FTIR spektrumunu elde etmişlerdir. Sağ tarafta ise 15 farklı yerden toplanmış numunelerimiz üzerine yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz fulvik asit numunelerinin gerekli işlemleri her birinde aynı olarak tamamlanmış ve FTIR spektrumu ATR yöntemi kullanılarak alınmıştır. Literatürdeki bu veriyle çalışmamızın sonucunu karşılaştırdığımızda uyumlu sonuçların varlığı açıkça ortadadır.



## BÖLÜM 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada Batı Karadeniz Bölgesinde bulunan Düzce, Sakarya, Kocaeli ve Kırklareli illerinin Karasu, Hendek, Akyazı, Pamukova, Akçakoca, Gölyaka, Gölcük ve Demirköy ilçelerinden mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron Ponticum* L.) bitkisine ait humus örnekleri toplandı. Bu numuneler literatürde belirtilen ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri uygulanarak fulvik asit saf olarak izole edildi. Elde edilen fulvik asidin yapı karakterizasyonu UV, FTIR, gibi spektroskopik metotlarla yapıldı.

Bu spektroskopik yöntemlerle elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu gözlemlendi. Örneğin UV adsorbsiyon spektroskopisine bağlı olarak elde edilen sonuçlardan hesaplanan  $E_2/E_3$  oranı yapıdaki aromatik grupların miktarına ilişkin bilgi vermektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde H79 numunesi maksimum orana sahipken H59 numunesi ise minimum değerdedir. Bu sonuçlar FTIR spektroskopisinde  $3100-2900\text{ cm}^{-1}$  bölgesi ve  $1600-1560\text{ cm}^{-1}$  bölgesi dikkate alındığında H79 numunesinin H59 numunesine oranla çok daha belirgin sinyallere sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatürde önerilen yapılarla karşılaştırıldı ve sonuçların uyumluluğu anlaşıldı. Yapılan bu çalışmalar sonucunda orman gülü humusundaki fulvik asidin yapısı literatürde önerilen yapı (şekil 5.1) ile uyumlu olduğu görüldü.



Şekil 5.1. Buffle ve ark. göre fulvik asit yapı modeli(1977)

## **BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER**

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

## KAYNAKLAR

- [1] ANDRIESSE, J.P., Nature and Management of Tropical Peat Soils. FAO Soils Bulletin, 92-5-102657-2, pp. 165, Rome, 1988.
- [2] GAJDOSOVÁ, D., POKORNÁ, L., LÁSKA, S., PROSEK, P., HAVEL, J., Humic Substances. Structures, Models and Functions, In Ghabbour E.A. and Davies G., Cambridge, pp. 121-131, 2001.
- [3] PACHECO, M.L., HAVEL, J., Capillary Zone Electrophoresis of Humic Acids from American Continent. *Electrophoresis* 23: 268-277, 2002.
- [4] GAJDOSOVÁ, D., NOVOTNÁ, K., PROSEK, P., HAVEL, J., Separation and Characterization of Humic Acids from Antarctica by Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Inclusion Complexes of Humic Acids with Cyclodextrins. *J. Chromatogr. A.* 1014:117-127, 2003.
- [5] STEVENSON, F.J., Humus Chemistry; Genesis Composition, Reactions, John Wiley and Sons Inc., 496, New York, 1994.
- [6] SENESI, N., MIANO, T.M, PROVENZANO, M.R., BRUNETTI, G., Characterization, Differentiation, and Classification of Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Sci.* 152: 259-271, 1991.
- [7] CHIOU, C.T., Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils, In B.L. Sawley and K. Brown, Madison WI, pp. 1-23, 1989.
- [8] NICOLAS, R.E., Hermann, Paris. pp. 147-153, 1968.
- [9] SCHNITZER, M. and KHAN, S.U., Soil Organic Matter, Academic Pres., New York, pp. 143-150, 1978.
- [10] VAUGHAN, D. and LINEHAN, D.J., The Growth of Wheat Plants in Humic Acid Solutions Under Axenic Conditions, *Plant and Soil*, 44: 448-449, 1976.
- [11] SCHNITZER, 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, Humus Budget*, 206, 63-81, 1992.

- [12] KEKLİKÇİ, Z., Ziraat Yüksek Mühendisi, [www.zgsltd.com/ uploading/pdf/bitkisel\\_uretim.pdf](http://www.zgsltd.com/uploading/pdf/bitkisel_uretim.pdf), 11.04.2010.
- [13] ÇELİK, C., Ziraat Yüksek Mühendisi, İZOTAR A.Ş., Hasad Dergisi, Mayıs, 2003.
- [14] BRANDY, N.C., The Nature and Properties of Soils, Macmillon Publ. Co., pp.75, New York, 1990.
- [15] TAN, K.H., Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies. Marcel and Dekker, pp. 20-25, New York, 2003.
- [16] FORTH, H.D., Fundamental of Soil Science, John Wiley and Sons Inc., New York, 1990.
- [17] SEZER, Y., Toprak Kimyası, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 127, Erzurum, 1991.
- [18] GOLDBERG, E.D., Black Carbon in the Environment, John Wiley and Sons, 198, New York, 1985.
- [19] SHNEOUR, E.A., Oxidation of Graphitic Carbon in Certain Soils Science, 15, 991-992, 1996.
- [20] KULHBUSCH, T.A.J., CRYTZEN, P.J., Toward a Global Estimate of Black Carbon in Residues of Vegetation Fires Representing a Sink of Atmospheric CO<sub>2</sub> and Source of O<sub>2</sub>, Global Biochemistry Cu., 9, 1995.
- [21] ORLOV, D.S., Problems of Identification and Nomenclature of Humic Substances, 4, Pochvovedenie, 48, 1975.
- [22] CURTIS, J., Illustrated Rhododendron: Their Classification Portrayed Through the Artwork of Curtis's Botanical Magazine, Royal Botanical Gardens, Kew, 2001.
- [23] AVCI, M., Ormangülleri (*Rhododendron L.*) ve Türkiye'deki Doğal Yayılışları, İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, 12; 13-29, 2004.
- [24] YEŞİLADA, E., SEZİK, E., HONDA, G., TAKAISHI, Y., TEKEADA, Y. ve TANAKA, T., Traditional Medicine in Turkey IX: Folk Medicine in Northwest Anatolia, Journal of Ethnopharmacology, 64; 195-210, 1999.
- [25] ATALAY, İ., Kayın (*Fagus orientalis Lipsky*) Ormanların Ekolojisi ve Tohum Transferi Yönünden Bölgelere Ayrılması, Orman Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü, Ankara, 1992.

- [26] ÇOLAK, A.H., *Rhododendron ponticum L.* (Mor Çiçekli Ormangülü)'un Silvikültürel Özellikleri Üzerine Araştırmalar, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayınlanmamış Doktora Tezi, İstanbul, 1997.
- [27] ÖZBEK, H., KAYA, Z. ve KAPTAN, H., Toprak Bilimi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No: 73, Adana, 1993.
- [28] PAGE, H.J., Studies on the Carbon and Nitrogen Cycles in the Soil, *J.Agric.Sci.*, 20, 455-459, 1930.
- [29] WAKSMAN, S.A. Humus, 2nd ed., Bailliere, Tindall and Cox., London, 1938.
- [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] UNER, B., Kraft Hamurundan Kalıntı Ligninin İzole Edilmesi ve Yapısı, Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, seri: A, sayı: 2, sayfa: 83-100, 2003.
- [34] BADGER, P.C., Ethanol from Cellulose: A General Review, In: J. Janick and A. Whipkey (Eds.), Trends in New Crops and New Uses, Alexandria, V.A., ASHS Press, pp. 17-21, 2002.
- [35] FILIP, Z., SEMOTAN, J., KUTILEK, M., Thermal and Spectrophotometric Analysis of Some Fungal Melanins and Soil Compounds, *Geoderma*, 15, 131-142, 1976.
- [36] SAIZ-JIMINEX, C., HAIDER, K. and MARTIN, J.P., Anthraquinones and Phenoles as Intermediates in the Formation of Dark Colored Humic Acid-Like Pigments by *Eurotium Ecinulatum*, *Soil Sci.Soc.Am.Proc.*, 39, 649-662, 1975.
- [37] HAIDER, K., MARTIN, J.P., FILIP, Z., FUSTEC-MATHON, E., Humic Substances, Goleman, Wageningen, The Netherlands, 1972.
- [38] WAKSMAN, S.A., Humus, Williams and Wilkins, Baltimore, MD., 40-46, 1932.
- [39] KONONOVA, M.M., Soil Organic Matter, Pergamon Press, Oxford, England, 49-51, 1961.

- [40] FLAÏG, W., BEUTELSPACHER, H., RIETZ, E., Soil Components, Vol. 1. Inorganic Components, Springer-Verlag, New York, 1975.
- [41] CHEFETZ, B., TARCHITZKY, J., DESMUKH, A.P., HATCHER, P.G., CHEN, Y., Structural Characterization of Soil Organic Matter and Humic Acids in Particle-Size Fractions of an Agricultural Soil, Soil Sci.Soc.Am.J., 66, 129-141, 2002.
- [42] HEDGES, J.I., Humic Substances and their Role in the Environment, Wiley Interscience, New York, 1988.
- [43] ZIECHMANN, W., Humic Substances, George August Universitat Göttingen, Wissenschaftsverlag, Mannheim, Germany, 1994.
- [44] 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.
- [45] PING, C.L., MICHAELSON, G.J., MALCOLM, R., Fractionation and Carbon Balance of Soil Organic Matter in Selected Cryic Soils in Alaska., Advance in Soil Science-Soils and Global Change, R., Lal. Boca Raton, F.L., CRC, 307-314, 1995.
- [46] 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.
- [47] MAO, J., Hu, W. and SCHMIDT-ROHR, K., Structure and Elemental Composition of Humic Acids, Comparison of Solid-State <sup>13</sup>C NMR Calculations and Chemical Analyses, Humic Substances Structure, Properties and Uses, RSC, 79, 90, 1998.
- [48] DAI, X.Y., PING, C.L., CANDLER, R., Characterization of Soil Organic Matter Fractions of Tundra Soil Arctic Alasca by Carbon-13 NMR Spectroscopy, 65, Soil sci. Soc. Am.j, 87-93, 2001.
- [49] 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.
- [50] NOVAKOV, T., The Role of Saat and Primary Oxidants in Atmospheric Chemistry, Sci. Total Environ., 36, 1-10, 1984.
- [51] GLASER, B.L., HAVMAIRER and GUGGENBERGER, G., Black Carbon in Soils, The use of Benzencarboxylic Acids as Spesific Markers, Org. Geochem, 29, 811-819, 1998.

- [52] 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, 2002.
- [53] HUNT, M.J., *Petroleum Geochemistry and Geology*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1979.
- [54] DURAND, B., *Kerogen Insoluble Organic Matter from Sedimentary Rocks*, Technip, Paris, 1980.
- [55] CORRELISSEN, 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.
- [56] CHOUDRI, M. B. ve STEVENSON F. J., Chemical and Physico-Chemical Properties of Soil Colloids, *Soil Sci.Soc.Am.Proc.*, 21, 508-513, 1957.
- [57] TATZBER, M., STEMMER, M., SPEIGEL, H., KATZLBERGER, C., HABERHAUER, G., MENTLER, A., GERZABEK, M. H., FTIR-Spectroscopic Characterization of Humic Acids and Humic Fractions Obtained by Advanced NaOH, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Extraction Procedures, *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170, 522-529, 2007.
- [58] SPARKS, D.L., et al., *Methods of Soil Analysis*, Soil Sci.Soc.Am. Book Series:5, Soil Sci.Soc.Am. Madison, WI, 1996.
- [59] KUJAWINSKI, 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, 2002a.
- [60] STENSON, A.C., MARSHALL, A.G., COPPER, W.T., 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.
- [61] 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.
- [62] 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.

- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] KOCABAGLI, N., ALP, M., ACAR, N., KAHRAMAN, R., The Effects of Dietary Humate Supplementation on Broiler Growth and Carcass Yield. *Poult. Sci.* 81: 227-230, 2002.
- [67] WAKSMAN, S.A., Humus: Origin, Chemical Composition, and Importance in Nature. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 40-46, 1938.
- [68] MAJAKOVA, E.F., PROSKURJAKOV, V.A., Proc. 4th International Peat Congress, Ontaniemi, p. 235, 1972.
- [69] DUNCAN, D.A., BODLE, W.W., BANEJERD, D.P., Energy from Biomass and Waste. 5th Symposium, Papers: Institute of Gas Technology, Chicago, pp. 917, 1981.
- [70] SCHMEIDE, K., POMPE, S., BUBNER, M., HEISE, K.H., BERNHARD, G., NITSCHKE, H., Uranium(VI) Sorption onto Phyllite and Selected Minerals in the Presence of Humic acid. *Radiochim. Acta* 88: 723-728, 2000.
- [71] KOIVULA, N., HANNINEN, K., Biodeterioration of Cardboard-Based Liquid Containers Collected for Fibre Reuse. *Chemosphere* 38: 1873-1887, 1999.
- [72] LUBAL, P., SIROKY, D., FETSCH, D., HAVEL, J., The Acidobasic and Complexation Properties of Humic Acids. Study of Complexation of Czech Humic Acids with Metal Ions. *Talanta* 47: 401-412, 1998.
- [73] LUBAL, P., FETSCH, D., SIROKY D., Potentiometric and Spectroscopic Study of Uranyl Complexation with Humic Acids. *Talanta* 51: 977-991, 2000.
- [74] GHABBOUR, E.A., DAVIES, G., GHALI, N.K., MULLIGAN, M.D., The Effect of Temperature on Tight Metal Binding by Peat and Soil Derived Solid Humic Acids. *Canad. J. Soil. Sci.* 81:331-336, 2001.



- [75] BONDIETTI, E., Environmental Migration of Long-Lived Radionuclides. IAEA, Vienna 1982.
- [76] 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.
- [77] GHABBOUR, E.A., DAVIES, G. (Eds.), Humic Substances: Structures, Models and Functions. Based on Proceedings, RSC, Cambridge, p. 401, 2001.
- [78] VERSTRAETE, W., DEVLIEGHER, W., Formation of Nonbioavailable-Organic Residues in Soil: Perspectives for Site Remediation *Biodegradation* 7: 471-485, 1997.
- [79] GREEN, J.B., MANAHAN, S.E., Absorption of Sulphur Dioxide by Sodium Humates. *Fuel* 60: 488-494, 1981.
- [80] SHIN, D., CHUNG, Y., CHOI, Y., Assessment of Disinfection by-Products in Drinking Water in Korea. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 9: 192-199, 1999.
- [81] 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.
- [82] BENZ, M., SCHINK, B., BRUNE, A., Humic Acid Reduction by *Propionibacterium Freudenreichii* and other Fermenting Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4507-4512, 1998.
- [83] 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.
- [84] MUND-HOYM, W.D., The Effect of Salhumin Baths on Rheumatic and Traumatic Joint Diseases. *Med. Welt.* 32: 1378-1381, 1981.
- [85] BRZOSOWSKI, 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.
- [86] 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.
- [87] KLÖCKING, R., Humic Substances in the Global Environment and Implications in Human Health. *Monopoli*, p. 129, 1992.

- [88] GADZHIEVA N.Z., TSOI E.P., TUROVSKAIA S.I., AMMOSOVA, I.M., The Antibacterial Activity of a Humic Preparation Made from Therapeutic Peat mud of the Dzalal Abad Deposit in Kirgizia. *Naucn. Dokl. Vyss. Skoly Biol. Nauki* 10:109-113, 1991.
- [89] ANSORG, R., ROCHUS, W., Studies on the Antimicrobial Effect of Natural and Synthetic Humic Acids. *Arzeimittelforschung* 28:2195-2198, 1978.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] VAN RENSBURG, C.E., DEKKER, J., WEIS, R., SMITH, T.L., VANRENSBURG, J., SCHNEIDER, J., Investigation of the Anti-HIV Properties of Oxihumate. *Chemotherapy* 48: 138-143, 2002.
- [93] JOONE, G.K., DEKKER, J., VAN RENSBURG C.E., Investigation of the Immuno Stimulatory Properties of Oxihumate. *Z. Naturforsch.* 58:263-267, 2003.
- [94] 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.
- [95] CARVALHO, S.I.M., OTERO, M., DUARTE, A.C., SANTOS, E.B.H., Spectroscopic Changes on Fulvic Acids from a Kraft Pulp Mill Effluent Caused by Sun Irradiation, *Chemosphere*, 73, 1845-1852, 2008.
- [96] Peuravuori, J., Pihlaja, K., Molecular Size Distribution and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Anal. Chim. Acta* 337, 133-149, 1997.
- [97] LIU, X., RYAN, D.K., Analysis of Fulvic Acids Using HPLC/UV Coupled to FT-IR Spectroscopy, *Environmental Technology*, 18, 417-424, 1997.
- [98] BADDI, G.A., HAFIDI, M., CEGARRA, J., ALBURQUERQUE, J. A., GONZALVEZ, J., GILARD, V., REVEL, J.C., Characterization of Fulvic Acids by Elemental and Spectroscopic (FTIR and <sup>13</sup>C-NMR) Analyses During Composting of Olive Mill Wastes Plus Straw, *Bioresource Technology*, 93, 285-290, 2004.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Selçuk KARAKAYA, 21.07.1984’de Bilecik ilinin Bozüyük ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bilecik Bozüyük’te tamamladı. 2002 yılında Bozüyük Mustafa Şeker Anadolu Lisesi, Fen Bölümünden mezun oldu. 2003 yılında başladığı Niğde Üniversitesi Kimya bölümünü 2008 yılında bitirdi. 2008 yılında Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.