



**OXADIAZON VE PENDİMETHALİN HERBİSİTLERİNİN MUHTEMEL  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KOMET VE  
MİKRONÜKLEUS TEST SİSTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUBA TAŞCAN

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Aralık, 2017

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OXADIAZON VE PENDİMETHALİN HERBİSİTLERİNİN MUHTEMEL  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KOMET VE MİKRONÜKLEUS TEST  
SİSTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

**TUBA TAŞCAN**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Aralık, 2017**

## TEZ ONAY SAYFASI

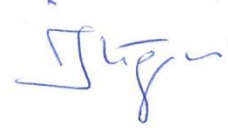
Tuba TAŞCAN tarafından hazırlanan “Oxadiazon ve Pendimethalin Herbisitlerinin Muhtemel Genotoksik Etkilerinin Komet ve Mikronükleus Test Sistemleriyle Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 18/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

**Başkan :** Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK  
Afyon Kocatepe Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi



**Üye :** Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
Afyon Kocatepe Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi



**Üye :** Doç. Dr. Recep LİMAN  
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi



Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun  
...../...../..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim EROL  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

18/12/2017



Tuba TAŞCAN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### OXADIAZON ve PENDİMETHALİN HERBİSİTLERİNİN MUHTEMEL GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KOMET ve MİKRONÜKLEUS TEST SİSTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI

Tuba TAŞCAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Bu çalışmada, tarım alanlarında yüksek verim elde etmek, kaliteyi arttırmak, istenmeyen organizmaları yok etmekte kullanılan ve hedef dışı organizmaları da etkileyebilen herbisitlerden Oxadiazon (OD) ve Pendimethalin (PM) herbisitlerinin *Eisenia hortensis* (*E. hortensis*) türü üzerine muhtemel genotoksik etkileri Komet ve Mikronükleus (MN) test yöntemleri kullanılarak belirlendi. *E. hortensis* sölomasitleriyle yapılan çalışmada Probit analiz yöntemi ile OD herbisitinin LD<sub>50</sub> dozu 0, 255 ppm ve PM herbisitinin LD<sub>50</sub> dozu 0, 243 ppm olarak bulundu. Araştırmada, OD ve PM herbisitlerinin 0,5xLD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> konsantrasyonları, 48 saat süreyle *E. hortensis*'lere uygulandı. Negatif kontrol grubu olarak distile su (dH<sub>2</sub>O) kullanıldı. Komet testi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırılan OD ve PM herbisitlerinin LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> dozlarında, DNA hasar derecesindeki artış anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Aynı zamanda MN oluşumunun da konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür. Bununla birlikte OD herbisiti kontrol grubuna göre 0,5xLD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> dozlarında binükleer hücre oluşumunu anlamlı bir şekilde arttırmıştır. PM herbisitinde binükleer hücre oluşumu konsantrasyon artışına bağlı olarak anlamlı derecede artmıştır. OD ve PM herbisitlerinin Komet ve MN Test yöntemiyle *E. hortensis* sölomasitlerinde, DNA hasarındaki artış istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,05). Tarım alanlarında, solucanlar toprak kalitesinin belirlenmesinde ve ekolojik denge açısından çok önemli organizmalardır. Bu nedenle solucanların, toprağa bilinçsizce uygulanan

kimyasallardan olumsuz etkilenecekleri göz önünde bulundurularak kimyasal kullanımına ve uygulanacak doz miktarına dikkat edilmesi gerekmektedir.

**2017, xi + 73 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Oxadiazon, Pendimethalin, Toprak Solucanı, *Eisenia hortensis*, Pestisit, Genotoksisite, Alkali Komet Yöntemi, Mikronükleus Yöntemi



## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### INVESTIGATION OF POSSIBLE GENOTOXIC EFFECTS OF OXADIAZONE AND PENDIMETHALINE HERBICIDES BY COMET AND MICRONUCLEUS TEST SYSTEMS

Tuba TAŞCAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics Department

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

In this study, possible genotoxic effects of Oxadiazon (OD) and Pendimethalin (PM) herbicides on *Eisenia hortensis* (*E. hortensis*) species from herbicides which are used in agricultural fields to increase quality, to eliminate unwanted organisms and to affect non-target organisms, comet and micronucleus (MN) test methods. In the study conducted with *E. hortensis* coelomocytes, the LD<sub>50</sub> values of OD herbicides were found to be 0, 255 ppm and the LD<sub>50</sub> values of PM herbicide were found to be 0, 243 ppm by Probit analysis method. In the study, concentrations of 0.5xLD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> and 2xLD<sub>50</sub> of OD and PM herbicides were applied to *E. hortensis* for 48 hours. Distilled water (dH<sub>2</sub>O) was used as a negative control group. As a result of the comet test, the increase in the degree of DNA damage was found to be significant ( $p < 0, 05$ ) for the OD and PM herbicides compared with the control group and for the doses LD<sub>50</sub> and 2xLD<sub>50</sub>. At the same time MN formation was also observed to increase due to concentration increase. In PM herbicide, the formation of the binuclear cells has increased significantly due to the increase in concentration. Increase in DNA damage was found statistically important in *E. hortensis* coelomocytes at by Comet and MN Test method of OD and PM herbicides ( $p < 0,05$ ). In agricultural areas, worms are very important organisms in determining soil quality and in terms of ecological balance. For this reason, considering the worms will be adversely affected by the chemicals applied to the soil unconsciously, attention should be paid to the chemical use and the dose amount to be applied.

2017, xi + 73 pages

**Keywords:** Oxadiazon, Pendimethalin, Earth Worm, *Eisenia hortensis*, Pesticide, Genotoxicity, Comet Assay Method, Micronucleus Method





## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın, Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ' ye ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Recep LİMAN' a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca bana destek olan değerli arkadaşlarım Dr. Muhammad MUDDASSİR ALİ' ye ve Neşe TUNA' ya,

Ayrıca bugüne kadar beni her konuda destekleyip güvenen, maddi ve manevi destekleri ile bana g veren ve her daim yanımda olduklarımı hissettiren aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Tuba TAŞCAN  
AFYONKARAHİSAR, 2017

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....	3
2.1 Pestisitler .....	3
2.2 Çalışmada Kullanılan Herbisitler .....	8
2.3 Pestisitlerin Ekolojiye Zararları .....	11
2.4 Toksikite ve Genotoksikite .....	17
2.5 Toksikite Çalışmalarında Toprak Solucanı .....	18
2.5.1 Toprak solucanı.....	18
2.6 Solucanların Ekolojiye Faydaları .....	18
2.7 DNA .....	20
2.7.1 Mutajenite ve Genotoksikite .....	21
2.7.1.1 Genetik Toksikite Testlerinin Kullanım Alanları .....	22
2.8 DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler .....	23
2.8.1 Mutajenite ve Genotoksikite Testleri .....	23
2.8.1.1 Ames Testi.....	23
2.8.1.2 Kromozom Anormalliği (KA) Testi .....	23
2.8.1.3 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi .....	23
2.8.1.4 Mikronükleus (MN) Testi.....	24
2.8.1.5 Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi) .....	26
3. MATERYAL ve METOT .....	30
3.1.1 Kullanılan Test Organizması .....	30
3.1.2 Oxadiazon ve Pendimethalin .....	31
3.1.3 Kullanılan Araç ve Gereçler .....	31

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.2 Metot .....	35
3.2.1 Komet Çalışması.....	35
3.2.2 MN Çalışması .....	39
3.2.3 İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR .....	40
4.1 Komet Testine Ait Bulgular .....	40
4.1.1 Oxadiazon Herbisiti İçin Komet Testi Bulguları.....	40
4.1.2 Pendimethalin Herbisiti İçin Komet Testi Bulguları .....	41
4.2 Mikronükleus Testine Ait Bulgular.....	42
4.2.1 Oxadiazon Herbisiti İçin Mikronükleus Testine Ait Bulgular.....	42
4.2.2 Pendimethalin Herbisiti İçin Mikronükleus Testine Ait Bulgular.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	45
6. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	73

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

CaCO <sub>3</sub>	Kalsiyum Karbonat
CoCl <sub>2</sub>	Kobalt Klorür
dH <sub>2</sub> O	Distile su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
ppm	Milyonda bir kısım çözelti

### Kısaltmalar

---

DDT	Dikloro difenil trikloroethan
DNA	Deoksiribonüklik asit
FAO	Gıda ve tarım örgütü
GSH	Glutasyon
KA	Kromozom anormalliği
KKD	Kardeş kromatid değişimi
MDA	Malondialdehit
MN	Mikronükleus
OD	Oxadiazon
OECD	Ekonomik kalkınma ve işbirliği örgütü
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PM	Pendimethalin
RNA	Ribonükleik asit
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
WHO	Dünya sağlık örgütü
KT	Komet test

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1	Pestisitlerin tabiattaki döngüsü ve insan vücuduna alınımı. ....	4
Şekil 2.2	Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı. ....	7
Şekil 2.3	OD herbisitinin kimyasal yapısı. ....	9
Şekil 2.4	PM herbisitinin kimyasal yapısı. ....	11
Şekil 2.5	Pestisitlerin ekosistemdeki bozunma sürecini gösteren diyagram. ....	13
Şekil 2.6	Pestisitlerin toprak, bitki ve çevre sistemindeki hareketleri. ....	14
Şekil 2.7	MN' nin meydana geliş aşamaları. ....	25
Şekil 2.8	Komet tekniği genel aşamaları. ....	28

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Pestisitlerin sınıflandırılması (Collotta <i>et al.</i> 2013).....	5
Çizelge 4.1 OD herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomasitlerindeki DNA hasar skorları.....	41
Çizelge 4.2 PM herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomasitlerindeki DNA hasar skorları.....	42
Çizelge 4.3 OD herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomasitlerindeki Mikronükleus ve Binükleus Oluşum Frekansları.....	43
Çizelge 4.4 PM herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomasitlerindeki Mikronükleus ve Binükleus Oluşum Frekansları.....	44



## RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Resim 2.1</b> a. Normal hücre, b. Binükleer hücre, c. Binükleer hücrede mikronükleus... 25	
<b>Resim 2.2</b> Komet yöntemi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri..... 29	
<b>Resim 3.1</b> <i>E. hortensis</i> Binoküler Stereo mikroskopta görüntüsü (Orijinal) ..... 31	
<b>Resim 3.2</b> OD herbisitinin <i>E. hortensis</i> ' lere uygulanması..... 36	
<b>Resim 3.3</b> PM herbisitinin <i>E. hortensis</i> ' lere uygulanması..... 37	
<b>Resim 3.4</b> Ex-Buffer muamele edilen <i>E. hortensis</i> . ..... 37	
<b>Resim 3.5</b> Santrifüj sonrası sölomasitler..... 38	
<b>Resim 4.1</b> Herbisit ile muamele edilmiş sölomasit hücrelerinde hasarlı DNA' lar ..... 41	
<b>Resim 4.2</b> <i>E. hortensis</i> sölomasitlerinde MN' li hücre (orijinal). ..... 43	
<b>Resim 4.3</b> <i>E. hortensis</i> sölomasitlerinde binükleer hücre (orijinal). ..... 44	

## 1. GİRİŞ

Pestisitler çok geniş ve yaygın kullanım alanına sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, tarımsal alanda zararlılar ile mücadelede, evlerde haşere ilacı ve ev hayvanlarında veteriner ilacı olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, depolanmış besinlerin bozulmadan korunmasında, ciddi ağaç ölümlerine sebep olan orman zararlılarına karşı ve hastalık taşıyıcı mikroorganizmaları öldürmede kullanılırlar.

Pestisit terimi, insektisit, fungusit, herbisit, rodentisit gibi terimleri içerisine alan geniş bir ifadedir. İnsektisitler, istenmeyen böcekleri, fungusitler mantarları, herbisitler, yabancı bitki ve rodentisitler ise kemirgen öldürücü kimyasallar olarak kullanılmaktadırlar (Sodhi 2005).

Dünya nüfusunun artışının sonucu olarak tarımsal üretimi arttırmak amacı ile zirai ilaçların bilinçsizce kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Dünya' daki karasal ve sucul ekosistemleri ve bu ekosistemlerde yaşayan canlıların yaşamını tehdit eden en önemli sorunlardan biri, zirai mücadelede kullanılan pestisitler ve daha başka kimyasallardır. Sentetik kimyasallar ve pestisitler hedef dışı canlıları olumsuz yönde etkilemekte ve ekosistemin dengesini bozmaktadır (Tan 1995).

Bir ekosisteme uygulanan pestisit yalnızca hedefe alınan zararlıları değil, ekosistemdeki zararlıların popülasyonlarını kısmen baskı altına alan faydalı canlıları da direkt ya da indirekt olarak etkilemektedir. Böylece doğal denge bozulmakta, mevcut tür çeşitliliği azalmakta ve daha önceden problem teşkil etmeyen yeni zararlılar ortaya çıkmaktadır. Böyle bir durum yeni zararlılara karşı ek ilaçlamalar yapma gerekliliğini doğurmaktadır. Örnek olarak ABD'de pamukta, pamuk böceğine (*Anthonomus grandis*) karşı uzun seneler yapılan ilaçlamaların ardından önceki yıllarda düşük yoğunlukta bulunan ve mücadeleye gereksinim duyulmayan yeşilkurt (*Heliothis armigera*) türlerinin de zararlı olmaya başladıkları anlaşılacak bu canlılara karşı da ek olarak birkaç kez ilaçlama işlemi yapılmak zorunda kalınmıştır (Yıldız *et al.* 2005).

Çevre kirliliği toprak solucanlarının verimliliğinin azalmasına neden olmakta ve ekolojik fonksiyonların da azalmasına yol açmaktadır. Toprak solucanları, genellikle



topraktaki kirlilik sınırına bağlı olarak toprağın yapısı hakkında bilgi verici olarak kabul edilirler (Belotti 1998, Spurgeon and Hopkin 1999).

Ekotoksikolojik açıdan toprak solucanlarının bir başka gerekliliği ise, omurgalı hayvanların besin kaynağı olmaları münasebetiyle, kirliliği bu hayvanlara ve dolayısıyla besin zincirindeki diğer tüm canlılara taşımaları sebebiyledir (Ma and Talmage 2001).

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen Komet Testi hücrelerdeki DNA hasarının tespiti için hassas ve hızlı bir testtir. Bu test, biyomedikal araştırmalarda, çevresel biyolojik izleme çalışmaları ve genotoksisite testlerinde önemli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. DNA' da meydana gelen hasardan dolayı bireyler, türler ve ekosistemlerde önemli sonuçlara sebebiyet verdiği için solucan sağlığının değerlendirilmesinde de önemli bir parametre olarak görülür (Casab *et al.* 2007).

Hem MN hemde Komet Testi DNA'nın biyolojik belirteçleri olarak önerilir. Komet testi, solucan gibi birçok canlıda DNA hasarını ölçmek için kullanılır. Genotoksisite değerlendirmelerinde çok düşük seviyeli DNA hasarını da belirler ((Tice *et al.* 2000; Muangphra and Gooneratne 2011a, b; Muangphra *et al.* 2012). MN yöntemi genotoksisite testlerinde insan biyolojik izlem testlerindeki anomalilerde binükleer ve MN frekanslarında kromozom bozukluklarında ve sitokinez inhibisyonunda esaslı bir testtir ( (Muangphra and Gooneratne 2011a, b; Muangphra *et al.* 2012).

Tarım alanlarında bulunan solucanların, toprak içerisinde çok önemli toprak canlıları oldukları ekosistemin dengesini sürdürmede, besin elementlerin ve ağır metallerinin biyo-yarayışlılığında önemli rol üstlendiklerine literatür bigilerinde rastlamaktayız. *E. hortensis'* te tarım alanlarında bulunan bir solucan türü olduğundan ve ortamlarda bulunan pestisitlerden olumsuz etkilenebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada tarım alanlarında sıkça kullanılan OD ve PM herbisitlerinin Alkali Komet ve Mikronükleus Test Yöntemleriyle *E. hortensis* sölomasit DNA' sı üzerine genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

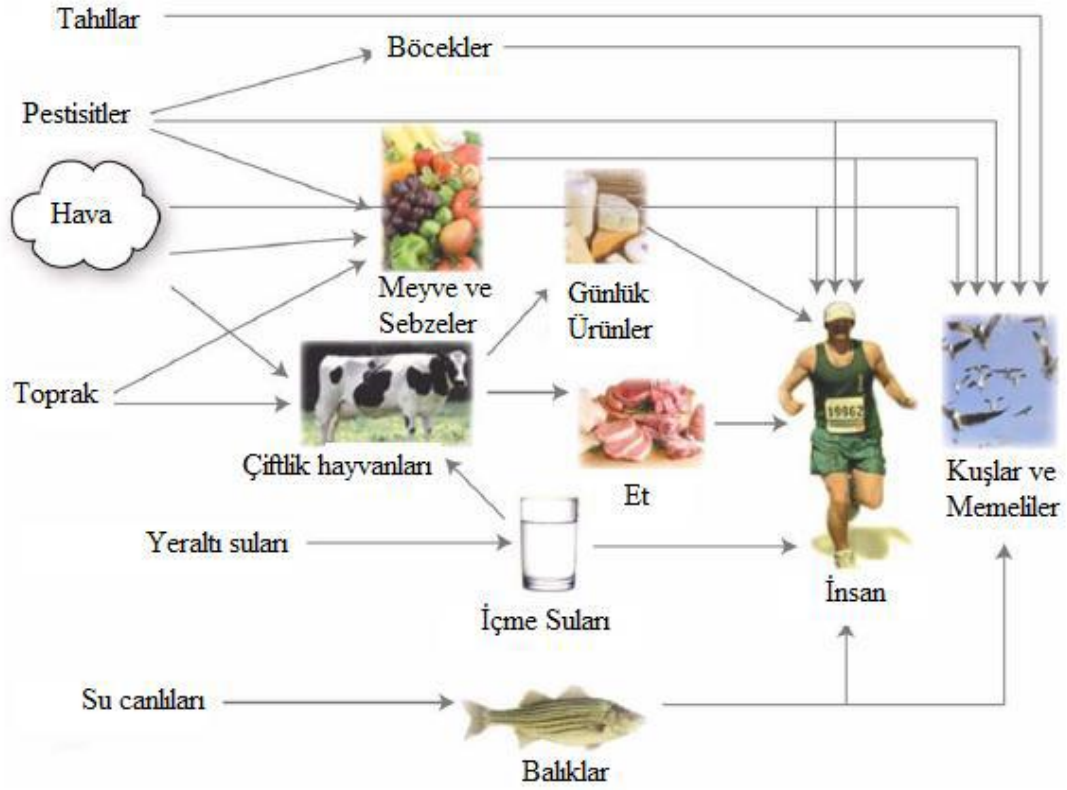
### 2.1 Pestisitler

Pestisitler, insan ve çevre sağlığına olan zararları birçok bilimsel çalışma ile desteklenmiş olmasına karşın, tüm dnyuda ve ülkemizde, tüketimi gün geçtikçe daha da fazla artmakta olan bitki ve diğer zararlı organizmalara karşı kullanılan kimyasal ürünlerdir. Bitki koruma ürünlerinin belirlenen uygun olmayan doz ve zamanlarda kullanımı ekolojik dengede ve tarım ürünlerinde birçok sıkıntıyı da beraberinde getirmektedir (Gazioğlu-şensoy 2017).

Pestisitler besin maddelerinin üretilmesi ve depolanması esnasında besin kalitesini düşüren ve bitkilere zarar veren, insanlarda direk hastalık sebebi olan veya hastalık etmenlerinin transferine neden olan böcekleri, mikroorganizmaları, yumuşakçaları, kuşları, balıkları, solucanları, memelileri, bitki patojenlerini ve istenmeyen otları ayırmak, tesir etme derecesini indirgemek, çoğalmalarına ket vurmak ortadan kaldırmak için kullanılan karışık veya katışıksız maddeler olarak ifade edilmektedir (Arslan 2006, EPA 2006).

Pestisitlerin kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. M.Ö. 1500' lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına muhalif insektisitlerin hazırlanışına ait bigilere rastlanmaktadır. 19.yy' da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940' lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan istifade edilmiştir. DDT (Müller 1939 and Perkins 1978) ve diğer bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir (Fenton 2002).

Pestisitlerin doğada geç kaybolması veya tüketicilerce yanlış kullanımları sonucu; su, toprak, hava ve ürünlerin bünyesinde kirlenmelerin gözlenmesine sebep olur (Navalón *et al.* 2002). Tarımda pestisit kullanımının kaçınılmaz olması, hedef dışı organizmaları (insanlar dahil) bu kimyasallara maruz bırakmaktadır. Bazı türlerde, topluluklarda ve bir bütün olarak ekosistemlerde istenmeyen yan etkiler meydana gelebilir (Pimentel 1995). (Resim 2.1).



Şekil 2.1 Pestisitlerin tabiattaki döngüsü ve insan vücuduna alınımı (WHO 2001).

Artan Dünya nüfusuna paralel olarak toprak mahsüllerine olan ilgi artmış ve buna bağlı olarak kimyasallara (pestisit) karşı bir gereksinim duyulmuştur. Genel olarak pestisitlerin fazlaca zehir etkisi bulunduğu için dolayı çevredeki dozları takip edilmeli. “Dünya Pestisit İzleme Enstitüsü verilerine göre 700’den fazla farklı organik madde, belirli pestisitler ve onların parçalanması sonucu oluşan ürünler, sürfaktanlar, fenoller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar çevrede bulunmakta ve 70000 kadar sentetik kimyasal hergün kullanılmakta ayrıca bunlara her yıl 500 ile 1000 arasında yeni kimyasal eklenmektedir” (Gascon *et al.* 1997).

Pestisitler insanlarda; geçici ve kalıcı toksisiteye, hücrelerin metaztas olmasına, immün sistemde aksaklıklara, sinir sisteminin hasar görmesine, algıda sıkıntı çekmeye ve hafıza kaybına, enzim sisteminde düzensizliklere, hücre içi DNA’larda kalıcı hasarlara sebebiyet vermektedir (Wagner 1989, Dolapsakis *et al.* 2001, Sarabia 2009).

Günümüzde, bilhassa ekonomik önem arzeden bitkilerin değeri gün geçtikçe artış göstermekte olup, bu bitkiler ile ilgili yapılan çalışmalar da fazlaşmaktadır. En önemlisi de artan Dünya nüfusuna eş bir değerde tarım alanlarından elde edilen ürünlerin kalitesi ve en yüksek seviyede sağlıklı ürün eldesi adına yapılan araştırmalardır. Bunların başında da dünya nüfusunun artışına paralel olarak, tarım alanlarından maksimum düzeyde sağlıklı ürün alınımının sağlanabilmesi yönündeki çalışmalar gelmektedir (Topal 2003).

Pestisitler tesir etkiledikleri canlı gruplarına göre farklı isimlerle adlandırılırlar. Bunlar: Etkili Madde Gruplarına Göre Pestisitler:

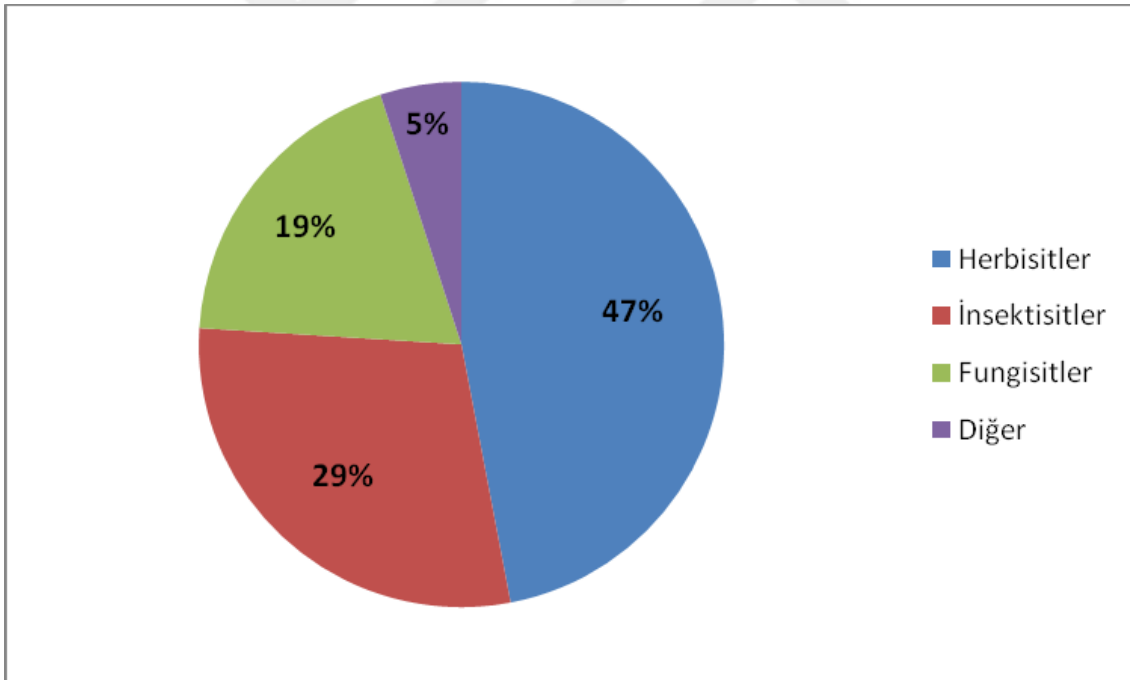
**Çizelge 2.1** Pestisitlerin sınıflandırılması (Collotta *et al.* 2013).

<i>İnsektisitler:</i> Böceklerle mücadelede kullanılırlar.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klorlanmış Hidrokarbonlar (Organik Klorlular)</li> <li>• Organik Fosforlular</li> <li>• Karbamatlılar</li> <li>• Sentetik Pyretroidler</li> <li>• Benzoil Üreler</li> <li>• Bakteriler</li> <li>• Diğerleri</li> </ul>
<i>Akarisitler:</i> Akarlarla mücadelede kullanılırlar.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Halojenliler</li> <li>• Amin ve Hidrazin Türevleri</li> <li>• Dinitrofenol Esterler</li> <li>• Kükürtlüler</li> <li>• Organik Kalaylılar</li> </ul>
<i>Kış Mücadele İlaçları ve Yazlık Yağlar</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bitkisel, hayvansal, katran ve petrol yağları</li> </ul>
<i>Nemasitler, Fumigantlar ve Toprak fumigantları</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nematod (kurt) adı verilen toprak altı zararlıları ile mücadelede kullanılırlar.</li> </ul>
<i>Rodentisitler ve Molluskisitler</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kemirgenlerle mücadelede kullanılırlar.</li> </ul>

**Çizelge 2.1** (Devam) Pestisitlerin sınıflandırılması (Collotta *et al.* 2013).

<i>Fungisitler:</i> Mantarlarla mücadelede kullanılırlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bakırlılar</li><li>• Dikarboksimidler</li><li>• Dithiokarbamatlar</li><li>• Kalaylılar</li><li>• Kükürtlüler</li><li>• Nitro bileşikler</li><li>• Amin ve Amidler</li><li>• Benzimidazoller</li><li>• Morfolinler</li><li>• Pirimidinler</li><li>• İmidazoller ve Triazoller</li></ul>
<i>Herbisitler:</i> Yabani otlarla mücadelede kullanılırlar.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fenoksi Bileşikler</li><li>• Karbamatlar</li><li>• Üre Bileşikleri</li><li>• Sülfonil Üreler</li><li>• Anilinler</li><li>• Amidler ve Anilidler</li><li>• Benzoik Asitler</li><li>• Pikolinik Asitler</li><li>• Organik Halojen Asitler</li><li>• Diazinler</li><li>• Triazinler</li><li>• Benzonitriller</li><li>• Siklohekzonlar</li><li>• İmidazolinonlar</li><li>• Triazoller</li><li>• Okzadiazoller</li><li>• Amino Fosfonatlar</li><li>• Diğerleri</li></ul>

Dünyada tarım ilacı üretimi 3 milyon ton, senelik satış tutarı ise 25-30 milyar \$ dolaylarındadır. Dünya pestisit pazarında tonaj olarak senede % 1 gibi bir artış göstereceği düşünülmektedir (Ayaz ve Yurttagül 2008). Zararlı ot ilaçları zirai ilaçlar içerisinde % 47' lik bir marjla ilk sıradadır. Hemen akabinde %29' luk böcek ilaçları gelmektedir. Pestisitlerin geniş kullanım alanına sahip olup halk tarafından da en çok kullanılan çeşidi herbisitlerdir. Herbisitler tarımsal imal esnasında istenilmeyen bitkilerin büyümelerini ve artmalarını denetlemek için planlanmış bileşiklerdir (Blair Axelson *at al.* 1990). Tarım alanında hangi tür herbisit kullanılacağına tesir mekanizmasına bakılarak karar verilir. Yabancı ot ilaçlarının mitozu, fotosentezi, amino asit sentezini ve lipid biyosentezini durdurma gibi etkileri bulunmaktadır (Tu *at al.* 2001). Diğer yandan yüksek miktarda herbisit kullanımının kromozomal anormallikler ve mikronükleus oluşumuna sebebiyet vermek gibi mitotik bozulmalarla sonuçlandığı da bilinmektedir (Tosun *at al.* 2000). (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2** Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı (Tiryaki *et al.* 2010).

Çok fazla ve bilinçsiz olarak tasarruf edilen pestisit kullanımı ekolojik kirliliğe ve insan sağlığı açısından birçok sıkıntının oluşmasına sebep olmuştur ve kullanım sonucu artan pestisit tüketimi çevre kirlenmesi ve insan sağlığı açısından çeşitli problemlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Delen 2008). Bu problemler aşağıda sıralanmıştır.

- a) Pestisitler; kanser, teratojenite, sinir sistemi hasarları ve uzun sürede meydana gelen, istenmeyen etkilere sebep olurlar,
- b) Pestisitler ve parçalanma ürünleri toksik maddeleri bulundurlar,
- c) Parçalanma ürünlerinden bazıları asıl pestisitten daha toksik ve devamlıdır,
- d) Uygulanan pestisite ve uygulama şartlarına göre, çevre kirliliğine sebebiyet vermektedir,
- e) Buharlaşıma oranı yüksek olanlar soluduğumuz havanın kalitesini düşürmektedir,
- f) Çok fazla tüketimi sonucunda organizmalarda kimyasallara karşı direnç meydana gelmekte ve pestisit kullanımının amacı dışına çıkmaktadır,
- g) Hedefe alınan ve alınmayan zararlıların tabii düşmanlarını ve yararlı canlıları da yok ederek yeni istilacı türleri meydana getirmektedir.

## 2.2 Çalışmada Kullanılan Herbisitler

### a. Oxadiazon

**IUPAC Adı:** 5-*tert*-butyl-3-(2,4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-one

**Formül:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Yoğunluk:** 1,26 g/cm

**Molar kütle:** 345,221 g/mol

**Cas No:** 19666-30-9

**Form:** EC(Emülsiyon Konsantre)

**Renk:** Şeffaf

**Koku:** Karakteristik kokulu

**pH(%10):** 4-7

### Toksikolojik Özellikler

Solunduğunda ve cilt ile teması halinde sağlığa zararlıdır.

LD<sub>50</sub> oral sıçan: > 5000 mg/kg

LD<sub>50</sub> deri sıçan: >2000 mg/kg

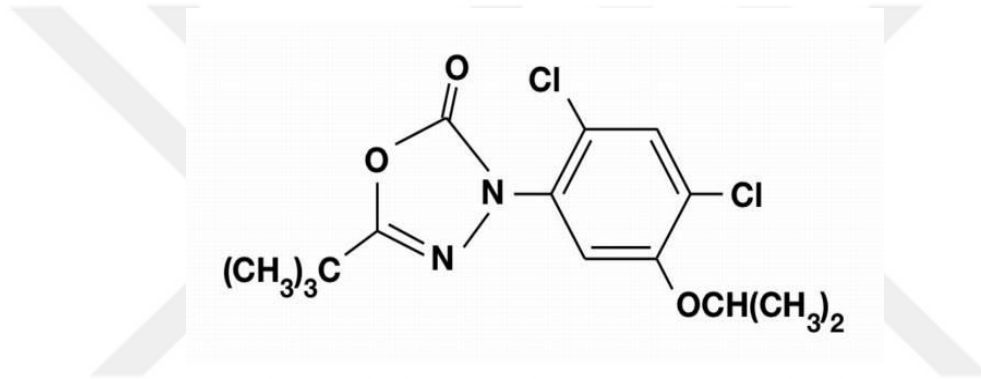
LC<sub>50</sub> solunum sıçan: > 2,77 mg/l /4 saat

Mallard Duck oral LD<sub>50</sub>: > 1000 mg/kg

Rainbow Trout LC<sub>50</sub> (96 saat): 1,2 mg/l

*Daphnia* EC<sub>50</sub> (48 saat): > 2,4 mg/l

Alg EC<sub>50</sub> : 6-3000 µg/l



Şekil 2.3 OD herbisitinin kimyasal yapısı.

Tek yıllık çift çenekli ve geniş yapraklı istenmeyen otlarda çıkış öncesi ve çıkış sonrası tesirlidir. OD soya fasulyesi, pirinç, süs bitkileri, meyve bahçesi, patates, soğan, ayçiçeği ve çim üretim alanlarında kullanılır. Biyolojik maddelerde herbisit kalıntı düzeylerinin belirlenmesi ekoloji ve toplum refahı açısından gereklidir. Belirlenmiş olan OD konsantrasyonlarını ihtiva eden yiyeceklerden, yemlerden, sığır ya da kuşlardan örnek alınması gerekmektedir. Rh6ne-Poulenc araştırmacıları, sıçanlarda ve köpeklerde OD metabolizmasını incelemişlerdir (Boesh *et al.* 1974).

OD toprak kolloidleri tarafından etkili bir biçimde soğurulur. Toprakta yarılanma ömrü 60 gündür, LD<sub>50</sub>: 5000 mg/kg (ppm)' dir. OD etkisini PPO (Proroporphyrinogen Oxidase) enzimini etkileyerek, hücre membranlarında dekompozisyona sebep olur (Lingenfelter and Hartwig 2003).



## **b. Pendimethalin**

**IUPAC Adı:** 3,4-dimetil-2,6-dinitro-N-pentan-3-yl-anilin

**Formül:** C<sub>13</sub> H<sub>19</sub>, N<sub>3</sub> O<sub>4</sub>

**Yoğunluk:** 0,950–1,050 gr/cm<sup>3</sup> (20°C)

**Çözünürlük:** Çoğu organik solventte çözünür

**Moleküler ağırlık:** 281.312 g / mol

**Cas No:** 40487-42-1

**Form:** EC(Emülsiyon konsatre)

**Renk:** Turuncu-sarı bir kristaldir. Aşındırıcı değildir. Yabancı ot ilacı olarak kullanılır.

**Koku:** Karakteristik kokulu

**pH(%10):** 5-7

### **Toksikolojik Özellikler**

LD<sub>50</sub> oral sıçan: 1250 mg/kg

LD<sub>50</sub> deri tavşan: >2000 mg/kg

LC<sub>50</sub> solunum sıçan: >320 mg/l

Deri teması: Tahriş edici değildir (tavşan)

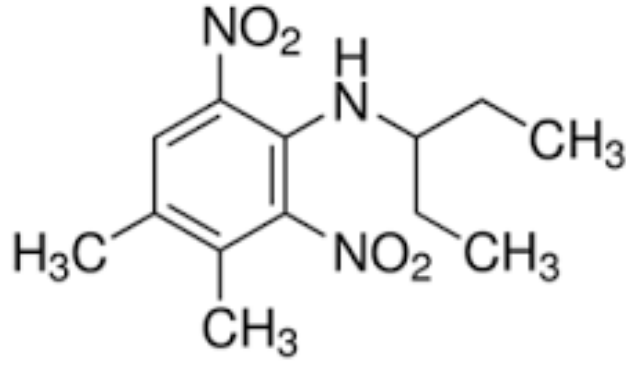
Göz teması: Tahriş edici değildir (tavşan)

Cilt hassasiyeti: Bilinmiyor.

Mallard Duck LC<sub>50</sub> : 1421 mg/kg

Rainbow Trout LC<sub>50</sub> (96 saat): 0,14mg/l

*Daphnia* EC<sub>50</sub> (48saat) : 0,28 mg/l



Şekil 2.4 PM herbisitinin kimyasal yapısı.

PM, dinitroanilin türevi, bitkinin kök ve yaprakları tarafından absorplanan seçici bir herbisit bileşiktir. Bir yıllık ve geniş yapraklı yabancı, zararlı otları kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre bölünmesini ve devamlılığını inhibe eder. Bitkilerin topraktan çıkmalarını takiben filizlenme aşamasından kısa sürede ölmelerine neden olur. Tahıl, soğan, pırasa, sarımsak, rezene, mısır, darı, pirinç, soya, fıstık, havuç, bezelye, bakla, lale, patates, domates, pamuk, elma, armut, ayva, sert çekirdekli meyveler, çilek, böğürtlen, ahududu, limon, portakal, mandalina, greylfurt, patlıcan, kabak, domates, ay çiçeği ve tütündeki çok sayıda yıllık zararlı otların kontrolü için kullanılır (US EPA 1997, Guan *et al.* 1998).

Çıkış öncesi dar ve geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmesi bitkilerin mikrotübül yapısını etkilemektedir. PM etkisini yabancı otların kök ve gövdelerinin büyümesini önleyerek gösterir (Lingenfelter and Hartwig 2003). Meyve bahçeleri dahil olmak üzere çoğu kültür bitkilerinde kullanılan bu herbisit aynı zamanda tarım yapılmayan alanlarda da kullanılmaktadır (Pluntke 2004).

### 2.3 Pestisitlerin Ekolojiye Zararları

Pestisitlerin hepsi karbon, hidrojen ve klor ihtiva ettiklerinden klorlu hidrokarbonlar diye isimlendirilirler. Geniş manada pestisitlerin doğada uzun zaman bozulmadan durabilmeleri, yalnızca hedefe alınan organizmaları ayırt etmeyip başka organizmalara da zarar verip besin ağında birikerek faydalı olan organizmalarında yok olmasında rol oynar ve ekolojik dengenin bozulup faydalı türlerin ortadan kalkmasına neden

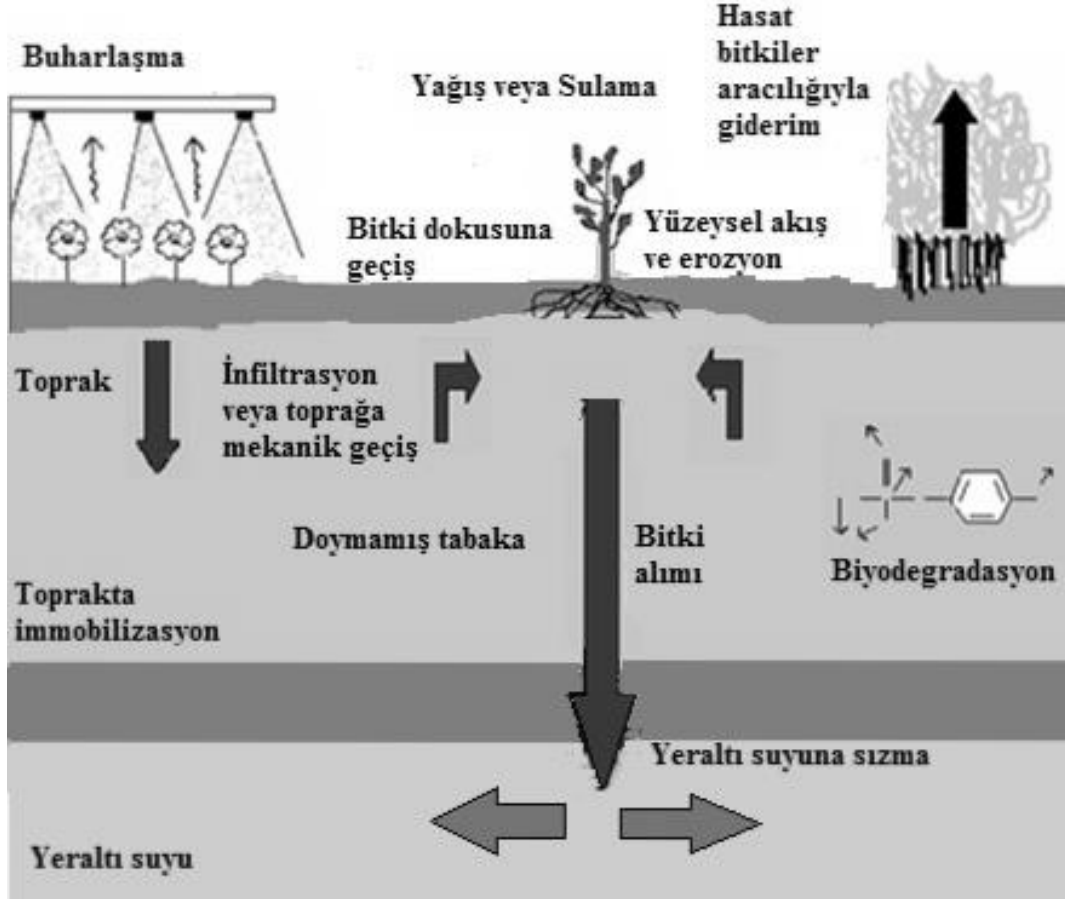
olmaktadırlar. Ekolojinin dengesinin korunması yönünde kimyasalların istenilmeyen etkileriyle alakalı bilgi verilmektedir (Chen *et al.* 2009).

Pestisitlerin canlılara olan etkileri ilk olarak, 1948 ile 1951 senelerinde insan bedeninde organik klorlu pestisit izlerine rastlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Pestisitlerin bir kısmı toksik olarak hasar vermezken bir kısmı ise kanserojen olup, sinir sistemini etkilediği, mutasyonlara sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. Pestisit izlerinin temel nedeni gıdalardır. Bu sebeple 1960 senesinde FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü), Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi'ni oluşturmuşlardır. Komitenin yapmış olduğu araştırmalar neticesinde, gıdalarda ihtiva etmesi uygun görülen en yüksek iz miktarları belirlenmiştir. Zirai pestisit tasarrufunda, dünya genelinde uygun görülen en yüksek pestisit düzeyi 0,1 µg /l' dir (Denizeri 2001). 18. yüzyılda pestisitler tasarruf edilmeye başlanmış fakat kimyasal pestisitler 19. yüzyılın sonlarında türemiştir (Şevken 2009).

Pestisitler zirai mahsullerin imalinde fazlaca randıman alınması adına zararlı canlıların yok edilmesinde fazlaca etkilidir. Tarıma kazandırdığı faydanın yanı sıra sarfedildiği alanlarda canlı yaşamını tehlikeye sokmaktadır. Toksik özellikleri sebebiyle hedefe alınmayan canlıları da etkileyerek beklenmeyen tahribatlara yol açmaktadır. Ayrıca sarfedildikleri alanlarda daimi olarak kalmaları parçalanmalarının yıllarca devam etmesi, hayat döngüsü ile uzaklara transfer olması büyük sıkıntılara sebebiyet vermektedir. Böylece o muhitte, suda ve gıdalarda birikmesi önemli bir sıkıntıdır (Ongley 1996). Zirai pestisitlerin % 14 - 80' i toprağa tatbik edilmektedir (Denizeri 2001). Çok fazla herbisit toprakta yaşayan canlılara zarar verici etkilerinin olduğu tayin edilmiştir (Eijsackers 1980).

Pestisitler hava, toprak, su gibi değişik platformlarda devamlı olarak intikal eden ve bir hayli karmaşık tutuma ehildirler (Kerle *et al.* 2007). Pestisitler uzunca zaman tahrip olmadan kalmalarının yanı sıra farklı alanlara da transfer olabilmektedir. İstifade edilen bölgelerden daha fazla olarak uzak bölge sularında saptanması, organoklorlu bir pestisit olan DDT'nin dünyanın her yerine ulaşmış olması, yüzeysel sularda ve balıklarda saptanması (Kolpin ve ark. 1998), kullanımına izin verilmeyen çok fazla organoklorlu

pestisitlerin 20 sene sonra dahi yüzeyel sularda mevcut olması (Arias-Estevez *et al.* 2008), bu pestisitlerin senelerce ekosistemde değişmeden tesirinin hala sürdüğünün bir kanıtıdır (Şekil 2. 5).



Şekil 2.5 Pestisitlerin ekosistemdeki bozunma sürecini gösteren diyagram (Pierzynski *et al.* 1994).

Zirai alanlarda, yer altı su kaynaklarının, tüketilen zirai ilaçlarca kirletilmesi önemli çevre problemlerine yol açmaktadır. Bilhassa yakın zamanlarda zirai ilaç tüketimindeki aşırı talep problemin çok fazlaca artmasına sebebiyet vermektedir (Triegel and Guo 1994).

Uygun olan pestisit sadece hedefe alınan canlıyı etkileyen, daimi olmayan, çevreye zarar vermeyen kimyasal madde olarak ifade edilebilir. Çok fazla pestisit hedefe alınmayan canlılarda direk toksik etkilere ehil olmamakla beraber, ekosistemde transfer olup zarar verici etkiler doğurabilmektedir (Yıldız *et al.* 2005).

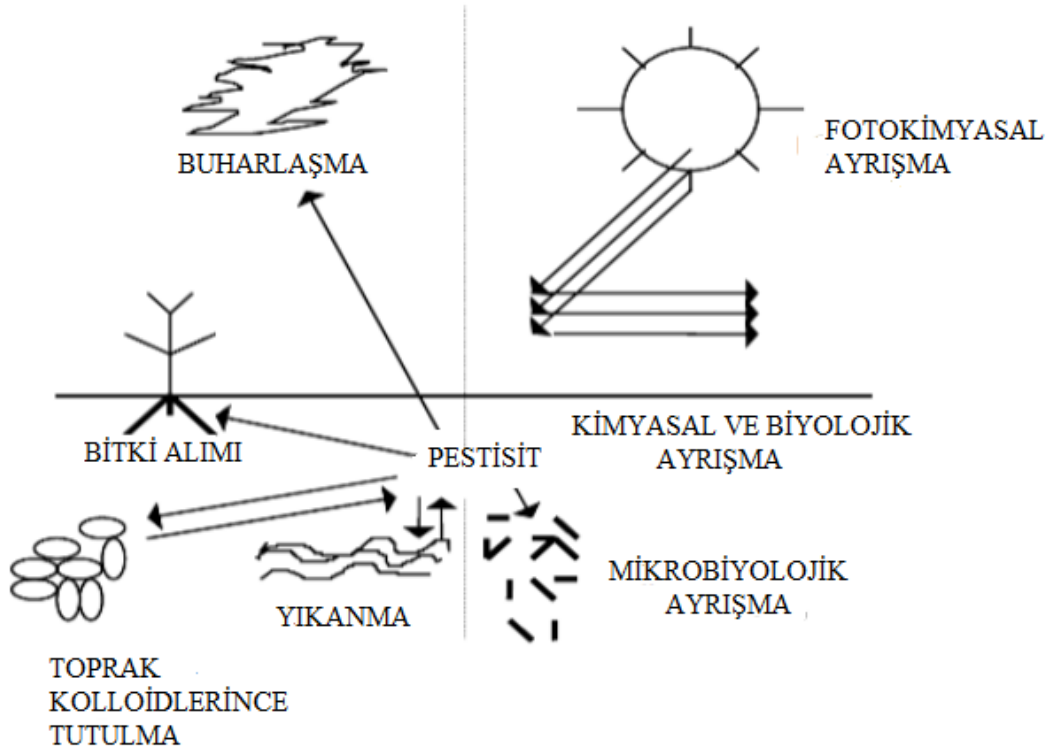
Pestisitlerin kirliliğe sebep olma şekilleri;

- Yüze ve yeraltı sularına doğrudan bulaşma
- Toprağa karışma
- Hedef dışı canlılara direkt bulaşma
- Hedef dışı canlılara iz veya devamlı bileşikler sebebiyle bulaşması biçiminde ifade edilebilir (Yıldız *et al.* 2005).

Pestisitlerin toprak içerisindeki devamlılığı, pestisit kimyasal yapısı, toprak yapısı ve çevrenin durumuna göre değişiklik göstermektedir. Pestisitler toprağa iki şekilde nüfuz eder;

a- Ayrışıp, drenaj sularıyla birleşerek sürüklenmesi

b- Mikroorganizmaların biyokimyasal etkileri neticesinde parçalanma ve oksidasyonla dekompozisyon olarak parçalanabilir bileşikler meydana getirerek karbon gazı ve amonyak çıkarması ile basit mineral yapıya dönüşmesi şeklindedir (Öztürk 1997) (Şekil 2. 6).



Şekil 2.6 Pestisitlerin toprak, bitki ve çevre sistemindeki hareketleri (Anonim 2005).

Ekosistemin sürekliliği, besin ağındaki süreklilik ile alakalıdır. Besin ağı vasıtasıyla bütün türlerin popülasyonlarının sağlıklı olması besin ağındaki diğer türlerinde başarısının artmasını sağlar (Susan *et al.* 1999).

Pestisit kullanımının % 0.015-6. 0' sı hedef organizmaya etki etmekte, geriye kalan % 94-99. 9' luk büyük pay ise agroekosistemde hedefe alınmayan canlıların ve toprağın bünyesine geçmektedir. Doğal ekosistemlere taşınma ve akıntı yoluyla da kimyasal kirleticiler şeklinde sulara bulaşmaktadır (Yıldız *et al.* 2009).

Pestisitler sarfedildikleri bölgelere zarar verdikleri gibi, biyolojik ve fiziksel yollarla çok uzak bölgelere kadar transfer olmaktadır. Bilhassa doğada parçalanma hızları yavaş olanlar ve lipide dağılanlar biyoekosistemlerde toplanarak bütün organizmalar adına sıkıntı oluşturmaktadır (Vural 2005).

Topraktaki kimyevi maddelerin yaşama alanlarına olan etkilerini inceleyen ve çoğununda pestisitlerin agroekosistemlerde kullanımlarıyla alakalıdır. Kimyevi zararlılarla alakalı daha geniş ve kapsamlı bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır (Edwards *et al.* 1998, Edwards *et al.* 1996, Morgan and Knacker 1994). Pestisitlerin doğada hızlı bozunmaması veya tarım çalışanlarınca uygun biçimde kullanılmamaları sonucunda ekosistemin kirlenmesine sebep olmaktadır (Navalón *et al.* 2002).

Tarımsal mücadelede kullanılan ilaçların dozu, bitkinin fenolojik yapısı ve bitkilerin sıklığı ile alakalı olarak %14-80'nin toprağa geçtiği bilgisi verilmekte (Coushee 1960, Cilgi and Jepson 1992). Toprak mikroflorasını meydana getiren algler, aktinomisetler, funguslar, toprak solucanları, örümcek gibi canlıların hepsi toprağın fiziksel yapısını ayarlayıp ayrıştırma işlemlerini gerçekleştirerek toprağın randımanının artmasında görev alırlar (Akalin 1968). Türkiye'de pestisitlerin toprak canlıları üzerine tesir etmeleri gibi konular pestisit sınıfları şeklinde araştırılmıştır (Soran 1980, Sezgin 1984).

Toprak içerisinde bulunan canlılar toprağın yapısını ayarlarlar, yok edilmeleri sonucunda topraktaki düzen yok olur. Pestisitler, topraktaki canlıların etkinlikleri neticesinde bozunarak zarar vermeyen şekillere dönüşebilmekte, bazı durumlarda ise

mikroorganizmaların çevreye faydalı hareketleri önlenmektedir. Örneğin; pestisitler toprağın rantabilitesini arttırmada çok önemli görevi olan solucanların yok edilmesine sebebiyet vermektedir. Pestisitler, mikrobiyal canlı topluluğunun etkinliğini direk ya da indirekt etkileyebilirler. Pestisitler, etkisi altına aldığı bitkiler, hayvanlar ve diğer canlılar düzenlerinin yıkılmasıyla yapılarında değişiklik meydana gelmesine sebebiyet verebilmektedir. Örneğin, bitkilerde uygulanan sentetik pestisitlerin yaprakların stomalarında hasarlara, mezofil dokularında farklılaşmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Tort 2004).

İdeal bir pestisit; hedefe alınan organizmaya özgü olmalı, hiçbir canlıya zarar vermemeli, uygun fiyatlı olmalı, basitçe uygulanabilmeli, çok rahat toksik olmayan maddelere dönüşebilmeli ve hasar verici etkileri yok edilebilmelidir (Şevken 2009). Pestisitler, yükseltgenme özelliğine sahiptirler, bu özellikleriyle hücre zarındaki lipitleri, proteinleri ve DNA' yı oksitleyebilmektedirler. Hücre zarında bulunan lipitlerin oksidasyonu lipitlerin peroksidasyonuna sebebiyet verip, hücre zarının geçirgenliğini sekteye uğratarak hücre metabolizmasını ve görünüşünü negatif yönde etkilemektedirler (Harte *et al.* 1991).

Birçok çalışmacı, pestisitlerin mutajenik ve karsinojenik özelliklerinin olduğunu saptamıştır (Smaka-Kincl *et al.* 1996; Chandra *et al.* 2005). Bolognesi ve Morasso (2000), kullandıkları pestisitlerin (sentetik pestisit) %59' unun genlerde değişime, %83'ünün kromozomal bozukluklara ve %71' inin DNA hasarına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Özet olarak; pestisitlerin kullanılmaları ile ortaya sorunlar çıkmaktadır. Bu sorunlar, toksikologları, diğer yandan direk olarak insanlar üzerinde sistemik ve özel toksisiteleri; diğer yandan ise doğadaki etkileşimler neticesinde diğer canlılara ve insanlara olan zararları; ekolojik denge üzerindeki etkileri bakımından ilgilendirmektedir (Vural 2005).

## 2.4 Toksisite ve Genotoksisite

Toksisite, bir maddenin veya canlının biyolojik sistemi üzerinde zararlı (zehirleyici) etkisi olarak ifade edilebilir. Toksik (zehirleyici) özelliğe sahip olan maddeye toksik madde ya da toksikant denir. Doğal ortamlarda mevcut olan birçok madde, fazla miktarda bulunduğu toksik etki oluşturabilir (Ecobichon 1997). Bir maddenin toksik etki yaratması o maddenin dozuna uygulama saatine ve organizmaya hangi yolla alındığına bağlıdır. Toksik etkinin meydana geldiği hücrelerde çok fazla biyokimyasal değişimlerin yanı sıra ölümler de sonuçlanabilir. Kimyasal maddelerin bir sonucu olarak meydana gelen bu etkilerin giderilebilmesi adına toksikolojik testlere gerek vardır. Bu testler sürece bağlı olarak farklı sınıflara ayrılırlar (Saygı 2003). Buna göre;

Akut toksisite testleri: Kimyasal maddeye maruz bırakıldıktan çok az zaman sonra oluşan değişiklikleri incelemek için kullanılan testlerdir. Bu testin maksadı, kimyevi bir maddeyle etkileşimi neticesinde meydana gelebilecek toksisiteyi, letaliteyi tayin etmektir (Saygı 2003). Akut toksisite testlerinde etkinlik gösteren bir hayli etmen mevcuttur. İlk sırayı ise deney hayvanlarının türü, cinsiyetleri, kimyasal maddelerin alınış yolu, çözücünün etkinliği ve sıcaklık gibi faktörler almaktadır (Dökmeci 1994). Deneysel açıdan kimyasal bir maddenin bir tek konsantrasyonunun çalışma yapılan deney hayvanlarının %50' sinin ölümüyle sonuçlanan ve istatistiksel olarak belirtilen doz medyan letal doz (LD<sub>50</sub>) olarak ifade edilir (OECD 1984). LD<sub>50</sub> çoğunlukla sarfedilen kimyevi maddelerin toksik etkilerini kıyaslamak ve sınıflandırmak maksadıyla kullanılır (Duffus and Worth 2006).

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970' lerde kullanılmaya başlanmış ve bu güne değin mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik etkilerini belirlemek için çok fazla genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir *et al.* 2004). Bu testler, farklı düzeneklerle direkt veya indirekt bir şekilde DNA'da oluşan hasarları belirlemek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar (Choy 2001, Zeiger 2004, Vural 2005).



Çağımızda MN ve CA testleri, genotoksik testler olarak değerlendirilmektedir ve kimyasalların genotoksisite seviyesini belirlemek için kullanılırlar (Benedicte *et al.* 2009; Cigerci *et al.* 2013, Rai *et al.* 2009).

## **2.5 Toksikite Çalışmalarında Toprak Solucanı**

### **2.5.1 Toprak solucanı**

Toprak solucanları Perm-Karbon dönemlerinden önce değişime uğraması ve mutasyon meydana getiren olaylardan arınık olması sebebiyle genetik yapısını bu güne değin hiç değiştirmemiş veya çok az değiştirmiş bir grup olması sebebiyle toksikolojik çalışmalarda belirteç canlılardır (Demirsoy 2002). Toprak solucanları, toprakta yığılmış olarak bulunan kimyasal maddelerden etkilenmektedir. Bu sebeple kimyasal maddelerin canlılar üzerine olan zararlı etkilerinin araştırılmasında toprak solucanlarından OECD, FAO ve EEC gibi uluslararası kuruluşlarca deney hayvanı olarak yararlanılmaktadır (Saint-denis *et al.* 1998).

Toprak solucanlarının kansere sebep olan etmenlere yönelik gösterdiği bağışıklıkla alakalı ortaya atılan çalışmalarda, solucanlar aracılığıyla harcanan besinlerin tümöre karşı bir etkinliğe sahip olduğu veya solucanda tümöre karşı bir bileşiğe çevrildiğini Çotuk (1979)' da bildirmiştir.

## **2.6 Solucanların Ekolojiye Faydaları**

Toprak solucanları annelida subfilumunun *Oligochaeta* sınıfı, *Lumbricidae* ailesine mensup halkalı ve omurga bulundurmeyen canlılardır (Kılıç 2007).

Toprak solucanlarının toplulukları üzerindeki negatif etkilerin başında, orman tahribatı, toprağın işlenmesi, pestisitlerin bilinçsiz kullanımı, endüstri atıkları, kentleşme sebebiyle doğal alanların yok edilmesi ve farklı sebeplerle topraklarda yığılan ağır metal kirliliklerinin olduğu ifade edilmiştir (Saward 2007). Ekolojik kirliliğin sonucu olarak toprak solucanlarının verimliliğinin düşmesi ekolojik işlevlerinin de düşmesine sebep

olmaktadır. Toprak solucanları, çoğunlukla topraktaki kirlilik seviyesine göre toprağın biyolojik zenginliğinin azalmasının saptanmasında belirteç canlı olarak kabul görürler (Belotti 1998 and Spurgeon 1999).

Ekotoksikolojik yönden toprak solucanlarının bir diğer önemi ise omurgalı hayvanlarda besin kaynağı olmaları sebebiyle bünyelerine aldıkları zararlı maddeleri hayvanlara ve dolaylı olarak besin ağındaki bütün canlılara aktarmaları sebebiyledir (Ma 2001).

Dünya üzerinde birçok yerde toprak solucanları ile yapılan çalışmalarda, önceden toprak solucanı mevcut olmayan alanlara toprak solucanı ilavesiyle bitkilerdeki verimi bariz bir biçimde arttırdığı gözlemlenmiştir (Baker *et al.* 1999). Solucanlar toprağın yapısını analiz etmek için çok önemli organizmalardır (Ciğerci *et al.* 2015).

Günümüzde tarımsal ekonomide ve bitkisel besin maddelerinin döngüsünde, toprak içerisinde bulunan canlılar büyük öneme sahiptirler. Toprak solucanları ekosistemde önemli görevleri olan ve kendilerine has çok fazla özelliği olan enteresan hayvan gruplarından biridir. Toprakta bulunan solucanlar, toprağın yapısına değişik biçimlerde etki ederler. Toprakta çukurlar kazarak suyun toprağa geçişini sağlarlar ve bu şekilde erozyon riskini azaltmış olurlar. Solucanların kazdıkları bölümler, hava, sıvı ve gazların sirkülasyonunu kolaylaştırır, köklerin daha rahat yayılmasını ve bu sayede bitkilerin topraktan besinini kolayca almasını sağlarlar. Bu sayede bitkiler daha sağlıklı ve verimli bir gelişim sürecinden geçmiş olurlar. Toprak solucanları organik maddelerin tekrar doğaya kazandırılması ve toprağın veriminin arttırılmasında, mikroorganizmalarla beraber etkinlik göstermektedir. Köke yakın bölgelerde bulunan solucanlar, organik atıkların parçalanmasına, toprak içerisine yerleşmesine ve sindirilip ayrışmasında önemli rol oynamaktadır. Solucanlar toprak içerisinde gezindikçe, toprakta mevcut olan mineral partiküllerini değişik alanlara yaymış olurlar (Mısırlıoğlu 2011).

Solucanlar açtıkları galeriler sayesinde diğer mikro canlılar için de ideal bir yaşam alanı sağlarlar ve bunun yanında besin ihtiyacınında teminini yaparlar (Savin *et al.* 2004).

Shen ve Yang (2008) solucanların ve mikroorganizmaların çok değerli toprak canlıları olduklarını, doğanın dengesini devam ettirmesinde, besin maddelerinin ve ağır metallerin biyo-yarayışlılığında görevli olduklarını kaydetmişlerdir. Araştırmada solucanların besin maddesi ağı ve dönüşümü hakkında etkilerinin toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine olan etkileri bildirilmiştir (Laszczyca *et al.* 2004).

Toprak solucanları buldukları ortamlardaki tüm kimyasal maddeler ve ağır metaller ile devamlı bir etkileşim durumundadır. Bu nedenle toprak solucanlarının kimyasal maddelerce zehirlenmesi ile serbest radikallerin meydana gelmesinde, radikallere karşı savunma sistemlerinin aktifliği ve glutasyon mekanizmasında bağlantının olduğu rapor edilmiştir (Laszczyca *et al.* 2004; Liu *et al.* 2010).

*E. hortensis*' de  $\text{CoCl}_2$ , DNA' daki bozulmalara, sitokinez yetmezliğine ve kromozomal harabiyete sebep olmuştur. Düşük dozdaki  $\text{CoCl}_2$  konsantrasyonlarında bile sölomasitlerde DNA ve kromozom aberasyonuna sebebiyet vermiştir. Bu nedenle, Komet ve MN testlerinin birlikte yürütülmesi, karasal ekosistemlerde çevreye zarar veren her türlü etmenin omurgasız hayvanlarda meydana gelen genotoksik etkilerin ortaya çıkmasını göstermiştir (Ciğerci 2015).

Toprak solucanları, birbirinden değişik ekolojik alanlarda yaşamalarına karşın yaptıkları işler yönünden benzedikleri bildirilmiştir (Tomlin 2004, Hendrix 2000). Toprak solucanları toprağın verimini, kalitesini arttıran canlılar olarak bilinmektedir. Yaşadıkları ekosistemde birçok açıdan indikatör canlı olma özelliğine sahiptir. Çok önemli bir faktör olan toprağın pH'sının düzenlenmesinde görevlidir. Bunu toprakta bulunan kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) miktarını arttırarak toprak pH'sında asitliğin düzenlenmesi ile gerçekleştirmektedir (Lambkin *et al.* 2011).

## 2.7 DNA

1868 yılında, İsviçreli bilim insanı Friedrich MIESHER, balık spermleri üzerine yapmış olduğu araştırmalarda, balık spermlerinin nükleuslarını ve akyuvar nükleuslarını izole ederek nükleuslarının asit özelliğinde olduğunu görmüştür. Bu molekülleri nükleusta

mevcut bulunan asit anlamını taşıyan “nükleik asit “olarak isimlendirmiştir. Mevcut kaynaklarımıza bakıldığında, nükleik asitler tüm organizmalarda olan organik moleküllerdir. Organik moleküller canlılar tüm canlılar tarafınca sentezlenen ve canlıların yapısını meydana getiren moleküllerdir. Bütün canlı organizmalarda ya da hücrelerde iki tür nükleik asit bulunur. Bunlar: Ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA)’ tir. Virüsler ya DNA ya da RNA’dan yalnızca birini bulundurmaları bakımından bu kural dışında kalırlar. Kalıtsal olayların moleküler düzeydeki temelini genetik materyal işlevini yüklenen nükleik asitler oluşturur. Nükleik asitlerin iki çeşidi mevcuttur. Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) esas olarak aynı yapısal karakterlere sahiptirler. DNA yalnızca kalıtsal bilgiyi aktaran makro molekül olmayıp bunun yanında protein sentezini de gerçekleştirir (Bayşu 2007).

DNA çok çabuk hasara uğrayan bir moleküldür ve üzerinde devamlı yapısal bozulmalar meydana gelmektedir (Fidan 2007). DNA’ da spontan olarak veya çevresel faktörler ile hasar oluşmakta ve meydana gelen hasar DNA tamir sistemleriyle yok edilmeye çalışılmakta. Bununla birlikte bozulmaların aşırı olduğu veya tamir mekanizmalarının kendiliğinden değişimler sonucu veya çevresel etmenler sonucu hasar meydana gelebilmekte, oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından giderilir. Hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin eksik kaldığı durumlarda DNA’ da meydana gelen bozukluk kalıtsal problemlere yol açmakta ve mutasyona ya da apoptozise sebep olmaktadır (Akçay ve Dinçer 2000).

### **2.7.1 Mutajenite ve Genotoksisite**

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA’nın yapısında ortaya çıkan bozulma, kırılma, gen mutasyonları, anöplidi, kromozomlarda gözlenen anomali gibi hasarları içerisine alan genel bir terimdir. Genetik materyal ya da genomun kopyasının çıkarılmasını gerçekleştiren enzimlerle iletişime geçen ve kalıcı hasarlara sebep olan maddelerin DNA’da hasar oluşturması ya da bazı değişimlere neden olması ise genotoksik etki olarak ifade edilmektedir (Choy 2001, Mortelmans and Rupa 2004, Zeiger 2004).

DNA' da kalıcı hasarlara sebep olan ajanlar veya mutajenler, DNA'ya etkilerini direkt veya sentezlenen proteinlere bağlanarak indirekt olarak gösterirler. Genetik materyaldeki hasarlar, moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarına, yaşlanmaya, kansere, kısırlığa ve daha başka birçok genetik rahatsızlıklara sebep olmaktadır (Kirsch-Volders *et al.* 2003, Mateuca *et al.* 2006).

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki bağlantıyı bulabilmek adına birçok çalışma yapılmış ve insanlar için kanser riski yüksek olan çok fazla bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında güçlü bir bağlantının var olduğu ve genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşlarınca kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin incelenmesinde tarama testleri olarak kullanılması gerektiği görülmüştür (Choy 2001, Vural 2005, Zeiger 2004, Purchase *et al.* 1978, Mavournin *et al.* 1990).

#### **2.7.1.1 Genetik Toksisite Testlerinin Kullanım Alanları**

Genotoksisite testleri 1970 yılından bu yana kullanılmaktadır. Mutajenik ve genotoksik maddelerin kanser riskini kontrol etmek adına çok fazla genotoksisite testi geliştirilmiştir (Bedir *et al.* 2004). Bu testler, farklı sistemlerle direkt ya da indirekt bir şekilde DNA' da ortaya çıkan bozulmaları tespit etmek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar (Choy 2001, Vural 2005, Zeiger 2004).

Genetik toksisite testleri temelde genoma etki edebilecek UV ve irradyasyon gibi fiziksel faktörlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tayininde kullanılırlar. Kişilerde ilaç kullanımından önce ve sonra genetik materyalde meydana gelen değişikliği ölçmek ve güvenilirliği saptamak, kanserden korunmak, kansere karşı hassasiyetin tespit edilip takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak kullanılmaktadır (Choy 2001, Mateuca *et al.* 2006, Preston *et al.* 1981, Jena *et al.* 2002).

## 2.8 DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

### 2.8.1 Mutajenite ve Genotoksisite Testleri

#### 2.8.1.1 Ames Testi

İlk olarak 1973 senesinde Dr. Bruce N. Ames aracılığıyla geliştirilmiş bir sistemdir. Ames yöntemi olarak da isimlendirilen Salmonella/mikrozom test yöntemi, kimyasal maddelerin mutajenitelerinin araştırılmasında kullanılan, kısa süreli bakteriyel test yöntemlerinden birisidir (Ames *et al.* 1973, Mortelmans and Zeiger 2000).

#### 2.8.1.2 Kromozom Anormalliği (KA) Testi

KA testi, mutasyona sebep olan etmenlerce indüklenen nitelik ve nicelik bakımından kromozomal anormalliklerin belirlenmesi amacı ile sürekli kullanılan standart bir metoddur. *In vitro* KA testi memeli hücre kültürlerinde, *in vivo* KA testi ise çoğunlukla kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği sıklığı incelenmektedir. Diğer yandan *in vivo* KA testi, özellikle mutasyonların saptanmasında türe ve dokuya göre farklılık gösteren metabolizma, farmakokinetik ve DNA tamir mekanizmaları gibi etkenlerin değerlendirilmesine de fırsat tanımaktadır (Choy 2001, Preston *et al.* 1981, Evans 1984, Preston *et al.* 1987).

#### 2.8.1.3 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi

Mutasyona sebebiyet veren etkileri araştırmak için kullanılan diğer bir yöntem de kardeş kromatid değişimi (KKD) yöntemidir. KKD, metafaz kromozomlarının kardeş kromatidleri arasındaki genetik materyal bölümlerinin karşılıklı değişimleridir. Bu yöntemde, genetik materyal kırıklarını fark edilir duruma getirmek için, hücre kültürlerine timin analogu olan Bromodeoksiüridin (BrdU) eklenmektedir. Rastgele bir kimyasal maddenin KKD sıklığında artışa neden olması, o maddenin eşlenme işleyişinin etkilediğinin ve DNA hasarına neden olabildiğinin bir kanıtıdır. Kromozomlarda kırıklıklara sebep olan maddelerin ve klastojenik aktivitenin saptanmasında KKD testi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Montoro *et al.* 2012 and

Beg *et al.* 2009).

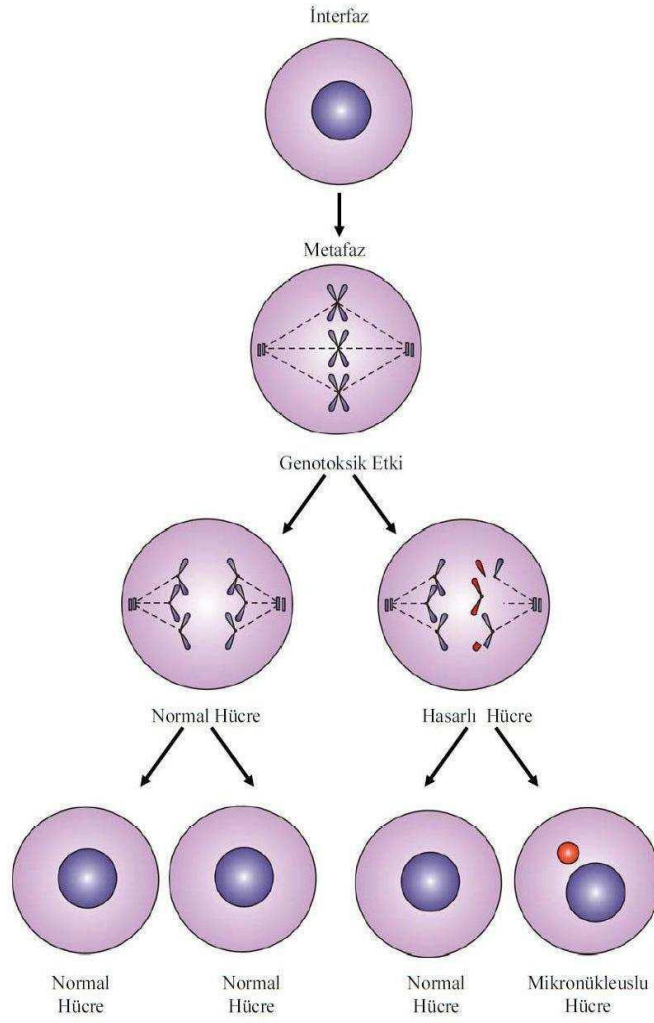
#### **2.8.1.4 Mikronükleus (MN) Testi**

MN testi 1950'li yıllarda bitki hücrelerinde kromozom hasarının kontrol edilmesinde, 1970'li yıllarda ise hayvan hücrelerinde ve ardından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kansere sebep olan kimyasalları saptamak adına kullanılmaya başlanmıştır (Demirel ve Zamani 2002, Schmid 1975, Widel *et al.* 2001).

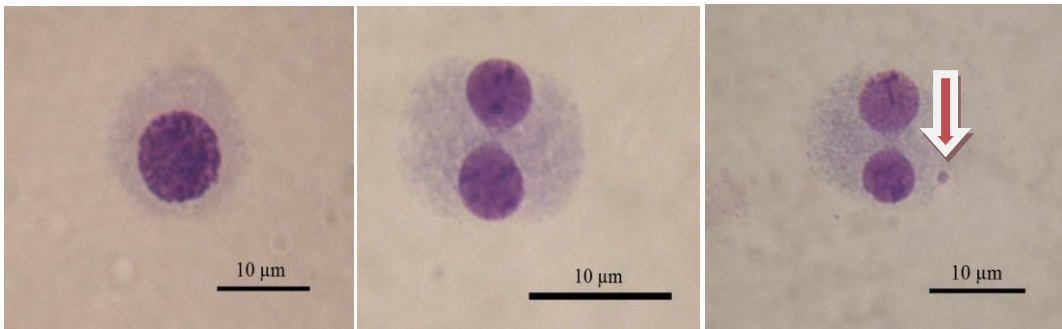
MN testi sitogenetik hasarların tespit edilmesinde, kromozom analizine göre daha basit tatbik edilmesi ve çok miktarda hücre sayılması ve istatistiksel açıdan daha anlamlı skorlar elde edilmesi kazanım sağlamasıyla geniş kullanım alanı bulan bir yöntem olmuştur (Labay *et al.* 2001, Naccarati *et al.* 2000).

MN oluşumunun esasını, genetik materyalde meydana gelen bozukluk oluşturmaktadır. Organizmanın farklı mutajenik, klastojenik ve karsinojenik etmenlere maruz kalması neticesinde genetik materyalde hasar ortaya çıkmaktadır. DNA' da meydana gelen bu hasar, MN testinin toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemini ortaya koymaktadır (Fenech 2010).

MN' ler hücrenin mitoz bölünmesi esnasında meydana gelen, asıl çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom kırıklıklarından orjinlenen yapılardır. MN miktarındaki artış, farklı etmenlerin hücrelerde meydana getirdiği nitelik ve nicelik bakımından kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2. 7). Anöploidiyi uyaran etmenler, sentromer bölünme kusurlarına ve iç iplikçiklerinde işlev bozukluklarını meydana getirmektedir. Bunun sonucunda kromozom kırıklarının oluşmasına ve MN oluşumuna sebep olmaktadır (Resim 2. 1) (Zijno *et al.* 1994, Vanparys *et al.* 1990).



Şekil 2.7 MN'nin meydana geliş aşamaları (Ma 1981).



a. Normal hücre

b. Binükleer hücre

c. Binükleer hücrede mikronükleus

Resim 2.1. a. Normal hücre, b. Binükleer hücre, c. Binükleer hücrede mikronükleus Akyl (2012).



Heddle ve Countryman'ın (1976) ölçütlerine göre:

1. MN'nin yapısı ana çekirdek ile aynı olmalıdır.
2. MN ana çekirdekten küçük olmalıdır.
3. MN ana çekirdekten ayrı, oval ya da yuvarlak biçimde olmalıdır.
4. Çekirdeksi olmayan parçacıklardan ayrı, ışığı da yansıtmemelidir.
5. MN feulgen pozitif ya da değişik DNA'ya has tepkimelerde pozitif reaksiyon meydana getirmelidir.
6. MN'ler stoplazması net olarak gözlemlenebilen hücrelerden seçilmelidir.
7. MN'nin meydana gelmesi konsantrasyona göre olmalıdır (Almassy *et al.* 1987).

### **2.8.1.5 Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)**

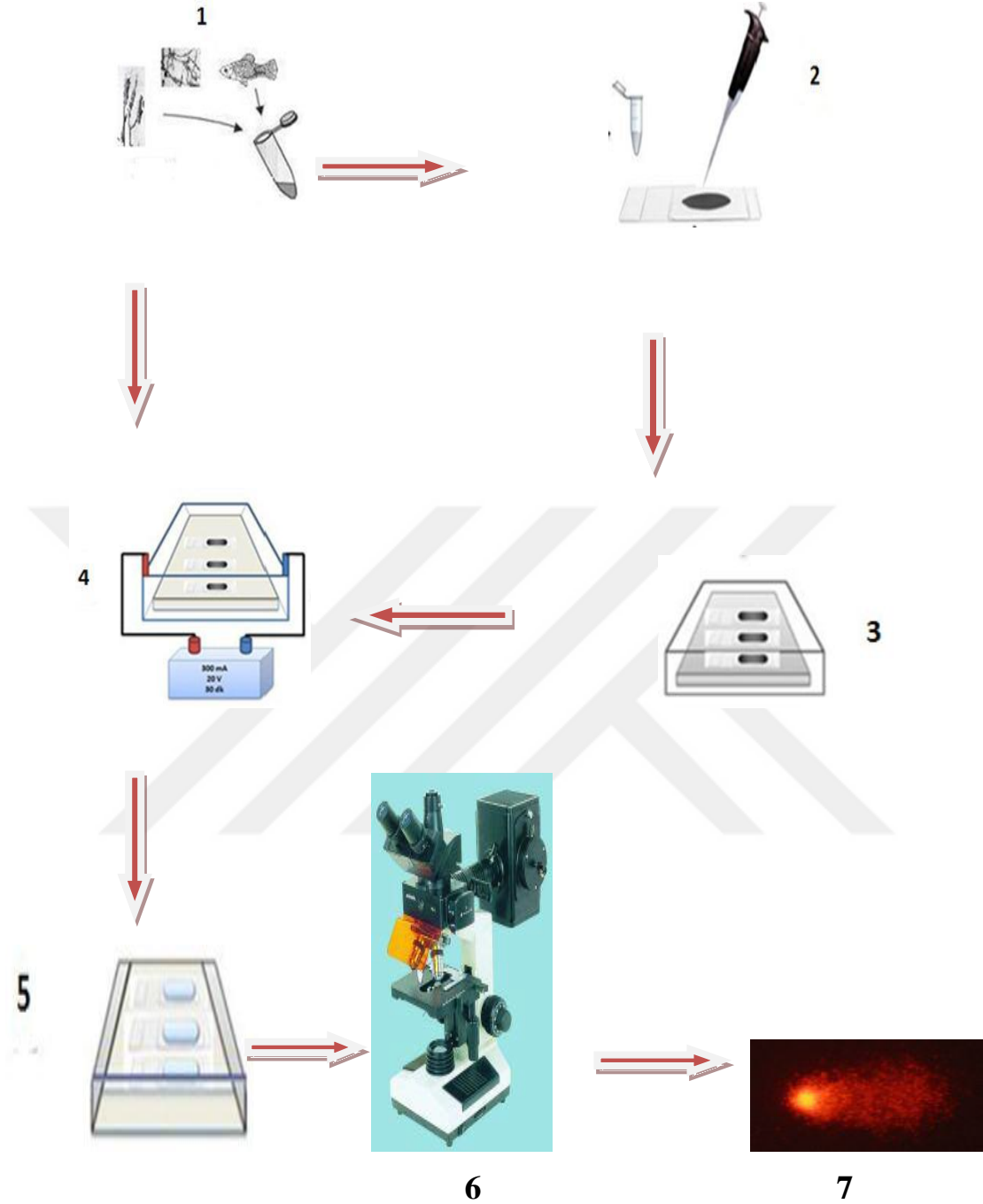
Canlılar yaşadıkları sürece farklı canlı ve cansız stres faktörleriyle karşı karşıya gelmektedirler. Komet testi, organizmaları strese sokan, bu etmenlerden alıkoymak adına da farklı kimyasallar ve özellikle de pestisitlerin zararlarını ortaya koymak için etkilerinin kısa sürede ortaya çıkması ve kısa sürede sonuç alınabilen bir test sistemi olarak kullanılmaktadır. Gün geçtikçe artan pestisit kullanımına bağlı olarak hedef organizma ve hedef olmayan organizmalar üzerine fizyolojik, biyokimyasal, morfolojik ve moleküler olarak tespit edilebilen farklı toksik etkiler görülebilmektedir (Gichner *et al.* 2009). Komet testi, genetik materyalde meydana gelen tahribat ve tahribat derecesini belirlemek, genotoksik etkilerin ortaya çıkarılmasında önemlidir. Günümüzde, genotoksik etkilerin belirlenmesinde “comet tekniği” veya “tek hücre jel elektroforezi” gün geçtikçe daha da çok ilgi ve kabul gören bir test sistemi halini almıştır. Son zamanlarda komet tekniği, yaşlanma, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Martin *et al.* 1993).

Komet tekniğinin esas hedefi, genotoksik ve sitotoksik etmenlerin canlı hücrelere olan etkilerini tek tek hücrelerin çekirdeklerini tetkik ederek araştırmaktır. Genel olarak, canlı dokulardan yalıtılan çekirdek içindeki genetik materyal ince bir agaroz jel içine sabitlenir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Genotoksik etkenlerin etkisiyle genetik materyalde tek iplik kırıklıkları ve çift iplik kırıkları oluşabilir ve buna bağlı olarak meydana gelen çeşitli ağırlık ve elektriksel yüke sahip DNA molekülleri elektroforetik

alandanda çeşitli hızlarda göç ederler. Elektroforez sonunda etidyum bromür gibi DNA'ya özgü boyalar kullanılır ve harabiyetin derecesine göre dairevi şekilden kuyruklu yıldız benzer şekle geçer ve DNA görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir. Elde edilen görüntülerin "kuyruklu yıldız" şekline benzemesi sebebiyle bu yöntem İngilizce'de bu anlama gelen "comet" adı verilmiştir. Daha düşük seviyede olan DNA hasarlarının belirlenmesinde YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer), DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) gibi duyarlı ancak oldukça maliyetli olan boyalar sarfedilmesine karşın Gichner vd. (2006) daha ucuz olan etidyum bromürün etkisinin, bahsi geçen diğer boyalardan farklı olmadığını bildirmişlerdir (Angelis *et al.* 2000).

Gen düzeyinde DNA kırıklarının tespiti ilkesine dayanan Komet testi, pek fazla DNA hasarının ve tamirinin belirtilmesinde, biyolojik gözlem araştırmalarında ve genetik toksikolojide geniş kullanım alanına sahiptir (Park and Kang 2004, Sardas and Izdes 2006).

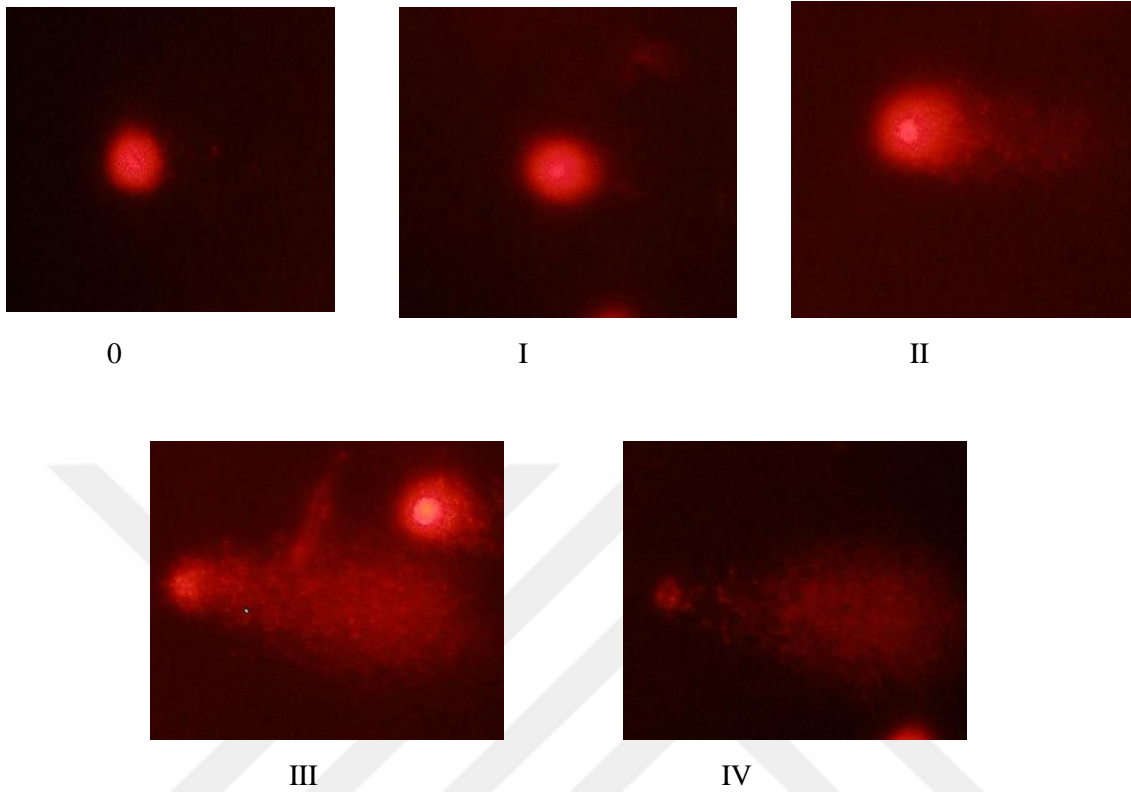
Metod asıl olarak, çalışılacak dokudan yalıtılmış olan DNA'nın pozitif kutba hareketi sonucu kuyruklu yıldız benzer bir şeklin meydana gelmesine neden olmaktadır. Etidyum bromür ile boyandıktan sonra DNA'daki hasar floresan mikroskopu ile tetkik edilmektedir. Kuyruk uzunluğu, DNA hasarı ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir (Singh *et al.* 1988, Sasaki *et al.* 2000) (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8** Komet testi genel aşamaları. 1.Hücre izolasyonu; 2.Agaroz kaplı lamlara hücre süspansiyonunun uygulanması; 3.Lizis; 4. Elektroforez; 5. Nötralizasyon; 6. Boyama ve floresan mikroskopta resimlerin elde edilmesi; 7. Değerlendirme.

Komet testi kullanılarak DNA' daki hasar derecesini belirlemek ve sonuçları karşılaştırmak adına çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bu metodlardan en kolay olanı, mikrometrik oküler vasıtasıyla gözle kometleri saymak ve gruplandırmaktır (Olive *et al.*1990, Kocyigit *et al.* 2005). Göz yardımıyla görüntü analizi yapılırken göç etmiş

hücreler, genellikle kuyruk uzunluklarına göre sınıflandırılırlar (Resim 2.2).



**Resim 2.2.** Komet yöntemi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. 0- hasarsız DNA; I-çok az hasarlanmış DNA; II-az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

Görüntü analiz sistemleri ile hasara uğramış hücrelerin başlarının çapı ve kuyruklarındaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti gibi farklı komet özellikleri belirlenebilmektedir. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içerisindeki total DNA miktarının çarpımı olarak ifade edilmektedir. Bu parametreler içerisinde kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu sıklıkla yararlanılan ölçütlerdir (Tice *et al.* 2000, Hartmann *et al.* 2003).

Komet testinin kullanıldığı genotoksisite çalışmalarında farklı metaller, pestisitler, nitroaminler ve antineoplastik ilaçlar kullanılır (Rojas 1999). Bunun yanında oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan dolayı önemli ölçüm yöntemlerdendir (Achary *et al.* 2008, Dikilitaş *et al.* 2009).

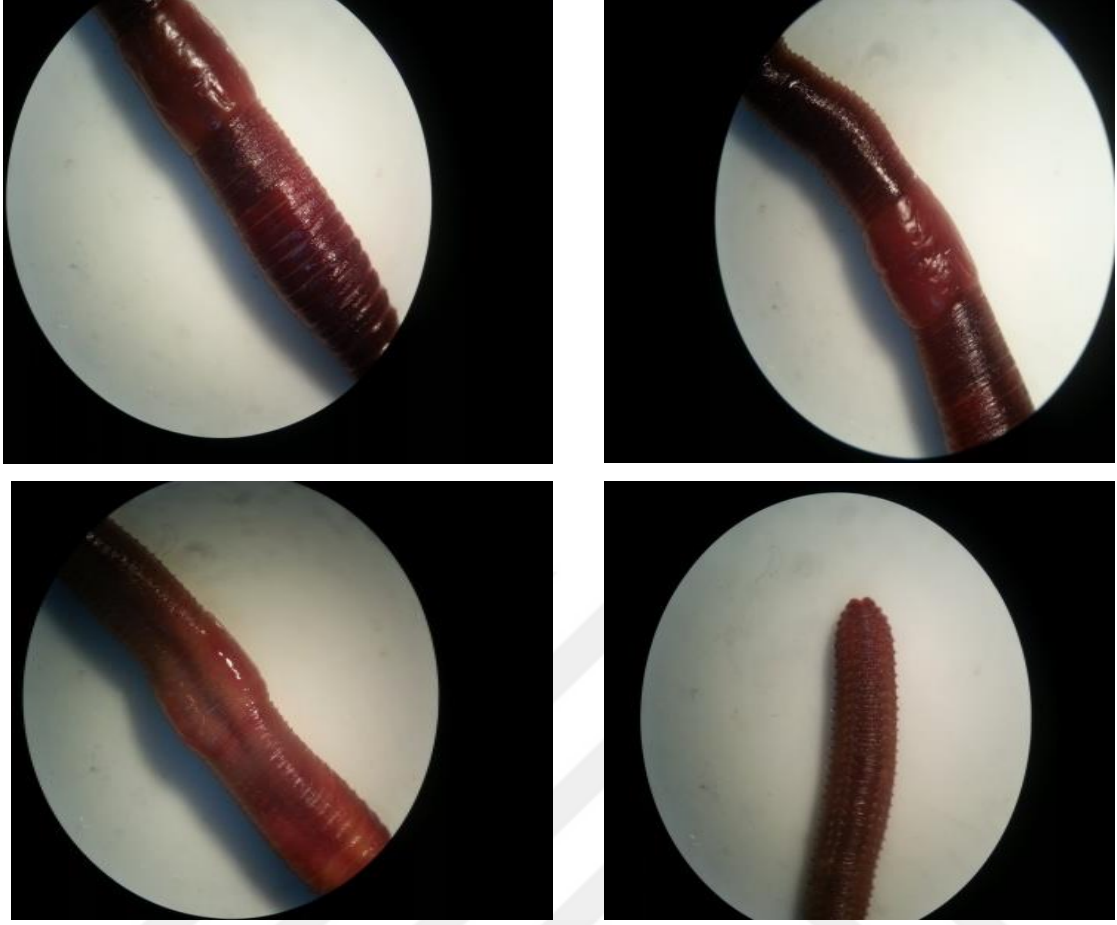
### 3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada soğan tarlalarında tohum ekiminden sonra, yabancı ot çıkış öncesi OD herbisiti ve soğan, patates ekiminden sonra yabancı ot çıkışı öncesi yaygın olarak kullanılan PM herbisitlerinin farklı dozlarının muhtemel genotoksisitelerini belirlemek amacıyla Komet ve MN Testleri kullanılmıştır.

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Kullanılan Test Organizması

Çalışmada kullanılan solucanlar Afyonkarahisar ili doğal tarım alanlarından, kürek yardımıyla alt-üst edilen topraklardan elle toplanmıştır. Laboratuvara getirilen solucanlar gözle incelenerek benzer olanlar gruplanmıştır. En çok bireyin bulunduğu grup Sims ve Gerard (1985) ile Mısırlıoğlu (2011) tarafından bildirilen tür tayin anahtarında verilen özelliklere göre mikroskop altında incelenmiş ve solucanların *E. hortensis* diğer bir ismiyle *Dendrobaena venata* türü oldukları belirlenmiştir. Tür tayin anahtarına göre *E. hortensis* morfolojik olarak; her biri yaklaşık olarak 1,5 gr ağırlığında ve orta boyludur. Genellikle mavi, pembe-gri renge sahip bantlı veya çizgili görünüşe sahiptir. Kuyruk ucu genellikle krem veya soluk sarıdır. Türler beslenmediğinde soluk pembe renktedir. Mikroskop altında yapılan incelemeler sırasında alınan bazı görseller Şekil 3.1' de sunulmuştur.



**Resim 3.1** *E. hortensis* Binoküler Stereo mikroskopta görüntüsü (Orijinal)

### **3.1.2 Oxadiazon ve Pendimethalin**

Bu tez çalışmasında kullanılan sıvı formülasyonu litrede 250 g OD içeren WINDCALL 25 EC herbisiti ve sıvı formülasyonu litrede 450 g olan Stomp Ekstra PM herbisiti ticari olarak temin edilmişlerdir. *E.hortensis* için literatür araştırmaları doğrultusunda ölümcül olmayan dozlar Probit Analiz Yöntemiyle belirlenmiş ve belirlenen dozlar örneklere havalandırılmalı petri kapları içerisinde 48 saat süreyle uygulanmıştır.

### **3.1.3 Kullanılan Araç ve Gereçler**

1. Hassas Terazî (Sartorius, Germany)
2. Soğutmalı Santrifüj (Hettich)
3. Floresan Mikroskop (Olympus)

4.  $\pm 4$  °C Buz Dolabı (Altus)
5. Pipetler (AXYPET autoclavable 0,1 - 2  $\mu$ l, eppendorf Research 10-100  $\mu$ l, BIOHIT PROLINE 100-1000  $\mu$ l)
6. Otoklav (Jeto tech, Korea)
7. Distile Su Cihazı (Nüve)
8. Elektroforez Düzeneği (Biolab)
9. Elektroforez Güç Kaynağı (Power Pack P 25)
10. Hotplate (Thermolyne)
11. pH metre (Hanna Instruments)
12. Manyetik Karıştırıcı (Hangping, Variomag)
13. Lam (26x76mm ) ve Lamel (24x60mm) (Iso Lab)
14. Plastik Petri (Iso Lab)
15. Ependorf
16. Pens

### 3.1.4 Kullanılan Çözeltiler

#### a. EB-Extrusion Buffer

NaCl (Sigma, 13423.....	4,161 gr
EDTA.....	1,091 gr
Guaiacel (gliserol eter) (C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ).....	9,09 gr

Verilen miktarlarda alınan maddeler tartıldı ve 950 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldü. Üzerine 50 ml absolute ethanol ilave edildi (pH:12).

#### b. Elektroforez

100 Mm NaOH.....	6 gr
1 mM EDTA.....	0,18 gr

Verilen miktarlar tartılıp üzerine dH<sub>2</sub>O eklendi ve son hacim 500 ml' ye tamamlandı (pH>13).

**c. PBS (50 ml için 1x stok)**

NaCl.....	4 gr
KCl.....	0,1 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1 gr
Tris-HCl.....	1,6 gr

Miktarlarda tartılıp üzerlerine dH<sub>2</sub>O eklendi (pH:7,4).

**Uyarı:** Çalışmada 10x' lik kullanıldı.

**d. Normal Kaynama Dereceli Agar (NMA) (% 1)**

0,03 gr NMA tartılıp üzerine 3 ml 10x' lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamların üzerine yayıldı.

**e. Düşük Kaynama Dereceli Agar (LMA) (% 0,8)**

0,016 gr LMA tartılıp üzerine 2 ml 10x' lik PBS eklenip ısıtılarak % 0,8' lik LMA çözeltisi hazırlandı.

**f. Lizis Tamponu**

2,5 M NaCl.....	14,7 gr
100 mM Trisma Base.....	0,12 gr
100 mM EDTA.....	3,72 gr

Miktarlarda tartıldı ve son hacim dH<sub>2</sub>O ile 100 ml' ye tamamlanarak pH:10 olacak şekilde ayarlandı.



### g. Hipotonik KCl Hazırlanışı

% 4' lük KCl eriyiği 0,4 KCl + dH<sub>2</sub>O ile 100 ml' ye tamamlandı.

Çalışmaya başlamadan 2 saat önce istenilen miktar kadar alınıp etüvde (37 °C'de) bekletilerek çalışıldı.

### h. Fiksatif Hazırlanışı

**Fix II için;** 40 ml Glasiyal Asetik Asit + 200 ml metanol = 240 ml (Son Hacim).

**Fix I için;** 50 ml fixII + 50 ml % 0,9 NaCl = 100 ml (Son Hacim).

Önce fix II daha sonra fix I hazırlanır. Fiksatif' ler çalışmaya başlamadan 2 saat önce hazırlanır +4 °C'de bekletilir.

### i. Etidyum Bromür

10 mg etidyum bromür 50 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldü ve 200 µg/ml'lik stok etidyum bromür çözeltisi elde edildi. Hazırlanan stok çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edildi. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 ml alındı ve distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. 20 µg/ml' lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

### i. Sorensen Tamponu Hazırlanışı

- **Tampon A:** 11,34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....250 ml dH<sub>2</sub>O' da eritildi(pH: 4,8).

- **Tampon B:** 14,83 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O.....250 ml dH<sub>2</sub>O' da eritildi(pH:9,3).

Belirtilen miktarlarda tartılarak son hacimler 250 ml' ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı.

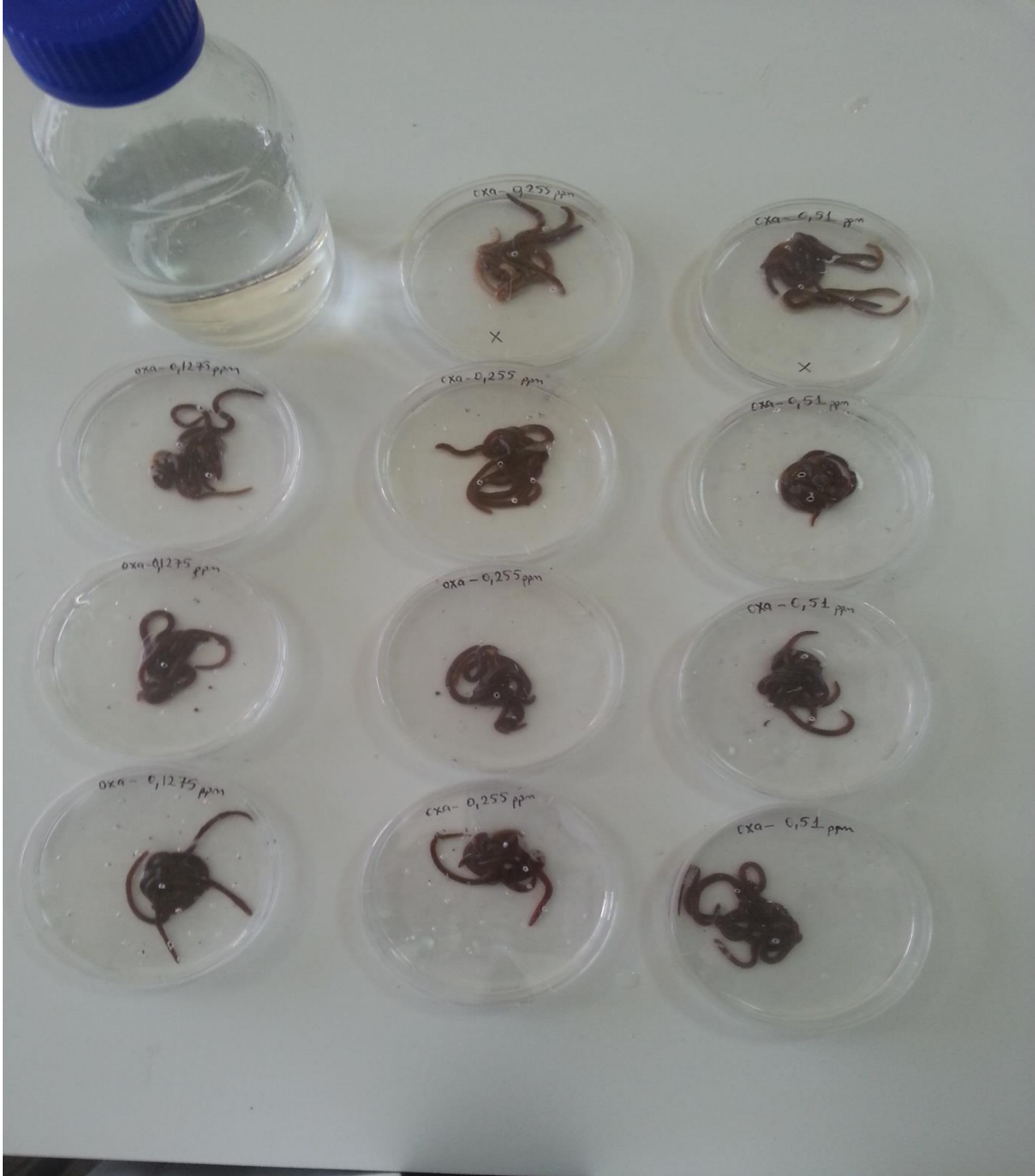
### **g . % 5' lik Giemsa Boyasının Hazırlanışı**

5 ml Tampon A + 5 ml Tampon B + 5 ml Giemsa karıştırılıp son hacim dH<sub>2</sub>O ile 100 ml' ye tamamlandı ( pH: 6,8). Hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirildi.

### **3.2 Metot**

#### **3.2.1 Komet Çalışması**

1. Türü belirlenen örneklerden boyları 6-8 cm olan solucanlar farklı bir kaba alındı. İki seri distile sudan geçirilerek topraktan arındırıldı.
2. LD<sub>50</sub> belirlemek için; 7 ayrı havalandırılmalı petri kabına 8'er tane solucan ve üzerlerine literatür bigileri dahilinde toksik olması muhtemel olan konsantrasyonlarda (OD Herbisiti için; 0,0625 ppm, 0,125 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm ve 2,5 ppm. PM Herbisiti için; 0,0625 ppm, 0,125 ppm ve 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm,1,5 ppm ve 2 ppm) konulup 48 saat beklenildi.
3. 48 saat sonunda her bir solucanın baş kısmına tahta bir çubuk ile 5 kez dokunularak tepki durumlarına göre canlı-cansız sayımı yapıldı.
4. Sayım sonucu, Probit analiz yöntemiyle değerlendirildi
5. Uygulama dozları olarak 0,5xLD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> değerleri kullanıldı.
6. Belirlenen konsantrasyonlar solucanlara 48 saat süreyle uygulandı.

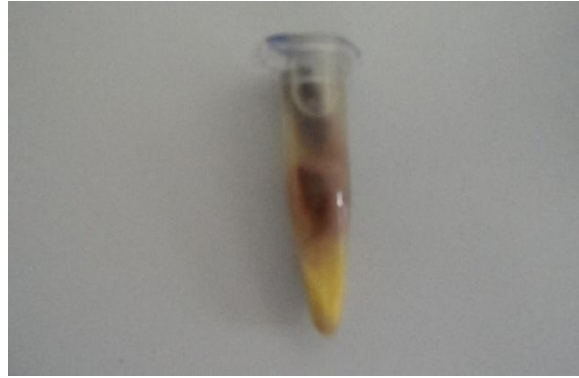


**Resim 3.2** OD herbisitinin *E. hortensis*' lere uygulanması.



**Resim 3.3** PM herbisitinin *E. hortensis*' lere uygulanması.

7. 48 saat sonunda her konsantrasyondan 3'er solucan alınıp ayrı ayrı ependorf tüplere konulup üzerlerine 1'er ml Ex-Buffer eklendi ve 5 dk beklenildi.



**Resim 3.4** Ex-Buffer muamele edilen *E. hortensis*.

8. 5 dk sonunda solucanlar atıldı tüplerin içerisinde kalan sölomasitler 1200 rpm +4°C’ de 8 dk santrifüj edildi.



**Resim 3.5** Santrifüj sonrası sölomasitler.

9. Süpernatant dökülüp pellet kaldı ( Bu aşamada Komet Testi için gereken miktarın fazlası olarak kalan sölomasitler MN çalışması için kullanıldı.).
10. 7 µl sölomasit, 100 µl LMA ile karıştırıldı.
11. Elde edilen karışım; önceden üzerlerine NMA yaydırılmış olan lamaların üzerine homojen olarak yaydırılıp lamelle kapatıldı ve buz kasetinin üzerine alınıp 3dk bekenildi.
12. Lameller lamaların üzerlerinden yavaşça çekilerek alındı. Preparatlar bir kap içerisine alınarak +4 de liziz çözeltisinde 1 saat bekletildi.
13. Örnekler lizisten çıkarılıp 20 dk ortam konsantrasyonu için elektroforez tankında bekletildi ve 300 A’de 25V’da 20 dk minimal ışık altında yürütme işlemi gerçekleştirildi.
14. 40 dk sonunda örnekler dH<sub>2</sub>O ile nötralize edildi.
15. 70 µl Et-Br (Etüdyum Bromür) örneklerin üzerine yaydırılıp lamelle kapatıldı ve ardından örnekler floresan mikroskopuyla değerlendirmeye alındı.
16. Her bir okumada 100 hücre DNA’sı incelenerek DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre beş kategoride incelendi. Değerlendirme SPSS paket 23 versiyonuna göre yapıldı ve hiç hasar bulunmayan DNA’lar ‘‘0’’ maksimum hasar bulunan DNA’lar ‘‘4’’ olarak değerlendirildi.

### 3.2.2 MN Çalışması

1. Örneklerden alınmış izole solömasitlerin üzerine 1'er ml KCl eklenip 5 dk beklenildi. Süre sonunda 1500 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım döküldü pellet bırakıldı.
2. Pellet üzerine 1'er ml fix I eklendi ve 1500 rpm'de +4° C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp pellet bırakıldı.
3. Pellet üzerine 1'er ml fix II eklendi ve 1500 rpm'de +4° C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp pellet bırakıldı.
4. Yayma işleminden önce lamalar 1 saat nitroz asitte daha sonra dH<sub>2</sub>O'da bekletildi.
5. Islak olarak çıkarılan lamaların kurummasına izin verilmeden kalan pelletler dH<sub>2</sub>O'dan çıkarılan lamaların üzerine yayıldı ve 1 gün kurumaya bırakıldı.
6. Kurumuş preparatlara 12 dk Giemsa boyası ile muamele edildi.
7. 12 dk sonunda lameller üç seri sudan geçirildi ve iki damla entellan ile kapatıldı.
8. Işık mikroskobu ile her preparattan 1000 hücre sayımı gerçekleştirildi.

### 3.2.3 İstatistiksel Analiz

Komet ve MN çalışmalarından elde edilen veriler, SPSS paket programı 23 versiyonunda, Duncan testi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  olma durumu istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

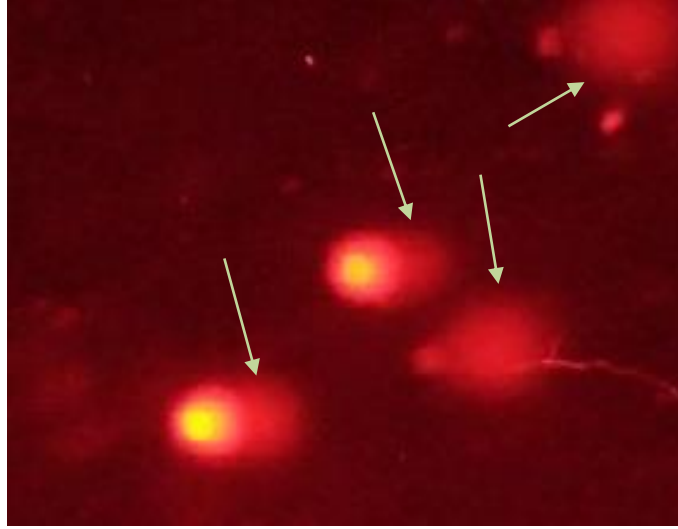
## 4. BULGULAR

Bu tez çalışması, tarım alanlarında kullanılan OD ve PM herbisitlerinin *E.hortensis* türü üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan toprak solucanları 6-8 cm arasında olanlardan seçilmiştir. 7 tane havalandırmalı plastik petriye 8'erli gruplar halinde konulmuştur. OD ve PM herbisitlerinden belirlenen dozlarda muamele edilip 48 saat bekletilmiştir. Süre sonunda her bir toprak solucanının baş kısmına 5 kez tahta çubuk ile dokunulmuş canlılık kontrolü yapılmıştır. Canlılık kontrol verilerine göre Probit analiz yöntemiyle LD<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Probit analiz sonucuna göre OD herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 0,255 ppm, PM herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 0,243 ppm olarak bulunmuştur. Uygulama dozlarının belirlenmesinde 0,5xLD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> değerleri çalışılmıştır. Kontrol grubu olarak her iki herbisit içinde saf su kullanılmıştır. Deneylerde fazla sayıda hayvan kullanılmaması, laboratuvar çalışma güvenliği ve çevresel kirletici oluşturmamak adına pozitif kontrol grubu çalışılmamıştır. Yapılan deneylerde DNA hasarın derecesinin belirlenmesi amaçlı Komet ve MN Test yöntemleri kullanılmıştır.

### 4.1 Komet Testine Ait Bulgular

#### 4.1.1 Oxadiazon Herbisiti İçin Komet Testi Bulguları

Çalışmamızda, OD herbisiti için LD<sub>50</sub> değeri 0,255 ppm olarak bulunmuştur. Komet testinde 0,5xLD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,1275 ppm, LD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,255 ppm ve 2xLD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,51 ppm' lik konsantrasyonlar 48 saatlik uygulama şeklinde çalışılmıştır. Her konsantrasyon 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Her preparattan toplam rasgele 100 hücrede komet skorlaması yapıldı (Resim 4.1). 48 saatlik uygulamadan sonra DNA hasar skorları görsel skorlama ile değerlendirildiğinde, negatif kontrol grubunda komet skorları 6,67±0,57, 0,5xLD<sub>50</sub> konsantrasyonda 9,33±1,15, LD<sub>50</sub> konsantrasyonda 18,67±1,15 ve 2xLD<sub>50</sub> konsantrasyonda ise 32,33±2,51 olarak bulunmuştur. En yüksek DNA hasar skoru 2xLD<sub>50</sub> uygulanan grupta gözlemlendi (Çizelge 4.1).



**Resim 4.1** Herbisit ile muamele edilmiş sölomasit hücrelerinde hasarlı DNA' lar

**Çizelge 4.1** OD herbisitinin *E. hortensis* sölomasitlerindeki DNA hasar skorları

OD Herbisitine Ait Uygulama	DNA Hasar Skorları ( $\pm$ SD)*
Konsantrasyonlar	
Kontrol	6,67 $\pm$ 0,57a
0,5xLD <sub>50</sub>	9,33 $\pm$ 1,15a
LD <sub>50</sub>	18,67 $\pm$ 1,15b
2xLD <sub>50</sub>	32,33 $\pm$ 2,15c

\*Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli.

LD<sub>50</sub> ve 2xLD<sub>50</sub> konsantrasyonları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirtilen konsantrasyonlarda, DNA hasarındaki artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu (p<0, 05).

#### 4.1.2 Pendimethalin Herbisiti İçin Komet Testi Bulguları

PM herbisiti için LD<sub>50</sub> değeri 0,243 ppm olarak bulunmuştur. Komet testinde 0,5xLD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,1215 ppm, LD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,243 ppm ve 2xLD<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 0,486 ppm' lik konsantrasyonlar 48 saat boyunca solucanlara uygulanmıştır. Kontrol olarak ise distile su kullanılmıştır. Her konsantrasyon 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Her preparattan toplam rasgele 100 hücrede komet skorlaması yapıldı (Resim 4.1). 48 saatlik uygulamadan sonra DNA hasar skorları görsel skorlama ile



değerlendirildiğinde, negatif kontrol grubunda komet skorları  $7 \pm 1$ ,  $0,5 \times LD_{50}$  konsantrasyonda  $7,67 \pm 0,58$ ,  $LD_{50}$  konsantrasyonda  $12,67 \pm 1,53$  ve  $2 \times LD_{50}$  konsantrasyonda ise  $15,33 \pm 1,15$  olarak bulunmuştur. En yüksek DNA hasar skoru  $2 \times LD_{50}$  uygulanan grupta gözlemlendi (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.2** PM herbisitinin *E. hortensis* sölomasitlerindeki DNA hasar skorları

PM Herbisitine Ait Uygulama	DNA Hasar Skorları ( $\pm SD$ )*
Konsantrasyonlar	
Kontrol grubu	$7 \pm 1a$
$0,5 \times LD_{50}$	$7,67 \pm 0,58a$
$LD_{50}$	$12,67 \pm 1,53b$
$2 \times LD_{50}$	$15,33 \pm 1,15c$

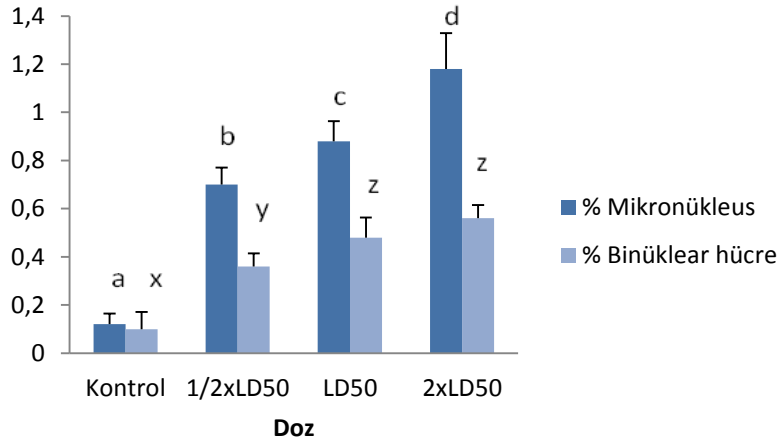
\*Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli.

## 4.2 Mikronükleus Testine Ait Bulgular

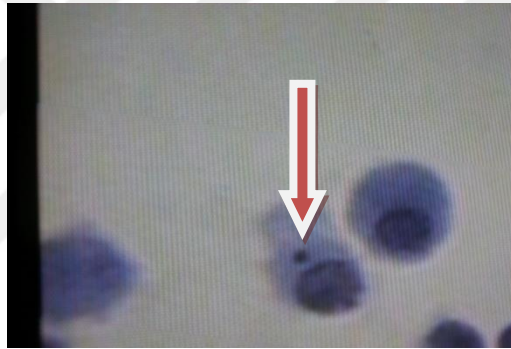
### 4.2.1 Oxadiazon Herbisiti İçin Mikronükleus Testine Ait Bulgular

OD herbisitinin her üç konsantrasyonu da konsantrasyon artışına bağlı olarak mikronükleus frekansını artırmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.3). OD herbisitinin her üç konsantrasyonu da konsantrasyon artışına bağlı olarak binükleer hücre frekansını artırmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.3).  $LD_{50}$  ve  $2 \times LD_{50}$  konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

**Çizelge 4.3** OD herbisitinin *E. hortensis* sölomasitlerindeki Mikronükleus ve Binükleer Oluşum Frekansları



\*Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli.

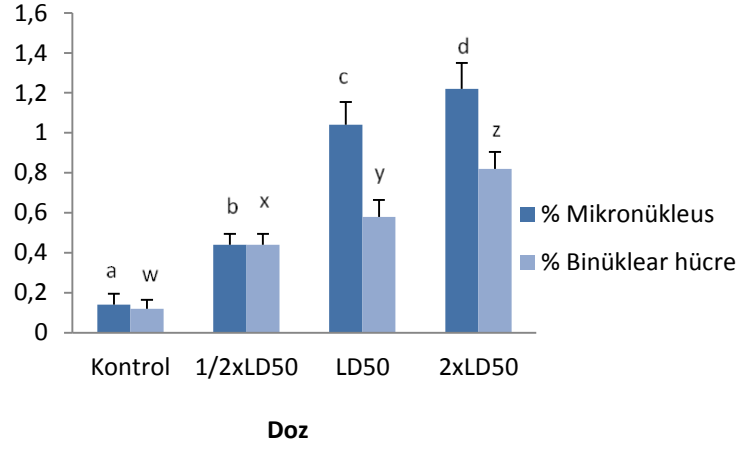


**Resim 4.2** *E. hortensis* sölomasitlerinde MN<sup>+</sup> li hücre (orijinal).

#### 4.2.2 Pendimethalin Herbisiti İçin Mikronükleus Testine Ait Bulgular

PM herbisitinin her üç konsantrasyonu da konsantrasyon artışına bağlı olarak mikronükleus ve binükleer hücre oluşum frekanslarını artırmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4** PM herbisitinin *E. hortensis* sölomasitlerindeki Mikronükleus ve Binükleer Oluşum Frekansları



**Resim 4.3** *E. hortensis* sölomasitlerinde binükleer hücre (orijinal).

Sonuç olarak OD ve PM herbisitlerinin *E. hortensis* sölomasitlerine yapılan çalışmalarda uygulanan konsantrasyonların çekirdek bölünme oranlarını düşürüp, MN oluşum sıklığında artış ve komet parametrelerinde ise istatistiksel olarak önemli artışa sebep olduğu ve genetik materyalde hasarı arttırdığı belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, daha çok soğan ve patates üretimi sırasında, tarım alanlarında yabancı ot çıkış öncesi ve çıkış sonrası olarak kullanılan OD ve PM herbisitlerinin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Genotoksisite testlerinden, DNA hasarını belirlemek için kullanılan hasas, hızlı ve ucuz sitogenetik bir yöntem olan Komet Testi çalışılmıştır. Yine yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerinin belirlenmesi ve tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir bir yöntem olan MN Testi kullanılmıştır.

Pestisitler, istenmeyen mikroorganizma, böcek, kemirici, istenmeyen ot ve mantar gibi zarar veren organizmaları ortadan kaldırmak ve bitki büyümesini düzenlemek amacıyla sarfedilen kimyasal veya biyolojik ürünlerdir (Ataman 2007, Arcak ve Haktanır 1998). Pestisitlerin doğa ve insan sağlığı üzerindeki negatif etkileri hakkındaki kaygılar 1960'lardan bu yana hala daha önemini korumaktadır (Carson 1962). O dönemden beri pestisitlerin riskleri ve faydaları hakkında olan tartışmalar hala devam etmektedir. Çalışmaların önemli bir kısmı pestisitlerin doğaya olan etkileri üzerine yapılmıştır. Dünya genelinde her yıl 2,5 milyon ton pestisit zirai mahsullere tatbik edilmektedir. Direkt olarak temas yoluyla veya hedef zararlılar tarafından kullanılan pestisit miktarı, uygulanan bu miktarın çok az bir yüzdesidir. 1970'ten bu yana dünyada ortalama olarak 28 milyon kg pestisit etken maddesi piyasaya sürülmüştür. Piyasaya sunulan bu etken maddelerin 900'ü aktif içerik ve 50.000'i ticari pestisit formülasyonunu içermektedir (Pan American Health Organization 2002). Haşereleri ve yabancı otları denetlemek için tarım alanlarında pestisit uygulamasının nedeni; üründen yüksek verim almak ve hasatta meydana gelebilecek zayıyatı en aza indirmektir. Tarımsal uygulamaların yanında pestisitlerin halk sağlığında, hijyen işlerinde, kırtasiyecilikte boyalarda ve yüzme havuzu sularında kimyasal karışımlar olarak kullanıldığı bilinmektedir (Al-Saleh 1994). Pestisitlerin bu alanlarda kullanılmalarıyla, insan vücuduna girip sağlığını tetikleyeceği, DNA'da mutlak bir harabiyete sebep olacağı riskini arttırmıştır (Ribas *et al.* 1996).

Zirai alanlarda pestisitlerin çok fazla miktarda tüketilmeleri, onların çeşitli test sistemleri ile genotoksik yönden araştırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Çok fazla

araştırmacı modern tarımda bitkilere zarar veren canlıları denetlemek maksadıyla kullanılan pestisitlerin mitotik ve mayotik hücre bölünmelerine etki ettiği ve birçok canlıda (insanlarda, hayvanlarda ve ekonomik önemi olan bitkilerde) genetik hasara sebep olduğunu rapor etmişlerdir (Ribas *et al.* 1996, Agrawal *et al.* 1996, Chauhan *et al.* 1998, Cicchetti *et al.* 1999, Soloneski *et al.* 2002, Zeljezic ve Garaj-Vrhovac 2004, D'Souza *et al.* 2005, Chauhan ve Gupta 2005). Birçok araştırmanın sonucunda pestisitlerin çok fazla alanda aktif olarak kullanılmakta olduğu, ekosistemdeki canlıları olumsuz yönde etkilediği ortadadır. Besin ağında önemli bir yere sahip olan toprak solucanları üzerinde de negatif etki yarattıkları bu çalışma ile gösterilmiştir.

Pestisitlerin rastgele ve yüksek dozda kullanılmalarının sonucu olarak, zararlıların yanı sıra birde faydalı canlılar ve ekoloji üzerindeki negatif etkileri pek fazla çalışmada bildirilmiştir (Çolak ve Dığrak 2000). Bizim çalışmamızda tarımsal mücadelede hala aktif olarak kullanılmakta olan OD ve PM herbisitlerinin özellikle patates ve soğan verimini arttırmasının yanı sıra, toprakta bulunan ve toprak kalitesinin belirleyicileri arasında ilk sırada yer alan toprak solucanlarının DNA'sı üzerinde hasara sebep olduğu bulunmuştur.

Türkiye'de tarımsal üretimin hızlı gelişiminin bir sonucu olarak tarım ilacı kullanımının (bilhassa sentetik pestisitler) gün geçtikçe artmasının sonucu, pestisite maruz kalmış mahsullerden insanların ve hedef dışı olan canlıların zarar görmemesi adına, pestisitlerin mutajenik etkilerinin araştırılması gerekmektedir (Badr 1986, Kligerman *et al.* 2000). Bu bilgi çalışmamızın ekoloji açısından önemini ortaya koymaktadır.

Günümüzde sarfedilen sentetik pestisitlerin canlılar üzerinde negatif etkilerinin mevcut olduğu bilinmektedir. Aşırı derecede toksik etkilerinin olduğu bilinen sentetik pestisitlerin zaruri tüketilmeleri halinde miktarlarının ve hedef alınan canlıların net olarak tespit edilmesi gerekmektedir (Raizada *et al.* 2001).

Solucanlar, topraklardaki hayvan biokütlesinin en önemli parçalarından biri olup "Ekosistem Mühendisleri" olarak adlandırılırlar (Blouin *et al.* 2013). Solucanlar toprağı havalandırarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemlerde görev almanın yanında

bitkilerin gelişimi için daha ideal bir ortam sağlayan canlılardır (Scullion *et al.* 2003, Shipitalo *et al.* 2004).

Toprak solucanları kendi yaşam ortamlarının kimyasal madde birikimlerini ortaya koymak ve bunların diğer canlılar üzerine olası etkilerinin belirlenmesinde indikatör (belirteç) canlılardır (OECD, 1984). Çalışmamızda MN ve Komet Testleri sonucunda toprak solucanlarına olumsuz etki eden konsantrasyonların besin ağı yoluyla ekosistemin en önemli unsurlarından biri olan insana dahi geçebileceği düşünülmektedir.

Toprak solucanlarının üremelerini negatif yönde etkileyen etmenlerin başında çevre kirliliği gelmektedir. Toprak solucanları toksik toprak kontaminasyonlarından etkilenen canlılar arasında ilk sırayı almaktadır. Birçok endüstriyel çalışma ve insanların sebep olduğu ağır metal kirlilikleri, kokon sayısını, yavru birey sayısını ve genç bireylerin yaşamlarını belirleyen önemli etmenlerdir (Savard vd. 2007, Maleri vd. 2007, Dominguez vd. 2012). Çok fazla herbisit toprağın içerisinde yaşayan canlılarda hasara sebep olduğu rapor edilmiş (Eijsackers 1980).

Sheryl L. Fuller-Espie (2010), dış ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye (8.4 - 67.6 mM) *in vitro* maruz kalma sonucu *E. hortensis* solomositlerinde apoptotik hücre ölümünü destekleyen verilere ulaşılmıştır. Çalışmamızda da herbisitlerin uygulanan konsantrasyonlarında genotoksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir.

Bazı pestisitlerin kullanımı sonucu, hedef dahilinde olmayan canlılar üzerinde istenmeyen etkiler oluşabilmekte. Toprakta bulunan bu pestisitlerin toprak içerisinde yaşayan canlılara olan etkilerini inceleyen çok fazla çalışma bulunmaktadır. Bunlar bilhassa pestisitlerin agroekosistemlere tatbik edilmesiyle alakalıdır. Kimyasal kirleticilerle ilgili olarak, çevre ile etkileşimleri, sınıflara ayrılmaları ve bütünleşmeleri hakkında daha geniş araştırmalara ihtiyaç vardır (Edwards *et al.* 1996, Edwards *et al.* 1998, Morgan ve Knacker 1994). Bu araştırmalar ışığında çalışmamızın tarım alanlarında ürün verim ve kalitesini arttırmak amaçlı, söz konusu herbisitlerin kullanımları sonucunda toprak faunasında hedef dışı olan toprak solucanlarında

istenmeyen etkilerinin ortaya konulmasıyla literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geniş zamanlı beslenme araştırmalarında kemirgenlerde OD ile indüklenen karaciğer büyümesi ve spektrumu; nekrozis, hepatoselüler hipertrofi ve bir lipofuscin birikimi, kemirgen peroksizom proliferatörlerine benzer etki oluşturur (Reddy *et al.* 1982, Butler *et al.* 1988). Bir başka çalışmada OD'nin karaciğer tümörlerine sebep olduğu bildirilmiş, sıçanlar ve fareler ile gerçekleştirilen araştırmalarında genotoksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir (Carmichael and Richert 1993). OD kuşku duyulan bir onkojen olup (Mattern *et al.* 1991) orta dereceli akut toksiktir ve hepatik porfiriye sebebiyet verir (Von Burg 1994).

Babiker ve Ahmet (1986), soğan üretimi sırasında yabancı ot kontrolünün sağlanması ile ilgili yaptıkları çalışmada OD (1. 1-1. 3 kg/ha), PM (1. 2-1. 8 kg/ha), Oxyfluorfen (0.14-0.43 kg/ha) ve Chlorthal-dimethyl (8. 3-13. 1 kg/ha) konsantrasyonlarında uygulamalar yapmışlardır.

PM N-nitrozo bileşikleri ve nitrozamin safsızlıkları bulundurur. N-nitrozo bileşikleri insanda olası karsinojen olarak gruplandırılır. PM ile yedi seneden daha az süreyle karşı karşıya kalan tarım çalışanlarında meydana gelen pankreas kanseri hadiseleri incelenmiş ve PM' nin S pankreas kanserine yakalanma oranını anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür (Andreotti *et al.* 2009). Çalışmamızda PM herbisitinin yalnızca 48 saat süreyle toprak solucanına uygulanması neticesinde Komet ve MN test sistemleri ile değerlendirildiğinde her iki test sonucunda da DNA üzerinde hasar meydana gelmiştir.

Umeda vd. (1999b), Arizona'da yapmış oldukları araştırmalarda çeşitli ot öldürücü ve sulama kombinasyonlarının soğanda oluşturdukları zehir etkisini ve soğan verimine olan etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları incelemelerde PM' nin çıkış öncesi olarak 0.25 - 0.50 lb AI/A miktarlarında ve kombine bir şekilde sulama yapılırken kullanıldıklarında da soğanlarda hiçbir zehir etkisi gözlemlenmemiş olduğunu ve soğan veriminde de bir düşüşün olmadığını rapor etmişlerdir. Ancak PM' nin 0.50 lb AI/A miktarında yağmurlama ve sulama birlikte yapıldıklarında, verimde az miktarda

uygulandıklarında ya da ilaç kullanılmayan kontroller ile karşılaştırıldıklarında verimin gözle görülür bir şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. PM' nin 0.50 lb AI/A miktarında kullanılması zehir etkisi yaratmakta ayrıca verimde düşüşün yaşanmasına sebebiyet verdiğini rapor etmişlerdir. PM ile Bensulide'nin kombine olarak çıkış öncesi uygulanması durumunda zehir etkisi oluşturmadıklarını ve verimde düşüşün yaşanmadığını rapor etmişlerdir. PM 0.25 lb AI/A miktarı ile Bensulide'nin 4.0 lb AI/A miktarlarında birlikte kullanılması ile *Malva parviflora*, *Melilotus officinalis*, *Sonchus oleraceus* ve *Sisymbrium irio* gibi istenmeyen otları yeterli miktarda baskı altına almış ancak PM' nin miktarı 0.50 lb AI/A ya da Bensulide'nin miktarı 6.0 lb AI/A'ya yükseltip kombinasyonlarla karşılaştırıldığında istenmeyen otları yeterince baskılamadığını rapor etmişlerdir.

Çin hamster over hücrelerinde yürütülen bir araştırmada, hücreler 10, 100, 1000 ve 10000 Mm dozlarında PM ile 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Skorlar, standart sapmayla beraber % mitokondri işlerliği olarak sunulmuştur. 1000 µM dozunda PM' ye maruz bırakılan Çin hamster over hücrelerinde mitokondrinin işlerliği % 65'e, 10 000 µM dozunda PM'ye maruz bırakılan Çin hamster over hücrelerinde mitokondri işlerliği % 54'e inmiştir. Çin hamster over hücrelerinde 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 µM dozlarında PM' nin sebebiyet verdiği DNA harabiyeti kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve % kuyruklu DNA niceliği yönünden bakılmıştır. DNA hasarı kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve % kuyruklu DNA niceliği yönünden bakıldığında ise 0. 1, 10 ve 100 µM dozlarındaki PM' nin Çin hamster over hücrelerinde DNA harabiyetini artırdığı rapor edilmiştir (Patel *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda *E. hortensis* sölomasitlerinde PM' nin 0,1215 ppm, 0,243 ppm ve 0,486 ppm' lik konsantrasyonlarında DNA kuyruk uzunluğunda artış olduğu gözlemlendi.

Tabassum vd. (2015), PM herbisitinin ölümcül olmayan 0.5 ve 0.8 ppb dozlarına *Channa punctata* Bloch üzerinde balık beyinde epinefrin düzeylerinde değişikliğe neden olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında dokuda farklı kimyasal parametreleri etkileyerek PM' nin toksik potansiyele sahip olduğu sonucuna varmışlardır.



Irshad ve Masood (2015), tatlı su balığı olan *Channa punctatus*' ta PM herbisitinin LC<sub>50</sub> dozunu 3,6 mg/lit olarak tespit etmişlerdir. Balıkta meydana gelen genotoksisite ve oksidatif stresin değerlendirilmesi için 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle PM'den 0,9 mg/lit, 1,8 mg/lit ve 2,7 mg/lit dozlarını kullanmışlardır. PM' nin Komet Testi sonucu olarak solungaçlarda, eritrositlerde ve karaciğer hücrelerinde p<0.001 yüksek DNA hasarına neden olduğunu tespit etmişlerdir. MN frekanslarının anlamlı derecede olmadığını ve eritrosit nükleer anormalliğinin anlamlı artış gösterdiğini ve genotoksik etkinin belirlendiğini bildirmişlerdir.

Bulgularımızı destekler mahiyette PM'in fare kemik iliği hücresinde kromozomal harabiyete ve MN oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Holland *et al.* 2002).

Xue-lian vd. (2010) tarafından, PM ve Clethodim herbisitlerinin *in vitro* kemik iliği hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir.

Saravanan vd. (2017), Güney Kore'de yaygın olarak kullanılan herbisitler olan butaklor ve OD' nin toksik etkileri üzerine çalışmışlar ve biyokimyasal-hematolojik parametreler üzerine etkilerini ortaya koymuşlardır.

Imanaka vd. (1981), Kojima Gölü' nden topladıkları sazanalarda sırasıyla 0.442 ppm, 0.046 ppm ve 0.017 ppm değerlerinde OD kalıntısı olduğunu tespit etmişler ve OD' nin balıklarda güçlü bir kalıcılığa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Tabassum vd. (2016), PM herbisitinin ölümcül olmayan 0. 5 ve 0. 8 ppb dozlarını *Channa punctata* Bloch'a uygulamışlar biyokimyasal belirteçler ve histopatolojik indeksleri incelemişlerdir. Oksidatif stres göstergeleri yanı sıra antioksidan savunma parametrelerinde hasara sebep olduğu sonucuna varmışlardır.

Bulgularımıza benzer bir şekilde Promkaew vd. (2010), yapmış oldukları çalışmada PM'nin mısırdaki EC<sub>50</sub> değerini 0,04 ml/lit ve soğanda EC<sub>50</sub> değerini 0,16 ml/lit olarak tespit etmişlerdir. PM' nin mitotik indeksi ve kromozomal anormallik frekansında artışa neden olduğunu ve toksik-genotoksik bir herbisit olduğu kanısına varmışlardır.

Greenlee vd. (2004), yapmış oldukları araştırmalar neticesinde PM' nin erkek ve dişi sıçanlarda tiroid foliküler hücre adenomlarına neden olduğunu ve insanda muhtemel bir kanserojen olduğunu, ayrıca endokrin sistemi etkileyeceğine dair şüphelerin varlığını bildirmişlerdir. PM' nin ağız yoluyla 125, 250, 500 mg/kg/gün olarak sıçanlara ve tavşanlara uygulanmasının ardından toksisitenin ve mortalitenin arttığını, yeni doğanlarda yavru vücut ağırlığına ve sağ kalıma bakılarak en yüksek dozun sıçanlarda 500 ppm' de olduğu bilgisini verilmişlerdir. Ayrıca düşük dozda PM' ye maruz bırakılan fare embriyolarında apoptoz yüzdelerinin arttığını da bildirilmişlerdir.

PM' nin gök kuşağı alabalığında LC<sub>50</sub> dozu 0,14 mg/lt, güneş balığında 0,2 mg/lt olarak ve suya asılı gıda ile PM maruziyeti sonucu *Daphnia*'da ise LC<sub>50</sub> dozu 78 mg/lt olarak tespit edilmiştir ( Kidd and James 1991). PM' nin kuşlardaki akut toksisitesi düşüktür ve akut oral LD<sub>50</sub> değeri ise 1421 mg / kg'dır (EPA 1985).

Genotoksik ajanların canlılar üzerindeki toksik etkilerinin anlaşılması, DNA üzerindeki hasarın derecesinin belirlenmesi için Komet ve Mikronükleus Test sistemlerine ihtiyaç vardır. Komet testi kimyasalların zararlı olup olmadığı konusunda ya da suda yaşayan canlılarda meydana gelen genotoksik etkilerin takibinin yapılmasında, sonuçlandırılmasında kullanılmaktadır (Simoniello *et al.* 2009).

Komet testi, yaşamını toprak içerisinde sürdüren canlılara tatbik edilerek karasal ekosistemde genotoksik bileşiklerin tayin ve takip edilmesinde önemli bir parametredir (Salagovic *et al.* 1996). Toprak solucanları, toprak içerisinde yaşayan canlılar ve toprağın kirliliği hakkında bilgi veren özel canlılardır (Ciğerici 2015). İçerisine kimyasal bulaşmış topraklardan alınan *Eisenia foetida* sölomasitlerinde konsatrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarının arttığını bildirmişlerdir. Toprak solucanlarının (*Eisenia foetida*) içerisinde kirli kömür bulunduran alandan alınmış toprağa, endüstri kalıntılarıyla kirlenmiş alanlara (Xiao *et al.* 2006) ve kirlenmiş olan nehirlerden alınan çökelti numunelerine maruz bırakıldıklarında; sölomasitlerindeki DNA hasar derecesinin arttığı bildirilmiştir (Rajaguru *et al.* 2003).

Komet testi, genetik materyalde hasara meyilli olan yabancı ot ilaçları ve pestisitlerin (Bony *et al.* 2010) hasar meydana getirme olasılıklarının incelenmesinde kullanılmıştır (Pandey *et al.* 2011). Çok fazla araştırmacı, farklı hücre hatları ile farklı kimyevi maddelerin *in vitro* ya da *in vivo* genotoksisite / antigenotoksisitesinin incelenmesi amaçlı Komet testini kullanmıştır (Valentin-Severin *et al.* 2003; Ciğerci *et al.* 2015, Ciğerci *et al.* 2016).

Zhan ( 2012), AgNP ve AgNO<sub>3</sub> nanopartiküllerinin *A. caliginosa* sölomasitinde Komet testi sonucunda sölomasit DNA'sında hasar oluşturduğunu saptamışlardır.

MN'ler hücre bölüneceği zaman asıl çekirdek dışında tam bir kromozom ya da asentrik kromozom fragmentlerinden meydana gelir. Sitokinezi-blok MN yöntemi; hücrelerin kimyasal ile etkileşiminin ardından yalnızca ilk bölünmede, ortaya çıkan hücrelerin çift çekirdekli görünüşüyle MN'lerin bilinmesini (Fenech and Morley 1985), MN yöntemi neticesinde meydana gelen hücrelerin sayılmasının avantajı; çok fazla hücrenin sayılmasını, kimyasal uygulanmış hücreler ile kontrol hücreleri arasında çok az değişikliğin olduğunun saptanmasını sağlar. Bu bağlamda Elhajouji *et al.* 1995 senesinde yapmış olduğu araştırması neticesinde; MN yöntemi ile farklı pestisitlerin ve ilaçların genotoksisite testlerinde klastojenik ve aneugenik sonuçlar doğuracak düzeyleri belirlenebilmektedir (Natarajan 2002).

Sonuç olarak, çevremizde zirai mücadelede kullanılan birçok kimyasal madde, ekosistemde çeşitli olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu etkiler kullanılan kimyasalların yapısına, uygulama şekline, dozuna ve hedef organizmaya göre değişiklik gösterir. Netice itibariyle bu kimyasallar çeşitli türleri olumsuz etkileyerek ekosistem dengesinin, insan ve çevre sağlığının bozulmasına yol açabilirler. Karasal ekosistemin önemli organizmalarından biri olan toprak solucanları üzerinde ortaya çıkabilecek bu olumsuz etkiler, beraberinde birçok canlının da olumsuz etkilenmesine neden olurlar. Dolayısıyla organizmaların asıl işlevlerini yerine getirememeleri ile birlikte zamanla tarımsal verimin de azalmasına yol açacaktır. Çalışmamızda, söz konusu herbisitlerin kullanımının devam ettiği tarım alanlarında toprak solucanlarının DNA'sı üzerinde hasara sebep oldukları sonucuna varıldı. Araştırmaların sonucu olarak çalışılan

pestisitlerin hedef dışı başka organizmalara da zarar verebileceği dışuncesini uyandırmaktadır. Gelecekte yapılacak olan ekotoksikolojik çalışmalara kaynak teşkil etmesi ve pestisitlerin tarım alanlarında bilisizce kullanımının önüne geçilmesine yeni bir bakış açısı kazandırarak, literatüre önemli katkılar sağlayacağı dışnlmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K. and Panda, B.B. (2008). Aluminium induces oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 30-310.
- Akyıl, D. (2012). Bazı Pestisitlerin Mutajenite ve Genotoksitelerinin Belirlenmesi Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Albertini, R.J. Anderson, D., Douglas, G.R., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F. a.t. Natarajan, H., Norppa, D.E.G., Suhaker, R., Tice, M.D. and Waters, A.A. (2000). ‘’ IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans’’. *Mutat Res*, **463**: 11-172.
- Ames BN, M.J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity. *Mutant Res*, **31(6)**: 347-364.
- Anderson, D. (1988). ‘’Human Biomonitoring’’, *Mutant Res*, **204**: 353-541.
- Angelis, K.J., McGuffie, M., Menke, M. and Schubert, I. (2000). Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **36**: 146-50.
- Anonim, 2004. İkinci Tarım Şurası, 3. Komisyon Raporu, Ünver, S., Sade, B., Mamak, F., Özdem, A., Bitki Yetiştiriciliği Bitki Koruma Çevre Sağlığı.
- Arias-Estevez, M., Lopez-Periago, E., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Juan-Carlos, M. and Garcia-Ri, L. ( 2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **123**: 247-260.

- Arnold, E.K. (1989). Pharmacokinetics of Chlorinated Phenoxy Acid *Herbicides*, *Veterinary Human Toxicology*, **31**: 121-125.
- Ataman, R.P. (2007). Tarımsal İlaç Kullanımının Gıda Güvenliği Açısından Önemi ve Gıda Sanayine Etkileri. I. Çukurova'da Sanayileşme Sempozyumu. ISBN: 978-9944-89-420-3, Kasım 2007.
- Babiker, A.G.T., and Ahmed, M.K. (1986). Chemical Weed Control in Transplanted Onion (*Allium cepa* L.) in the Sudan Gezira ( Abstract). *Weed Rserch*, Volume 26, Page: 133.
- Badr, A. (1986). Cytologia, effects of the S-Triazine herbicide Turbutryn on mitosis, chromosomes and nucleic acids in root of *Vicia faba*, **51**: 571-577.
- Baker, G.H., Carter, P.J. and Baret, V.J. (1999). Influence of eartworms, *Apporectodea spp.* (*Lumbricidae*), on pasture production in South-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, **50**: 1247-1257.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş. ve Alvur, M. (2004). ‘‘DNA hasarı analizinde  $\mu$ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması’’, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2(3)**: 97-103.
- Beg, T., Siddique, Y.H, Ara, G., Gupta, M. and Afzal, J. (2009). Protective action of EGCG aganist anticancer drugs MMS and CP. *Internet Pharmacol*, **6(2)**: 1-7.
- Belotti, E. (2009). Assesment of soil quality criterion by means of a field survey, *App. Soil Ecol*, 1998; **10**: 51-63.ryn, M.R.
- Benedicte, R.A., Johanna, W., Kathryn, M.R., Sören, W., Virginia, M.C.L., Rickard, A. and Stefan, J. (2009). Large scale geographic clines of parasite damage to *Populus tremula* L. *Ecography* **33**: 483-493. **Doi**:10.1111/j.1600-0587.2009.05982.x

- Blair, A., Axelson, O., Franklin, C., Paytner, O.E., Pearce, N., Stevenson, D., Trosko, E., Vainio, H., Williams, G., Woods J. and Zahm, S.H. (1990). *Carcinogenic Effect Of Pesticides. In: The Effects Of Pesticides On Human Health*, (Baker, S.R., Wilkinson, C.F., Eds.), pp. 201-243 Princeton Scientific Publication Co, USA.
- Blognesi, C. and Morasso, G. (2000). Gnototoxicity of pesticides: Potential risk for consumers. *Trends Food Sci. Technol*, **11**: 182-187.
- Boesh, R., Buys, M., Depaire, H., Laurent, M. and Mazuret, A. (1974). Metabolic fate of the herbicide oxadiazon in rat and dog. Presented at the Third International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC), Helsinki, Finland, July.
- Butler, E. G., Tanaka, T., Ichida, T., Maruyama, A.P.L., and Williams G.M. (1988). Induction of hepatic peroxisome proliferation in mice by lactofen, a diphenyl ether herbicide. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **93**, 72-80.
- Carmichael, N.G., and Richert, L. (1993). Oxadiazon: Mechanism of hepatocarcinogenesis and implications for risk assessment. Internal document of Rhone Poulenc Agro. Lyon, France.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T. (1988). "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutant Res*, **204**: 379-406.
- Carson, R.L. (1962). *Silent Spring*, Riverside Press, Cambridge, MA, USA.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N. and Gupta, S.K. (2005). Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa*. *Sci. Total Environ*, **347**: 46-52.
- Chen, J., Ma, J., Cao, W., Wang, P., Tong, S. and Sun, Y. (2009). Sensitivity of Green and Blue-green Algae to Methyl Tert-butyl Ether, *Journal of Environmental Sciences*, **21**: 514-519.

- Choy, W.N. (2001). "Genetic toxicology and cancer risk assesment", *Marcel Dekker*, New York, 29-187.
- Cigerci, I.H., Liman, R., Ozgul, E. and Konuk, M. (2015). Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests. *Cytotechnology*, **67**: 157-163.
- Çiğerci., İ.H, Ali M.M, Kaygısız, Ş.Y. and Liman R. (2016). Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, **144**: 754-7.
- Cilgi, T., Jepson P.C. (1992). The direct exposure of beneficial invertebrates to pesticide sprays in cereal crops. *Ann. App. Biol.* **121**: 239-247.
- Collotta, M., Bertazzi, P. A. and Bollatti, V. (2013). Epigenetics and Pesticides, *Toxicology*, **307**: 35-41.
- Courshee, R.J. (1960). Some aspects of the application of insecticides *Ann. Rev.ent.*, **5**,327-352.
- Çotuk, A. (1979). The effect of the earthworm extract on the sarcoma tumor, *in vivo*, *Rev. Fac. Sci. Univ. Ist. Serie B*, **44**: 149-153.
- Delen, N. (2008). Fungisitler. Nobel Yayın Dağıtım. *Nobel Yayın No: 1360*: Ankara Kasım.
- Demirel, S. ve Zamani, A. (2002). MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, **12(3)**: 123-7.
- Demirsoy, A. (2002). Genel zoocoğrafya ve Türkiye zoocoğrafyası 'Hayvan coğrafyası', Metaksan A.S., Ankara, 1007s.



- Denizeri, D.N. (2001). Yuvacık Barajını Besleyen Derelerdeki Pestisitler, GC-MS Analizleri İleri Arıtım Prosesleri. Yüksek Lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Dığrak, M., Çolak, F. (2000). ‘‘Chlorsulfuron ve Metolachlor’un toprak mikroorganizmaları üzerine etkisi’’, GAP Çevre Kongresi, Bildiriler Kitabı, 1. Cilt, Sayfa 295-304, Şanlıurfa, 16-18 Ekim 2000.
- Dikilitaş, M., Kocyiğit, A. (2010). Canlılarda ‘‘tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik no): comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 77-89.
- Dikilitaş, M., Kocyiğit, A. ve Yiğit, F. (2009). A. molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8(14): 3118-3127.
- Dinçer, Y, Akçay, T. (2000). DNA Hasarı, *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(2): 73-79.
- Doak, SH, Liu, Y. and Chen, C. (2012). Genotoxicity and Cancer. Adverse Effects of Engineered Nanomaterials 1st ed., Edited by Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova A. *Academic Press*, USA, PP. 243-261.
- Dolapsakis G., Vlachonikolis I.G., Varveris C. and Tsatsakis A.M., (2001).’’ Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete’’, *European Journal of Cancer*, 37: 1531- 1536.
- Duffus, J.H. and Worth, H.G.J. (2006). Fundamental toxicology, *Royal Society of Chemistry*, 409 p.
- Ecobichon, D.J. (1997). The basis of toxicity testing (2nd ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, FL, p. 49.

- Edwards, C.A., Knacker, T., Pokarzhevskii, A.A, S. and Parmele, R. (1996). USE of soil microcosms in assessing the effect of pesticides on soil ecosystems, Proc. Int. Symp. on Env. Behavior of Crop Protection Chemicals, International. Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 435-452.
- Edwards, C.A., Knacker, T. and Pokarzhevskii, A. (1998). The prediction of the fate and effects of pesticides in the environment using tiered laboratory soil microcosms, Proc. Brighton Pesticide Conf., Pests and Diseases AC-1 :267-272.
- Eijsackers, H. and Van de Bund, C.F. (1980). Effects on soil fauna, in Interactions between herbicides and the soil, ed by HanceRJ, Academic Press, London, pp 255-305.
- EPA. (1985). Chemical fact sheet for: Pendimethalin, March.
- Evans, H.J. (1984). ‘‘Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests’’, In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., Handbook of Mutagenicity Test Procedures, *Elsevier Science*, Amsterdam, 405-427.
- Fenech, M. (2010). ‘‘The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry’’, *Health Phys*, 98(2): 234-243.
- Fenton, J.J. (2002). *Insecticides, Toxicology A case- Oriented Approach*, Chapter 17: 295-301, CRC Pres, Florida, USA. ISBN 0-8493-0371-0.
- Fidan, A.F. (2007). Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerde Ekilerinin Araştırılması (Doktora Tezi), Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1.

Gascon J., Oubina A. and Barcelo D. (1997). ‘‘ Trends Anal. Chem.’’ **16**: 554.

Gazioğlu-Şensoy, R.İ., Ersayar, L. ve Doğan, A. (2017). Van İlinde Satılmakta Olan Yaş ve Kuru Üzümler İle Salamura Asma Yapraklarında Pestisit Kalıntı Miktarlarının Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Van, Türkiye.

Gichner, T., Mukherjee, A. and Veleminsky, J. (2006). DNA staining with the fluorocromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and Dnase-I. *Mutation Research*, **605**: 17-21.

Gichner, T., Znidar, I. and Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, **652**: 186-190.

Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D. ve Plewa, M.J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: The Comet Assay in Toxicology Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. *Royal Society of Chemistry*, p: 98-119.

Greenlee, A.R., Ellis, T.M. and Berg, R.L. (2004). Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environmental Health Perspectives*, **112(6)**: 703-9.

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, LE., Norppa, H. and Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkes and Health (ESCH). *Cancer Res*, **58(18)**: 4121.

Haktanır, K., Arcak, S. (1998). Çevre Kirliliği Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, **(457)**: 1503.

- Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C. (1991). *Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards*, University of California Pres.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. and Tice, R.R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18, 45-51.
- Holland, N.T., Duramada, P., Rothmanb, N., Figgsc, W.L., Blairb, A., Hubbardd, A. and Smitha, M.T. (2002). Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research*, **521**: 165-178.
- Irshad, A. and Masood, A. ( 2015). Fresh Water Fish, *Channa punctatus*, as a Model for Pendimethalin Genotoxicity Testing: A New Approach toward Aquatic Environmental Contaminants. Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh Uttar Pradesh 202002, India.
- Jena, G.B. Kaul, C.L. and Ramarao, P. (2002). “Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines”, *Indian Journal of Pharmacology*, **34**: 86-99.
- Kılıç, A.Y. (2007). Omurgasız hayvanlar sistematiği ve biyolojisi, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 363s.
- Kızılkaya, R. (2005). The role of different organic wastes on zinc bioaccumulation by earthworm *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta) in successive Zn added soil *Ecological Engineering*, **25**: 322–331.
- Kidd, H. and James, D.R.E. (1991). *The Agrochemicals Handbook*. The Royal Society of Chemistry Cambridge, UK.

- Kirsch-Volders, M. Vanhauwaert, A. Eichenlaub-Ritter, U. and Decordier, I. (2003). ‘‘Indirect mechanisms of genotoxicity’’, *Toxicol Lett*, **140-141**: 63-74.
- Kligerman A.D., Doerr C.L., Tennant A.H. and Peng, B. (2000). Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutation Research*, **471**: 107.
- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. and Erel, O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with *Cutaneous leishmaniasis*. *Mutation Research*, **585**: 71-78.
- Labay, K., Ould-Elhkim, M., Kles, V., Guffroy, M., Poul, JM. And Sanders, P. (2001). Effects of griseofulvin in *medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat*. *Teratog Carcinog Mutagen*, **21**: 441-51.
- Lambkin, D.C., Gwilliam, K. H. Layton, C. Canti, M. G. Pearce, T.G. and Hodson, M.E. (2001). Soil pH governs production rate of calcium carbonate secreted by the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Applied Geochemistry*, **26**: S64-S66.
- Laszczyca, P., Augustyniak, M., Babczyn’ska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G. and Witas, I. (2004). Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland), *Environment International*, **30**: 901-910.
- Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., Von Halle E.S., Würgler F.E. and Zimmering S. (1983) .The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, A report of the U.S. *Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*. *Mutant Res.*, **123(2)**: 183-279.
- Lingenfelter, D. D and Hartwing, N. L. (2003). Introduction to Weeds and Herbicides. The Pennsylvania State University, 112 Agricultural Administration Building, University Park, PA 16802.

- Liu Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D. and Dong, L. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene, *Ecotoxicology*, **Doi**: 10.1007/s10646-010-0540-x.
- Ma, T.H. (1981). "Tredescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening", *Environmental Health Perspective*, **37**: 85-90.
- Ma, W.C. and Tamage, S. (2001). Insectivora. In: R.F. Shore and B.A. Rattner, Editors, *Ecotoxicology of Wild Mammals*, Wiley, New York, 123-158.
- Imanaka, M., Matsunaga, K., Shigetani, A. and Ishida T. (1981). Oxadiazon Residues in Fish and Shellfish. *Ohayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health*, Uchio, Ohayama 701-02, Received June Japan.
- Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Zobel, B.L., De Meo, M.P. and Collins, A. (1993). THE Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay), A European Review. *Mutation Research*, **288**: 47-63.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P., Decordier, V. and Kirsch-Volders, I. M. (2006). "Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring", *Biochimie*, **88**: 1515-3
- Mattern, G.C., C-H. Liu, J.B. Louis, and J.D. Rosen. (1991). GC/MS and LC/MS determination of 20 pesticides for which dietary oncogenic risk has been estimated. *J. Agr. Food Chem*, **39**: 700-704.
- Mavournin, H.K. Blakey, H.D. Cimino, C.M. Salamone, F.M. and Heddle, A.J. (1990). "The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Genotoxic Program", *Mutat Res*, **239**: 29-80.

- Mısırlıoğlu, M. (2001). Doğanın gönüllü bahçıvanları: toprak solucanları, *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, **408**: 78-80.
- Mısırlıoğlu, M. (2011). Toprak Solucanları Biyolojileri, Ekolojileri ve Türkiye Türleri. Nobel Yayın, ISBN: 978-605-395-447-7.
- Montoro, A., Soriano, JM., Barquinero, JF., Almonacid, M., Montoro, A., Verdu, G., Sahuquillo, V., Villaescusa, JI. and Sebastia, N. (2012). Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, **50(2)**: 216-221.
- Morgan, E. and Knacker, T. (1994). The role of laboratory terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances, *Ecotoxicology* **3**: 213-233.
- Mortelmans, K. and Rupa, S.D. (2004). ‘‘Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists’’, *Adv Appl Microbiol*, **56**: 379-401.
- Muangphra, P. and Gooneratne, SR. (2011a). comparative genotoxicity of cadmium and lead in earthworm coelomocytes. *Journal of Applied and Environmental Soil Science Article*, ID 218929 , pp. 1-7, **doi**:10.1155/2011/218929.
- Muangphra, P. and Gooneratne, SR. (2011b). Toxicity of commercial neem extract to earthworm (*Phretima peguana*). *Journal of Applied and Environmental Soil Science Article*, ID 925950, PP. 1-8, **doi**:10.1155/2011/925950.
- Muangphra, P., Kwankua, W. and Gooneratne, SR. (2012). Genotoxic effects of glyphosate and paraquat on earthworm coelomocytes. *Environmental Toxicology* (in the pres).
- Naccarati, A., Molinu, S., Mancuso, M., Siciliano, G. and Migliore, L. (2000). Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci*, **21**: 963-5.

- Navalón, A., Prieto, A., Araújo, L. and Vilchez, J.L. (2002). *Chromatogr. A* 946 p. 239.
- OECD, (1984). Earthworms acute toxicity test, Guidelines for testing of chemicals, OECD, Test no. 207, Paris, 9 p.
- Olive, P.L., Banath J.P., D. and R.E. (1990). Heterogebeity in in radiationinduced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiation Research*, 122, 86-94.
- Ongley, E.A. (1996). Control of Water Pollution from Agriculture – FAO Irrigation and Drainage Paper 55. *Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.*
- Östling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophretic study of radiationinduced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**:291-298.
- Öztürk, S. (1997). Tarım İlaçları. 2. Baskı, Ak Basımevi. s: 127-132. İstanbul.
- Park, E. and Kang, M.H. (2004). Smoking and high plasma triglyceride levels as risk factors for oxidative DNA damage in the Korean population. *Annals Of Nutri And Metabolism*, **48**: 36-42.
- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A. (2007). In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicology in Vitro*, **21**: 1409-1418.
- Perkins J.H. (1978). ‘‘*Technology and Culture*’’, 19(2): 169-186.
- Pierzynski, G., Sims, J. T. and Vance G.F. (1994). *Soils and Environmental Quality*. Lewis Publisjer, USA, 192-193, 198, 199pp.



- Plunke, K. (2004). Pendimethalin Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs., 67p. <http://www.epa.gov/espp/effects/pendimeth/analysis.pdf>.
- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, G.J., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S. and Wassom, J.S. (1981). ‘‘ Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA’s Gene-Tox Program’’, *Mutant Res*, **87**: 143-88.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). ‘‘Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells’’, *Mutant Res*, **189**: 157-65.
- Promkaew, N., Soontornhainaksaeng, P., Sampatong, S. and Rojanavipart, P.(2010). Toxicity and Genotoxicity of Pendimethalin in Maize and Onion. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, **44**: 1010-1015.
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E.J., Ashby, J.A. Anderson, D., Lefevre, P.A. Westwood., F.R. (1979). ‘‘An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens’’, *Brit J. Cancer*, **37**: 873-959.
- Rai , M., Yadav, A. and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as antimicrobials. *Biotech Adv.* 27, 76-83.
- Raizada, R.B., Srivastava, M.K., Kaushal, R.A. and Singh, R.P. (2001). Azadirachtin, a neem biopesticide: Subchronic toxicity assessment in rats. *Food Chem. Toxicol*, **39**: 477-483.
- Reddy, J. K., Lalwani, N. D., Reddy, M. K., and Qureshi, S.A. (1982) Excessive accumulation of autofluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic perxisome proliferatos. *Cacer Res.*, **42**: 259-266.

- Rojas, E., Lopez, M.C. and Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **722**: 225-54.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F. and Ribera, D. (1998). Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 35,4, 602-614.
- Sarabia L., Maurer, I. and Bustos-Obregon E. (2009). ‘‘Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis’’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (938-942).
- Sardas, S., Izdes, S. and Ozcagli, E. (2006). The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Inter Archives Of Occupa And Environ Health*, **80**: 154-159.
- Saravanan, M ., Kim, Ji-Yoon., Hur, Kyung-Jin. Ramesh, M. and Hur, Jang-Hyun (2017). Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to different concentrations of butachlor and oxadiazon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11 (2017) 275–281.
- Sasaki, Y.F., Sekilhaslı, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K. and Tsuda, S. (2000). The Comet Assay eith Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Result and Carcinogenicity with 208 Chemicals Slected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Critical Reviews in Toxicology*, **30**: 629-799.
- Savage, J.R.K. (1993). ‘‘Uptade on target theory as applied to chromossomal aberrations ‘’, *Env Mol Mutagen*, **22**: 198-207.
- Savard, K., Berthelot, Y., Auroy, A., Spear, A., Trottier, B. and Robidoux Y.P. (2007). Effects of HMX-Lead Mixtures on Reproduction of the Earthworm *Eisenia andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol*, **53**: 351-358.

- Savin, M.C., Görres, J.H. and Amador, J.A. (2004). Microbial and microfaunal community dynamics in artificial and *Lumbricus terrestris* (L.) burrows. *Soil Science Society of America Journal*, **68**: 116-124.
- Saygı, S. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi, *Gülhane Tıp Dergisi*, **45(3)**: 291-298.
- Schmid, W. (1975).The micronucleus test. *Mutant Res*, **31**: 9-15.
- Sezgin, E. (1984). Pestisitlerin toprak mikro-organizmalarına etkileri. Bornova Zir. Müc. Arş. Enst. Yıllığı, **2(2)**:91-101.
- Shen, W. and Yang, H. (2008). Effects of earthworm and microbe on soil nutrients and heavy metals. *Agricultural Sciences in China* Volume 7, Issue 5, Pages 599-605.
- Shery, L. and Fuller, E. (2015). Nitric oxide production in celomocytes of the earthworm *Eisenia hortensis* following bacterial challenge. *Science Department, Cabrini College*, **12**: 46-65.
- Sims, R.W. and Gerard, B.M. (1985). Earthworms: Keys and Notes for the Identification and Study of the Issue 31, Brill Archive.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**:184-91.
- Sodhi, G.S. (2005). Fundamental Concept of Environmental Chemistry, 2nd ed., Alpha Science, Harrow, U.K.
- Soran, H. (1990). Bitki Koruma İlaçlarının toprak mikroflorasına etkileri. I. Ulusal Zir. Müc. İlaçları Sempozyumu. Zir. Müc. ve Zir. Kar. Gen. Müd. Matbaası, 179-191.

- Sözbilir Bayşu, N. ve Bayşu, N. (2007). Biyokimya. 1. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
- Spurgeon, D.J. and Hopkin, S.P. (1999). Seasonal variation in the abundance, biomass and biodiversity of earthworms in soils contaminated with metal emissions from a primary smelting Works, *J. Appl. Ecol*, **36**: 173-183.
- Staddon, P.L., Ostle, N. and Fitter, A.H. (2003). Earthworm extraction by electroshocking does not affect canopy CO<sub>2</sub> Exchange, root respiration, mycorrhizal fungal abundance or mycorrhizal fungal vitality, *Soil Biology & Biochemistry*, **35**: 421-426.
- Susan, K., Neumeister, L. and Martin, T. (1999). Pesticide Action Network, ‘‘Disrupting the Balance Ecological Impacts of Pesticides in California’’, PAN CPR Peport 1. **3**: 43-45, 81
- Suspiro, A. and Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett*, 207(1): 42-52.
- Şevken, S. (2009). Halk Sağlığı Amaçlı Kullanılan Pestisitlerin (Biyosidal) Güvenirlik Standartlarının Karşılaştırılması. *Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(1): 11-18, ISSN: 1017-8422: e-ISSN: 1308-3651.
- Tabassum, H., Afjal, M.A., Khan, J., Raisuddin, S. and Parvez, S. ( 2015). Neurotoxicological assesment of pendimethalin in freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Ecological Indicators*. Department of Medical Elementology and Toxicology, Jamia Hamdard (Hamdard University), New Delhi 110062, Indiaa
- Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, Md. Z., Raisuddin, S. and Parvez, S. (2016). Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbation in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators* ParvezDepartment of Medical Elementology and Toxicology, Jamia Hamdard (Hamdard University), New Delhi 110062, Indiaa.

- Tan, K.H. (1995). *Environmental Soil Science*, Marcel Dekker, Inc. New York, United States.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, YF. (2000). The single cell/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **35**: 206-221.
- Tiryaki, O., Canhilal, R. Ve Horuz, S. (2010). Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 38039. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2): 154-169 Kayseri.
- Topal, C. (2003). Biber (*Capsicum annuum L.*) serasında bazı Fungusitlerin ve bitki aktivatörünün toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Bornova-İzmir, 93 s.
- Tort, N., Öztürk, İ. ve Tosun, N. (2004). Metalaxyl uygulamasının domates (*Lycopersicon esculentum Mill.*)'in anatomik yapısı üzerine etkisi *Ege. Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 41(2): 111-122.
- Tosun, N., Karabay, N.Ü. ve Feralı, S. (2000). Pesticide usage and their potential adverse impacts on living organism. *Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 11(1): 113-125.
- Triegel, E.K. and Guo, L. (1994). O verview of the Fate of Pesticides in the Environment, Water Balance; Runoff v.s Leaching, in R.C. Honeycutt and D.J. Schabacker (eds), *Mechanisms of Pesticide Movement into Ground Water*. Lewis Publisher, Boca Raton, FL, U.S.A., pp. 1-13.
- Tu, M., Hurd, C. and Randall, J. M. (2001). *Weed Control Methods Handbook: Tools & Techniques For Use In Natural Areas*. The Nature Conservancy.

- Umeda, K., Macneil, D., Lund, N. and Roberts, D. (1999). Prowl and Prefar for Onion Weed Control. Vegetable Report, University of Arizona, College of Agriculture, <http://ag.arizona.edu/pubs/crops/az1143/>, 4s.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1997). US Environmental Protection Agency, R.E.D. Facts: Pendimethalin. US EPA, Washington DC.
- Uysal, H., Şişman, T. ve Aşkın, H. (2006). *Drosophila* biyolojisi ve çaprazlama yöntemleri, *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990).The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity. *Mutant Res*, **244**: 95-103.
- Ventura, B.C., Angelis, D.D. and Morales, M.A.M. (2008). Mutagenic and Genotoxic Effects of The Atrazine Herbicide in *Oreochromis Nloticus* (Perciformes, Cichlidae) Detected by The Micronuclei Test and The Comet Assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **90**: 42–51.
- Von Burg, R. (1994). Toxicology update: Oxadiazon. *Appl. Toxicol.* **14**: 69-71.
- Vural, N. (2005). ‘‘Toksikoloji’’, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129.
- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 73, Ankara.
- Wagner, S. L. (1989). The acute health hazards of pesticides. In Chemistry, Biochemistry, and Toxicology of Pesticides. Witt, J. M., Ed. Oregon State University Cooperative Extension Service, Corvallis, OR.

- WHO, (2001). Organophosphorous pesticides in the environment- Integrated Risk Assessment, Geneva: WHO [http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch\\_3d.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch_3d.pdf)  
21 Mart 2013.
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek- Zwierzycka, K. and Swierniak, A. (2001). Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, **77**: 631-6.
- Xue-lian, M., Cheng-bin, Xu., Xiu-juan, HUI *et al.* (2010). Effects of two herbicides on DNA damage of bone marrow cells in mice. *Chinese Journal of Public Health* 2010-06. School of Pharmacy, Liaoning University. (Shenyang 110036, China).
- Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G. (2005). Tarımsal Savaşımında Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, 3-7 Ocak.
- Zeiger, E. (2004). “ History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal”, *Environ Mol Mutagen*, **44**: 363-71.
- Zhan, Y. (2012). Effects of Silver Nanoparticles on Bacteria and Earthworms. Masters thesis. Lincon University.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P., Salvatore, G., Carere, A. and Crebelli, R. (1994). An assessment of the *in vivo* clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic*, **32**: 159-63.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuba TAŞCAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : 14.04.1989  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) : 507 904 69 24 / tubatascan07@gmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : NECATİ DÖLEN LİSESİ, 2006  
Lisans : AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ, 2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Yayınları (SCI ve diğer) :

Diğer konular :