

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IMIDACLOPRIDIN *Oreochromis niloticus* (L., 1758)
ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİSİNİN
MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Fatma SOYSALDI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ramazan MERT**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Mayıs 2016
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IMIDACLOPRIDİN *Oreochromis niloticus* (L., 1758)
ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİSİNİN
MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Fatma SOYSALDI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ramazan MERT**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Mayıs 2016
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Ramazan MERT danışmanlığında Fatma SOYSALDI tarafından hazırlanan “İmidaclopridin *Oreochromis niloticus* (L., 1758) Üzerine Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Testi ile Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

24-05-2016

JÜRİ

Başkan: Prof. Dr. Hanife ÖZBAY

Üye: Doç. Dr. Ramazan MERT

Üye: Yrd. Doç. Dr. Gönül ARSLAN

ONAY:

Bu tezin Enstitü Yönetim Kurulunun 1.06.2016 tarih 21-185 ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Şahin ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü



TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatma SOYSALDI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmalarım boyunca çalışma ile ilgili her türlü konuda bana yol gösteren, tezimde büyük emeği olan aynı zamanda gösterdiği ilgi ve sabrından dolayı Sayın Hocam Doç. Dr. Ramazan MERT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez konusu seçiminde ve kullandığımız kimyasalın temininde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Figen ERKOÇ hocama ve bana her zaman, her konuda sonsuz bir sabırla destek olan sevgili babam Cemal BAYIR ve sevgili annem Bedriye BAYIR'a ve eşim A. Atilla SOYSALDI'ya çok teşekkür ederim.

**İMİDACLOPRİDİN *Oreochromis niloticus* (L., 1758) ÜZERİNE GENOTOKSİK
ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma SOYSALDI

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2016

ÖZET

İmidacloprid, (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide) böceklerin merkezi sinir sistemi üzerine etkilidir. Neonikotinoid olarak adlandırılan insektisit grubunun bir üyesi olan imidacloprid yaprak bitleri, çekirge, ağaç bitleri, kirpik kanatlılar, beyazsinekler ve kınkanatlılar gibi emici böcekleri kontrol etmek için kullanılır. Bu çalışmada, imidaclopridin subletal konsantrasyonlarının Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'nin genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla sazan (*Cyprinus carpio*) için 280 mg/L olarak saptanan 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/3 ve 1/6'sı subletal konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda balıklar 24 ve 96 saat süreyle 50 ve 100 mg/L imidaclopridine maruz bırakılmışlardır. Uygulamalarda yarı statik deney yöntem kullanılmıştır. Genotoksik etkinin incelenmesi amacıyla belirlenen süreler sonunda balık eritrositlerine mikronükleus testi uygulanmıştır. Mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hem doza hem de zamana bağlı olarak önemli derecede arttığı görülmüştür (p<0.05). Çalışmanın sonuçlarına göre imidaclopridin Tilapilarda düşük konsantrasyonlarda bile genotoksik etki gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Tilapia (Oreochromis niloticus)*, *imidacloprid*, *mikronükleus testi*,
LC₅₀

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ramazan MERT

Sayfa Adedi: 37

**INVESTIGATION BY MICRONUCLEUS TEST OF GENOTOXIC EFFECTS
OF IMIDACLOPRID ON *Oreochromis niloticus* (L., 1758)
(M. Sc. Thesis)**

Fatma SOYSALDI

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCES

March 2016

ABSTRACT

Imidacloprid (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide) is a member of insecticide called neonicotinoid is effective on the central nervous system of insects. Imidacloprid is used to control sucking insects such as aphids, leafhoppers, psyllids, thrips, whiteflies and beetles. In this study it was aimed to investigate the genotoxic effects of sublethal concentrations of imidacloprid on Tilapia (*Oreochromis niloticus*). For this purpose, 1/3 and 1/6 of 280 mg / L, which is LC₅₀ value, detected for Carp (*Cyprinus carpio*) species for 96 hours, were determined as sublethal concentrations. In this context, they were exposed to 50 and 100 mg/L imidacloprid for 24 and 96 hours respectively. Semi-static acute test method in applications was used. The micronucleus test was applied in order to investigate the genotoxic effects on fish erythrocytes at the end of the determined periods. The frequency of micronucleus comparing with control groups, it was seen that it increased depending on both dose and time significantly (p<0.05). As a result, it is thought that imidacloprid have a genotoxic effects upon Tilapia.

Key words: *Tilapia (Oreochromis niloticus), imidacloprid, micronucleus test, LC₅₀*

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ramazan MERT

Page Number: 37

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1.BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pesticitler	4
2.1.1. İnsektisitler.....	4
2.1.2. Neonikotinoid İnsektisidler.....	5
2.1.3. Imidacloprid	6
2.2. Mikronükleus Testi	7
2.2.1. MN Sayım Kriterleri	8
2.2.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi.....	9
2.2.3. MN testi ile ilgili önceki çalışmalar	9
3.BÖLÜM	
MATERYAL ve METOD.....	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Balık materyali:.....	11
3.1.2. Akvaryum suyu	12
3.2. Metod	13
3.2.1. Deney planı	13
3.2.2. Kullanılan istatistiksel yöntem.....	16

4.BÖLÜM	
BULGULAR.....	17
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	26
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ.....	37

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	İnsektisitlerin sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2.	İmidaclopridin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
Tablo 3.1.	Akvaryumların bazı su kalite parametreleri.....	12
Tablo 4.1.	<i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait Mikronükleus frekansları(‰).....	20
Tablo 4.2.	<i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait Tomurcuklu nükleus frekansları (‰).....	21
Tablo 4.3.	<i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait Çentikli nükleus frekansları (‰).....	22
Tablo 4.4.	<i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait Loblu nükleus frekansları (‰).....	23
Tablo 4.5.	<i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait Binükleus frekansları (‰).....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Neonikotinoid insektisidler.....	6
Şekil 2.2.	İmidaclopridin kimyasal formülü	7
Şekil 2.3.	Klastojenler ve anojenler ile uyarılan hücrelerdeki mikronükleuslar	8
Şekil 4.1.	Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Mikronükleus frekansları (‰).....	21
Şekil 4.2.	Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Tomurcuklu nükleus frekansları (‰).....	22
Şekil 4.3.	Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Çentikli nükleus frekansları (‰).....	23
Şekil 4.4.	Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Loblu nükleus frekansları (‰).....	24
Şekil 4.5.	Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan <i>Oreochromis niloticus</i> 'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Binükleus frekansları (‰).....	25

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1.	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> L.)	11
Resim 3.2.	Deney düzeneği.....	14
Resim 3.3.	Tilapiada kalpten kan alımı.....	15
Resim 3.4.	Periferik yayma aşamaları[a,b,c,d]	15
Resim 3.5.	Leica ICC 50 HD kamera monte edilmiş Leica DM 500 marka binoküler mikroskop	16
Resim 6.1.	Mikronükleus	17
Resim 6.2.	Çentikli nükleus	18
Resim 6.3.	Tomurcuklu nükleus	18
Resim 6.4.	Loblu nükleus	19
Resim 6.5.	Binükleus	19

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AAP	: Asetamiprid
CLO	: Klotianidin
dC-NO ₂	: Nitrometilen
dN-CN	: Siyanoimin
dN-NO ₂	: Nitroimin
EMS	: Etil metan sülfonat
EPA	: ABD Çevre Koruma Ajansı
IMI	: İmidacloprid
2,4-D	: 2,4 diklorofenoksiasetik asit
LC ₅₀	: Ölüm konsantrasyonu (%50)
nAChR	: Asetilkolin reseptörü
MN	: Mironükleus
PCP	: Pentaklorofenol
TDS	: Toplam değerler sonucu
THI	: Tiakloprid

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Teknoloji ve sanayinin hızlı bir şekilde gelişmesi insan hayatına birçok kolaylık sağlamanın yanında birtakım sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar arasında pestisit kullanımı da sayılabilir. Pestisitler, tarımsal ürünleri hastalık yapıcı zararlı canlılardan korumak ve ürün kalitesini artırmak amacıyla bütün dünyada yaygın olarak kullanılan, kullanımları neticesinde insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından bazı istenmeyen sorunlara sebep olan [1], faydaları olmasının yanında buldukları ortamda potansiyel bir zarar oluşturan ve geniş anlamda toksik etkilere neden olan kimyasallar olarak bilinmektedir [2].

Bu kimyasal bileşikler, sucul ortamlarda yaşamını sürdüren ve üreyen organizmalara karşı yapılan mücadele sırasındaki ilaçlamalarla, pestisit imalatı yapan fabrikaların atıkları ve tarım alanlarında yapılan zirai çalışmalar sırasında doğrudan yada yağmur sularına karışarak su kaynaklarına ulaşırlar [4]. Hedef canlıya uygulanan pestisit % 0,015 - 6,0'sı ulaşmakta, arta kala % 94-99,9'luk kısım ise tarım yapılan ekosistemlerde hedef olmayan canlıları ve toprağı etkilemekte ya da etrafındaki diğer doğal ekosistemlere ulaşmaktadır [3]. Pestisitlerin bilinçsiz ve/veya yanlış kullanımı sonucunda yeraltı suları, akarsular veya denizler kirlenebilmekte ve bu kirlilikten dolayı, denizde ve tatlı sularda yaşayan balıkların, memelilerin, alglerin, kabukluların ve planktonik canlıların yaşam alanları kısıtlanmakta veya bu canlılar ölebilmektedir [5-6]. Su ortamında yedikleri besinlerle ve solungaçları vasıtasıyla aldıkları bu kimyasallar, akuatik organizmalarda direkt ölümlere sebep olmanın yanında hastalıklara karşı hassasiyet ve büyümede gerilemeyle sonuçlanan strese neden olabilmektedir [7-8]. Molekül yapıları nedeniyle bozunmaları, uzun zaman alan pestisitler, su ortamına karıştıklarında, çok düşük konsantrasyonlara seyrelseler bile biyolojik ve fiziksel birikim yoluyla zararlı hatta toksik değerlere ulaşabilmektedirler. Sudaki pestisitler zamanla sucul canlıların yağ dokularında birikerek besin zinciri yoluyla balıklara, bunlarla beslenen kuşlara ve besin zincirindeki diğer canlılara geçtiklerinde konsantrasyonları sürekli artmaktadır [9].

Pestisitler etkili maddelerine göre insektisitler, akarsitler, fungusitler, herbisitler olarak sınıflandırılmıştır [10]. İnsektisitler, böcekleri kontrol etmek amacıyla kullanılan biyolojik ya da kimyasal kaynaklı ajanlardır. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması organoklorlular, organotinler, organofosfatlılar, organosülfürler, fenilpirazoller, karbamatlar, formamidinler, quinazolinler, dinitrofenoller, piretroidler, nikotinoidler, pridazinonlar şeklindedir [11].

İmidacloprid, ABD tarafından 1994 tarihinde üretilen, neonikotinoid bileşenler sınıfına ait, genellikle ticari amaçlı böcek öldürücü olarak kullanılan ve dünya üzerinde kullanımı hızla artan, yaygın kullanılan önemli bir insektisittir [12-13]. Toprak içerisinde hareket etme yeteneğine sahip olan imidaclopridin topraktaki yarılanma ömrü 48-190 gün arasında değişir ve kalıcılık etkisi fazladır. Sucul ortamlarda yarılanma ömrü pH 5, 7 ve 9'da 31 günden fazladır. İmidacloprid, ağaç yapraklarında, tohum ve topraktaki böcekleri, arılar, termitler ve beyazsinekler gibi emicileri kontrol altına almak amacıyla ağaç yapraklarına, tohumlara ve toprağa uygulanırlar. Böceklerin merkezi sinir sistemleri üzerinde etki gösterir ve postsinaptik, nikotinerjik ve asetilkolin reseptörlerini geri dönüşümsüz bloke ederler [14]. İmidaclopridin arılar da da yüksek bir toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir [15]. Yaygın olarak pirinç, tahıl, mısır, patates, sebze, şeker pancarı, meyve ve pamuk üretiminde homopter ve hemipter zararlılarla mücadelede [16-17], kedi ve köpeklerde siphonapterlerle mücadelede kullanılmaktadır [18]. Dünya genelinde en çok satan pestisitlerden biri olup 120'den fazla ülkede 140'tan fazla tarımsal üründe kullanılmaktadır [19-20].

Günümüzde kullanımı artarak devam eden pestisitlerin, genotoksik etkilerini birinci derecede hedef olmayan organizmalara da gösterdikleri bilinmektedir [21]. Özellikle sucul ortamlar ve buralarda yaşayan balıklar, pestisitlerden birinci derecede etkilenmekte ve pestisitler bu organizmalarda genotoksik hasarlara yol açmaktadır. Kimyasalların klastojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, akuatik ortamlardaki genotoksisite araştırmalarında memelilere özel bazı testler değiştirilerek öncelikle balıklar olmak daha sonra midye gibi kabuklular ve diğer sucul organizmalar üzerine uygulanmaktadır [22-25].

Sucul omurgasızlar için imidacloprid içeren ürünler fazla toksik olabilir. İmidaclopridin balıklar üzerindeki toksisitesi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen genotoksik etkisiyle ilgili yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. İmidaclopridin çalışmalarda 96 saatteki LC₅₀ değeri *Oncorhynchus mykiss*'de 211 mg/L, *Cyprinus carpio*'da 280 mg/L, *Leuciscus idus*'da 237 mg/L olarak bildirilmiştir [26].

Çok sayıda ve küçük yapılı kromozomlara sahip olan balıklardaki mitoz bölünmenin metafaz safhasında klastojen etkilerin tespitinde bazı aksamalar meydana gelebilmekte ve bu aşamada mikronükleus testi, klastojen etkilerin incelenmesinde çok daha kullanışlı ve pratik bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır [27].

Yaygın olarak kullanılan bir teknik olan Mikronükleus (MN) testi sitogenetik harabiyetin belirlenmesinde, kromozom analizleriyle kıyaslandığında daha kolay uygulanabilir olması, daha çok sayıda hücre sayılmasına olanak tanınması ve istatistiksel açıdan daha anlamlı neticeler vermesi gibi avantajları nedeniyle çok farklı alanlarda kullanılan bir metottur [28-29] ve düşük maliyetli bir teknik olan MN testi, gerek doğal ortamlarda ve gerekse laboratuvar ortamlarında uygulanabilen balıklar üzerinde de kromozomların sayısal ve yapısal hasarlarının belirlenmesi amacıyla son zamanlarda yaygın biçimde kullanılmaktadır [30].

Dünyada balık yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan ve ülkemizde ise özellikle Adana ve çevresinde kültür yetiştiriciliği yapılan Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) üzerinde imidaclopridin subletal konsantrasyonlarının genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

Pestisitler, orman ve tarım alanlarına yapılan pestisit uygulaması sonrasında drenaj suları, yağmur suları, sulama araçları ve yüzey akışı ile taşınarak veya sucul ortamlara uygulama sırasında su ortamlarına geçerek ve buradaki organizmalara zarar vermektedirler [31]. Pestisit, bakteri ya da virüs gibi bir mikroorganizma (biyolojik bir ajan), kimyasal bir madde, dezenfektan gibi antimikrobik veya başka bir etken olabilir. Pestisit terimi, adultisit (erişkin öldürücü), akarisit (akar öldürücü), algisit (alg öldürücü), avisit (kuş öldürücü), larvisit (larva öldürücü), bakterisit (bakteri öldürücü), ovisit (yumurta öldürücü), fungusit (mantar öldürücü), herbisit (yabancı ot öldürücü), insektisit (böcek öldürücü), virüsit (virüs öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü), nematisit (nematod öldürücü) ve molluskisit (sümüklüböcek ve salyangoz öldürücü) şeklinde sıraladığımız kimyasal maddelerin tamamını kapsamaktadır [32].

2.1.1. İnsektisitler

İnsektisitler, tarım ürünlerine zarar veren bir veya birden fazla böcek türünün üremesini ve gelişimini engellemek, onları öldürmek, ortamdaki uzaklaştırmak, sayılarını kontrol altına almak ve/veya sayılarını azaltmak için formülize edilmiş kimyasallardır [33]. Tablo 2.1’de 22 grup altında toplanan insektisitler gösterilmiştir.

Tablo 2.1. İnektisitlerin sınıflandırılması [33].

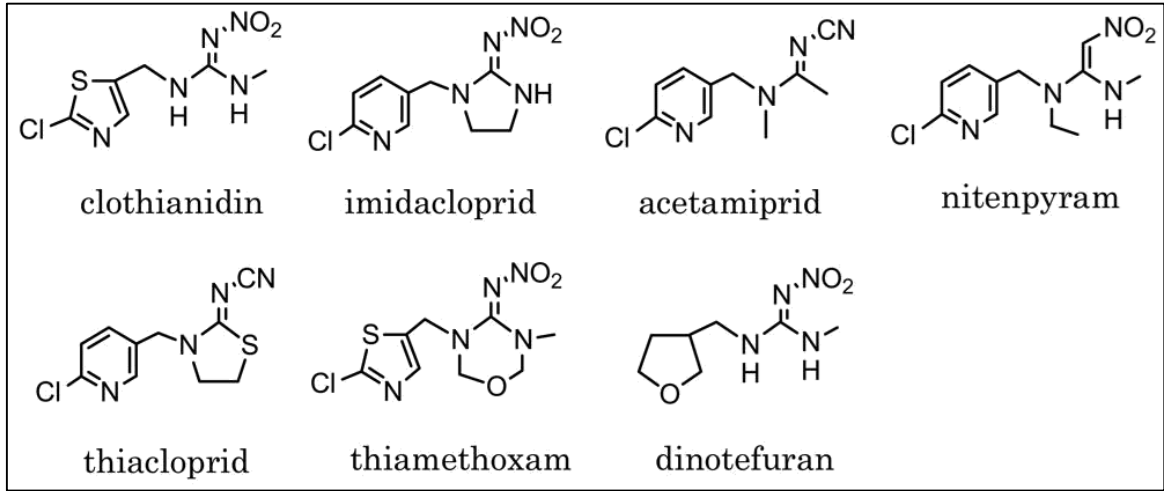
İnektisit Grubu	Etken Maddesi
Carbamates	Aldicarb, Bendiocarb, Carbaryl, Carbofuran Carbosulfan, Methiocarb, Methomyl Pirimicarb, Thiodicarb (1956)
Organophosphates	Acephate, Chlorpyrifos, Diazinon, Dimethoate, Fenitrothion, Fenthion, Malathion (1950)
Cyclodiene organochlorines	Chlordane, Endosulfan, Gamma-HCH (1945)
Phenylpyrazoles	Fipronil
Pyrethrins	Pyrethrins (pyrethrum)
Pyrethroids	Allethrin, Bifenthrin, Cyfluthrin, Lambda- Cyhalothrin, Deltametrin, Cypermethrin Fenvalerate, Permethrin, Resmethrin (1952)
Neonicotinoids	Acetamiprid, İmidacloprid, Nitenpyram, Thiacloprid, Thiamethoxam (1991)
Nicotine	Nicotine (1930s)
Spinosyns	Spinosad (1996)
Avermectin	Abamectin, Emamectin benzoate (1985)
Juvenile hormone analogues and mimics	Hydroprene, Kinoprene, Methoprene, Fenoxycarb Pyriproxyfen (1993)
Cryolite	Cryolite
Pymetrozine	Pymetrozine
Bacillus türleri	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus thuringiensis subsp. aizawai</i> , <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i> , <i>Bacillus thuringiensis subsp. Tenebrionis</i> (1961)
Diafenthiuron	Diafenthiuron (1997)
Chlorfenapyr	Chlorfenapyr (1985)
Benzoylureas	Novaluron, Diflubenzuron, Teflubenzuron (1983)
Buprofezin	Buprofezin (1988)
Diacylhydrazines	Halofenozide, Tebufenozide (1999)
Azadirachtin	Azadirachtin (1985)
Rotenone	Derris, Rotenone (1850s)
Indoxacarb	Indoxacarb (2000)

2.1.2. Neonikotinoid İnektisidler

Neonikotinoidler, inektisidlerin son 30 yılda geliştirilen en yeni sınıfı olup evcil hayvanların dış parazitleri ve homopterler, hemipterler ve siphonapterler gibi tarım zararlılarıyla karşı mücadelede önem kazanarak [34] organofosforlu, organoklorlu ve piretroid bileşiklerin yerini almaya başlamışlardır [35].

Neonikotinoid moleküllerin, nikotinic asetilkolin reseptörünü (nAChR) etkileyerek hedef canlılarda felç ve ölüme neden olduğu bilinmektedir. Şekil 2.1’de gösterilen neonikotinoidlerin pestlerde bulunan nikotinic asetilkolin reseptörüne olan ilgisi imidacloprid (IMI), tiametoksam (THIA), klotianidin (CLO) ve dinotefuran yapısında

bulunan nitroimin (dN-NO₂), asetamiprid (AAP) ve tiakloprid’de (THI) bulunan siyanoimin (dN-CN) ve nitenpiram yapısındaki nitrometilen (dC-NO₂) grubundan kaynaklanmaktadır. Bu farmakofor grupları nedeniyle neonikotinoidler, normalde böceklerin nikotinik asetilkolin reseptörüne göre omurgalılara karşı daha ilgilidirler. Bu pestisitlerdeki nitro veya nitril grubu kaybı neonikotinoidlerin etki ilgisini böceklerden hedef organizma olmayan omurgalılara doğru değiştirebilmektedir [36].

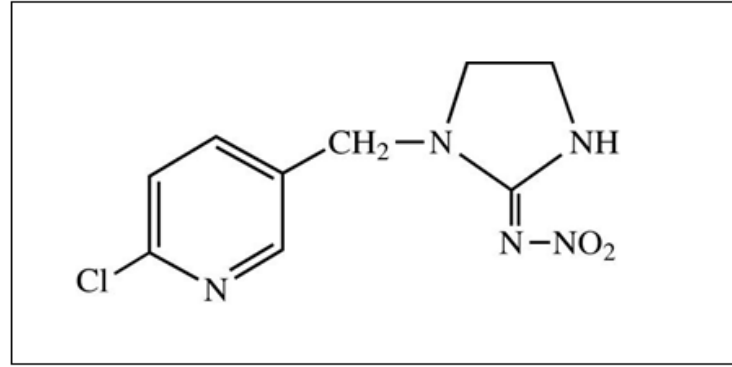


Şekil 2.1. Neonikotinoid insektisidler

2.1.3. İmidacloprid

İmidacloprid (IUPAC adı: N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide; CAS No: 138261-41-3) ilk defa 1994 yılında ruhsatlandırılmış sistemik neonikotinoid insektisittir (Şekil 2.2) [37]. İmidacloprid yüksek etkili neonikotinoid insektisidlerin bilinen en iyi örneğidir [38].

Sebzelerde, meyvelerde, şeker pancarında, pamukta ve pirinçte homopter ve hemipter zararlıların mücadelesinde [39], kedi ve köpeklerde siphonapterlerle mücadelede [40] kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. İmidaclopridin kimyasal formülü

Tablo 2.2. İmidaclopridin fiziksel ve kimyasal özellikleri

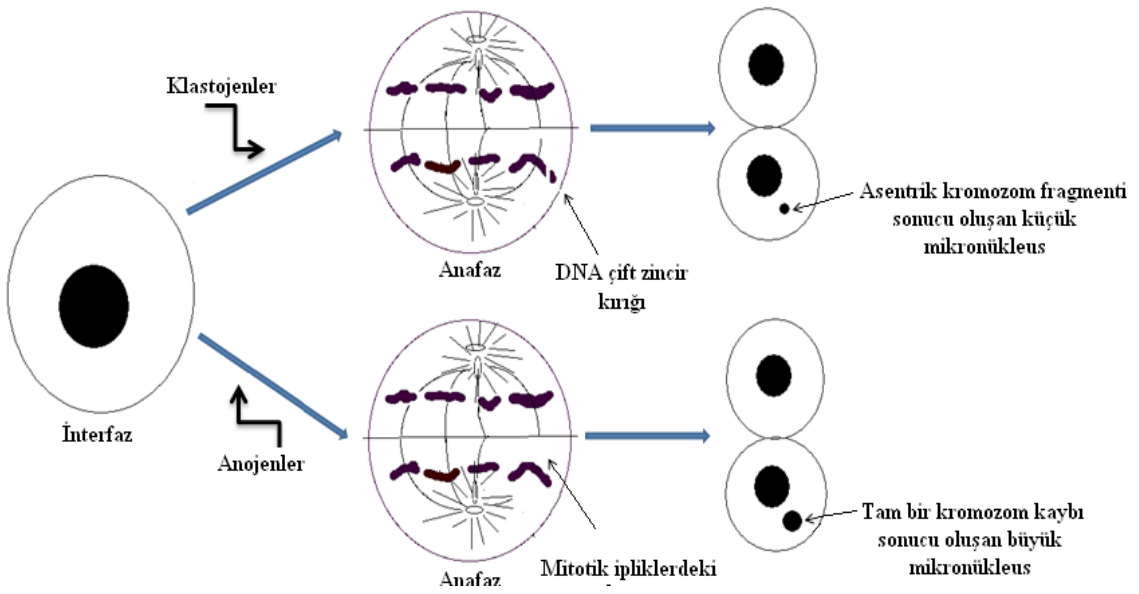
Molekül formülü	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
IUPAC ismi	1 - (6- chloro - 3 - pyridylmethyl) - N-[1- [(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5- dihydroimidazol-2-yl]nitramide
CAS numarası	138261-41-3
Molar hacmi	255,7 gr/mol
Erime noktası	136,4-143,8 °C
Sudaki çözünürlüğü	200 °C'de 0,51 g/L

2.2. Mikronükleus Testi:

İlk defa MN test metodu 1970'lerin ortalarında kullanılmaya başlanmıştır [41]. Mitotik hücre bölünmesinin metafazdan anafaza geçiş aşamaları sırasında, klastojenik etki sonucunda kromozomlardan kopan fragmentlerin veya anojenik hatalardan dolayı ana nükleusa dahil olamayan tam kromozomlardan meydana gelen ve hücre bölünmesi sonucunda sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında ikinci bir küçük nükleus yapısı gözlenen oluşum MN olarak isimlendirilir [25].

Genellikle bu oluşumlar, hücre siklusünü kontrol eden genlerde meydana gelen eksikliklerden, mitotik aygıtın diğer parçalarından, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan ve kromozomal hasarlardan oluşmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli

ajanların etkisiyle hücrelerde oluşan yapısal ve sayısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak kabul edilmektedir. Anöploidiyi uyaran etkenler, sentromer bölünmelerinde hatalara ve iç iplikçiklerinde işlevsel bozukluklara sebep olarak; klastojenler ise kromozom kırıkları meydana getirerek MN oluşumuna katkı sağlamaktadırlar (Şekil 2.3). Hücrelerde MN sayısında artış saptanmasından dolayı somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [42-43].



Şekil 2.3. Klastojenler ve anojenler ile uyarılan hücrelerdeki mikronükleuslar [44-45]

2.2.1. MN Sayım Kriterleri:

Preparatların hazırlanmasından sonra eritrositlerin mikroskop altında MN sayımları için tarama yapılmıştır. Her örnek için 3 preparat hazırlanmıştır. Her preparat için 1000 hücre sayılmış ve MN değerlendirmesi yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda zaman zaman boya partikülleri veya diğer bazı kirleticiler nedeniyle MN ile karıştırılabilen yapılarla karşılaşılabilir. Bu tarz hataların minimize edilmesi için genel olarak MN sayımlarında standardize edilmiş bazı kriterlere dikkat etmek gerekmektedir. Bu kriterleri şöyle sıralamak mümkündür;

- MN ile ana nükleus aynı mikroskobik refle'yi vermelidir.
- MN ile ana nükleusun boyama tonu aynı olmalıdır.

- MN ana nükleusun yakınında bulunmalıdır.
- MN ana nükleus'un 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.
- MN sayılacak hücre diğer hücrelerden izole şekilde olmalıdır.

Yukarıda verilen kriterler göz önüne alınarak MN sayımı yapılmıştır [46].

2.2.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi

Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco ve çalışma arkadaşları [47]'na göre; tomurcuklu nükleus, çentikli nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere dört ana grup altında toplanarak değerlendirilmiştir.

a) Çentikli Nükleus: Nükleus zarında nükleus içerisine doğru oluşan, gözle net bir biçimde ayırt edilebilen ve kromatin içermeyen çentik şeklindeki girintilerle karakterize nükleus yapısı.

b) Tomurcuklu Nükleus: Nükleus zarından dışarı doğru çıkıntılar yapan, kromatin içeren küçük tomurcuklanmalarla karakterize nükleus yapısı.

c) Loblu Nükleus: Tomurcuklara göre daha büyük veya daha çok sayıda loblarla karakterize nükleus yapısı.

d) Binükleus: Bir hücre içerisinde iki adet nükleusun bulunmasıdır [48].

2.2.3. MN testi ile ilgili önceki çalışmalar

İlk olarak fareler de kullanılmak amacıyla geliştirilmiş olan MN testi daha sonra Hooftman ve Raat tarafından laboratuarda balıklara uygulanmak amacıyla geliştirilmiştir [49].

Hooftman ve Vink [49] ve Hooftman ve Raat [50] laboratuvar şartlarında etil metanesülfonat ile eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* (DeKay, 1842))'da MN oluşturmuşlardır [49-50].

Ayrıca, yine laboratuvar şartlarında, sazangillerden üç tür (doğa sazani, *Cyprinus carpio*; ot sazani, *Ctenopharyngodon idella*; kadife balığı, *Tinca tinca*)'de MN oluşturmak

amacıyla 5 çeşit kanserojenik-mutajenik kimyasal (alfatoxin B1, aroclor 1254, benzin, benzo(a)pyrene ve 20-methylcholanthrene) test edilmiştir [51].

Al-Sabti [52], Liubljana nehrinden topladığı balıklar ile laboratuvarında 50 ng/ml'lik krom uyguladığı balıkları MN oluşumu açısından incelendiğinde MN oluşturma frekanslarının hem laboratuvarında maruz kalmış gruplarda hem de in situ olarak eşit olduğunu görmüştür.

Arkhipchuk ve Garanko [53], farklı kimyasal maddelerin balıklar üzerindeki genotoksik etkilerini tespit etmek için, *C. carpio*, *Sarotherodon mossambica*, *Carassius gibelio*'nun eritrosit, solungaç ve kaudal yüzgeç epitelinde MN testini uygulamışlardır.

Ahmad ve çalışma arkadaşları [54], kedibalgı (*Heteropneustes fossilis*) üzerinde pentaklorofenolün in vivo genotoksik etkilerini incelemiştir. Eritrositlerdeki MN frekansının en yüksek noktaya 96 saat sonunda ulaştığını tespit etmişlerdir.

Yine Ahmad ve çalışma arkadaşları [55], pentaklorofenol (PCP) ve 2,4 diklorofenoksiasetik asidin (2,4-D) tatlı sularda yaşayan *Channa punctatus* üzerindeki genotoksik etkilerini MN testi kullanarak araştırmışlardır. 48,72 ve 96 saat sonunda eritrositlerdeki MN frekansında önemli artışlar gözlemlenmiştir.

Ergene Gözükara ve çalışma arkadaşları [56], yaptıkları çalışmada Pyrethroid grubundan Cypermethrin'in *O. niloticus* türü üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla solungaç epitel MN testi uygulamışlar ve doz artışına bağlı olarak mikronükleus frekansında artışın anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Neuparth ve çalışma arkadaşları [57], genellikle Akdeniz'de yaygın olarak görülen, günümüzde büyük biritanyadan senegale kadar atlantiğin doğu sahilleri boyunca geniş bir alanda yayılım gösteren, ekonomik değere sahip ve kültürü yapılan bir balık türü olan *Sparus aurata* üzerinde bir çeşit insektisit olan endosülfanın genotoksik etkisini eritrosit MN testi, morfolojik nükleus düzensizlik analizi ve çekirdek DNA içeriğindeki farklılıkları kullanarak incelemiştir. Endosülfanın MN ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarını anlamlı oranda arttırdığını tespit etmişlerdir.

3. BÖLÜM

MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Balık materyali

Balık materyali olarak, ülkemizde yaygın olarak bulunmayan ancak Adana ve çevresinde yetiştiriciliği yapılan ve Chichlidae familyasına ait olan Tilapia (*O. niloticus*) kullanılmıştır (Resim 3.1). Türkiye sularında doğal olarak bulunmayan Tilapia (*Tilapia zilli* ve *O. niloticus*), ilk kez 1975 yılında D.S.İ Adana 6. Bölge Müdürlüğü tarafından Suriye'den getirilmiştir. Bu tür üzerine Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi tarafından adaptasyon çalışmaları yapılmış ve büyük ölçüde başarı elde edilmiştir [58]. Çalışmada bu türün seçilmesinin nedenlerini ekonomik öneme sahip olması, kolay temin edilebilen bir tür olması, yaygın olarak yetiştiriciliğinin yapılması, sahip olduğu düşük kromozom sayısı ($2n=44$) [59] ve daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda genotoksik ajanlara karşı duyarlılığının ispatlanmış olması şeklinde sıralamamız mümkündür [60].



Resim 3.1. Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

Taksonomisi:

- Phylum** : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Clasis : Osteichthyes
Subclasis : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Familia : Cichlidae
Genus : *Oreochromis*
Species : *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

3.1.2. Akvaryum suyu

Araştırmada deney suyu olarak 24 saat dinlendirilmiş ve havalandırılarak kloru giderilmiş şebeke suyu kullanılmıştır. Biyodeneyle sırasında hacmi 60 litre olan akvaryumlara 50 litre su bırakılmıştır. Suyun bazı fizikokimyasal analizi günlük olarak portatif YSI Professional Plus multiparametre ile yapılmıştır. Deneyde kullanılan akvaryum suyunun su kalitesi değerleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Akvaryumların bazı su kalite parametreleri

Parametre	Sonuç
pH	8,6
Çözünmüş Oksijen (mg/L)	5,7
Sıcaklık (°C)	22,8
Elektriksel İletkenlik (mS/cm)	609
Tuzluluk (ppt)	0,29
TDS (mg/L)	0,3914

3.2. Metod

3.2.1. Deney planı:

Çalışmada kullanılacak *O. niloticus* bireyleri Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su Balığı Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan *O. niloticus* bireyleri biyodeneden önce dinlendirilmiş su ile dolu 60 litrelik tanklara konulmuştur. Balıklar deney öncesi 15 gün süre ile ortama uyum sağlaması için bu tanklarda bekletilmiştir. Uyum periyodu süresince balıklar günde bir kez ağırlıklarının % 2'si oranında granüllü alabalık yemi ile yemlenmiştir. Deneyler başlamadan 48 saat önce yemlenmeye son verilmiş, bu süreç içerisinde balıkların hastalanma ve ölüm oranının % 5'ten fazla olmamasına dikkat edilmiştir [61].

Deney ortamındaki ışıklandırma, doğal periyoda uygun olarak 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney tanklarında aynı uyum periyodundaki tanklar gibi deklorinize edilmiş şehir suyu kullanılmış ve deney süresince tank suyunun sıcaklığı 22,8 °C'de sabit tutulmuştur. Deney tankları da 50 litre su konularak oluşturulmuş ve tanklar havalandırılmıştır. Kontrol grubu olarak ayrılan tanktaki balıklarda ölüm oranının % 10'u geçmemesine ve % 90'ının sağlıklı görünümde olmasına dikkat edilmiştir [61]. Deneyde toksik madde olarak imidacloprid kullanılmıştır.

Denemelerde pozitif kontrol (%5'lik EMS) ve negatif kontrol olmak üzere iki tanesi kontrol grubu olarak ayrılan toplam 8 tank kullanılmış ve her tanka 12'şer balık konulmuştur. Tilapia için hesaplanan 280 mg/L 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/3ve 1/6'si subletal konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda 50 ve 100 mg/L konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlarda asıl deney üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tankların üzeri strecht film ile kapatılmıştır.

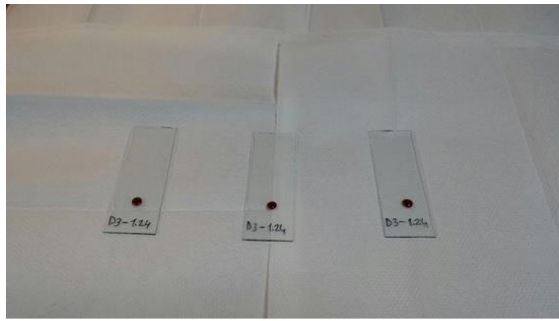


Resim 3.2. Deney düzeneği

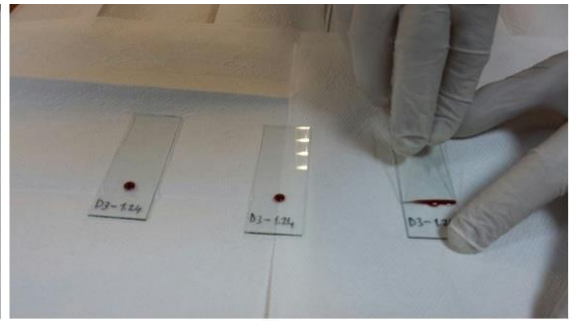
MN testi için MN analizleri eritrositlerde gerçekleştirilmiştir. Uygulama süresi sonunda kan örnekleri heparinize şırınga ile tüm balıkların kalplerinden punksiyonla alınmıştır (Resim 3.3). Her bir örnek için önceden hazırladığımız üç temiz lama aldığımız kan örneklerini ince bir film oluşturacak şekilde lamelle yayılmışlardır. Periferik yayma (Resim 3.4) olarak hazırladığımız preparatları havada kurutulduktan sonra % 95'lik etanolde 20 dk süresince fikse edilmişlerdir. Fikse işleminden sonra preparatlar tekrar kurutulduktan sonra % 5'lik tamponlu su ile hazırlanan Giemsa boyasında 20 dakika bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan geçirilerek fazla boyanın uzaklaştırılması temin edilmiştir. Sonraki aşamada ise preparatlar mikroskop altında değerlendirmeye alınmışlardır. Mikroskobik incelemelerde Leica ICC 50 HD kamera monte edilmiş Leica DM 500 marka binoküler mikroskop ve Leica LAS EZ 1.4.0 görüntüleme programı kullanılmıştır (Resim 3.5).



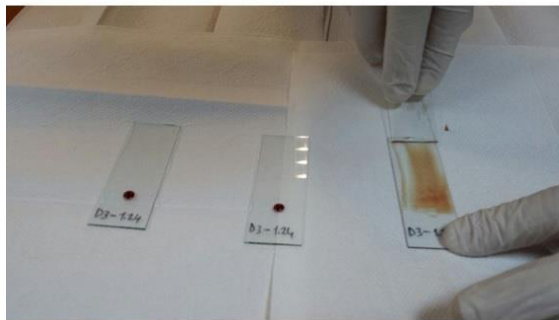
Resim 3. 3. Tilapiada kalpten kan alımı



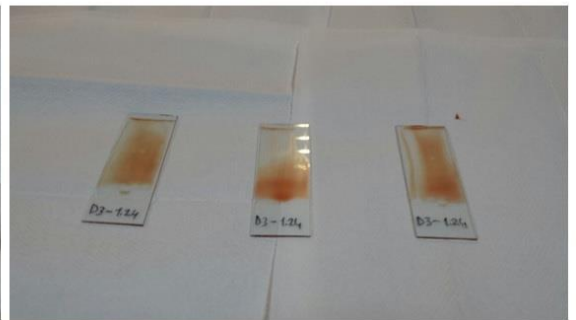
a



b

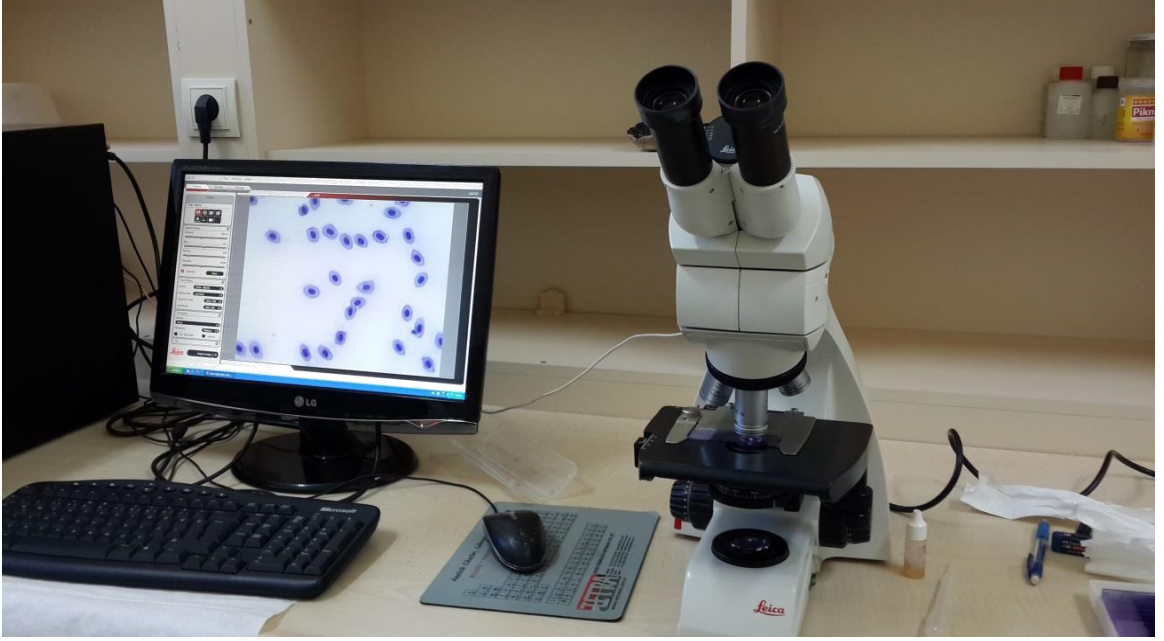


c



d

Resim 3.4. Periferik yayma aşamaları [a,b,c,d]



Resim 3.5. Leica ICC 50 HD kamera monte edilmiş Leica DM 500 marka binoküler mikroskop

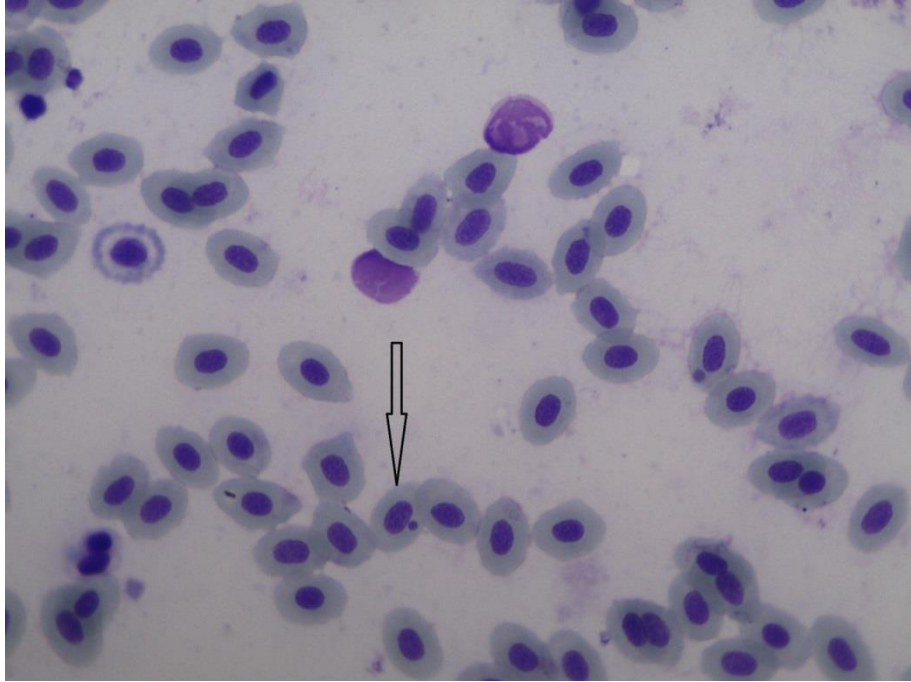
3.2.2. Kullanılan istatistiksel yöntem

Uygulama süreleri arasındaki etkileşimlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması için *student's t* - testi kullanılmıştır. Testler sonucu aralarındaki fark büyük ($p < 0.05$) olduğunda örnek gruplarının arasında farklılık olduğu anlaşılıp ayrı ayrı değerlendirilmiştir. İlgili tablolar Excel programıyla çizilmiştir.

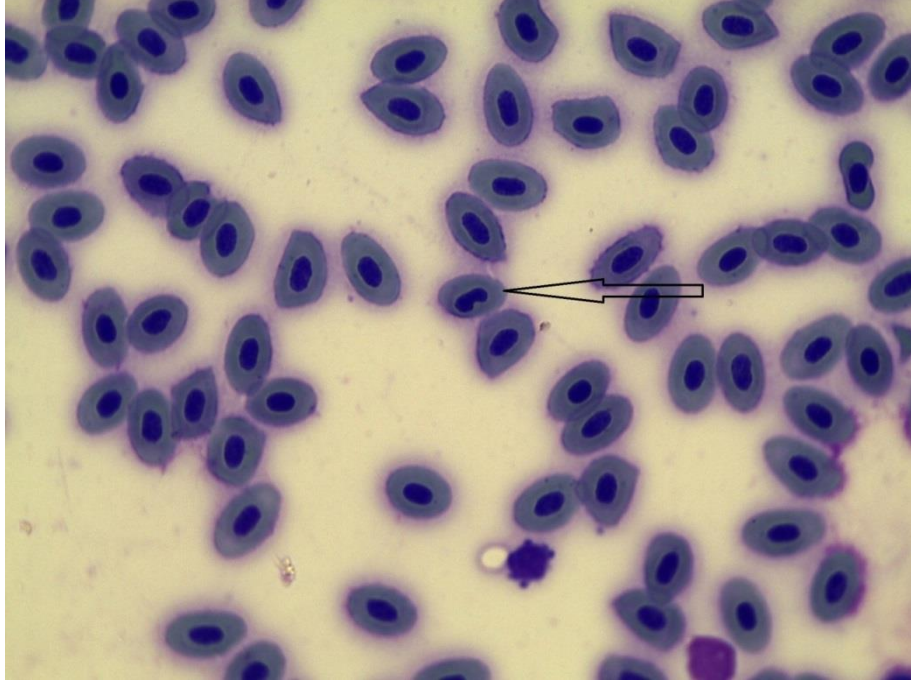
4. BÖLÜM

BULGULAR

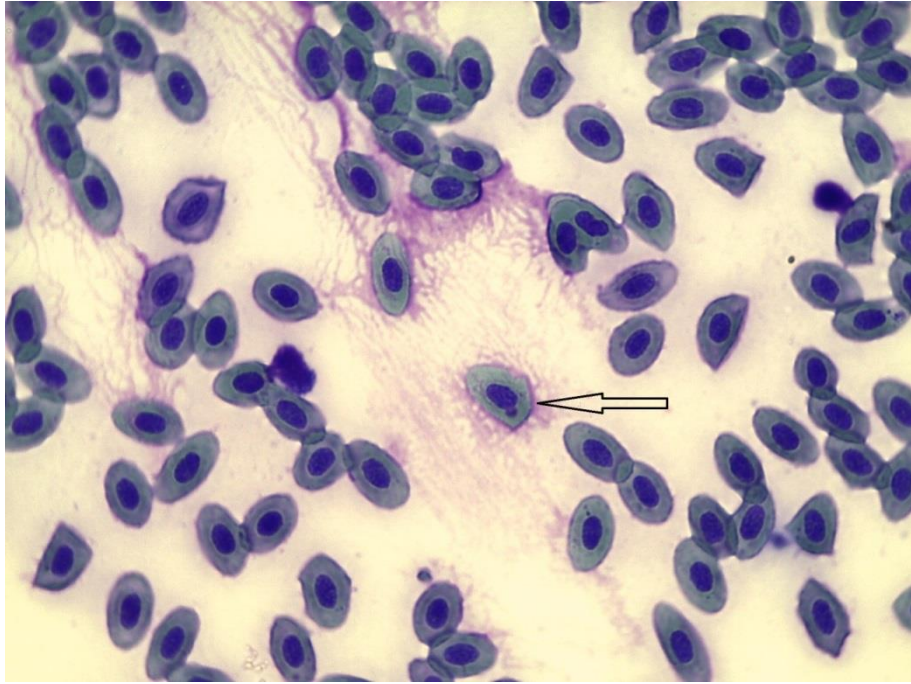
Bu çalışmada, *O. niloticus*'nun periferik eritrositlerinde imidacloprid uygulanmadan önce ve sonra meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde mikronükleus yöntemi kullanılmıştır. Eritrosit hücrelerinde, MN ve morfolojik nükleus düzensizlikleri gözlenmiştir. Mikroskop altında immersiyon yağı kullanarak incelenen eritrosit hücrelerinin fotoğrafları 100'lük objektifte çekilmiştir (Resim 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5). Resim 6.1'de normal eritrosit hücreleri gözlenmektedir. Resim 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5' te okla gösterilmiş eritrosit hücreleri sırasıyla mikronükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve binükleustur.



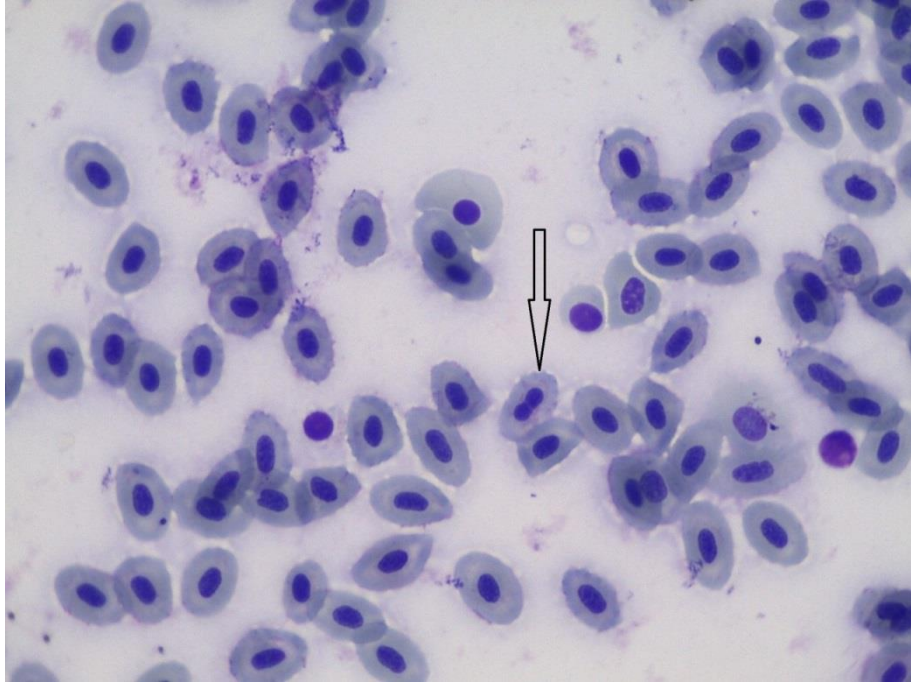
Resim 6.1. Mikronükleus



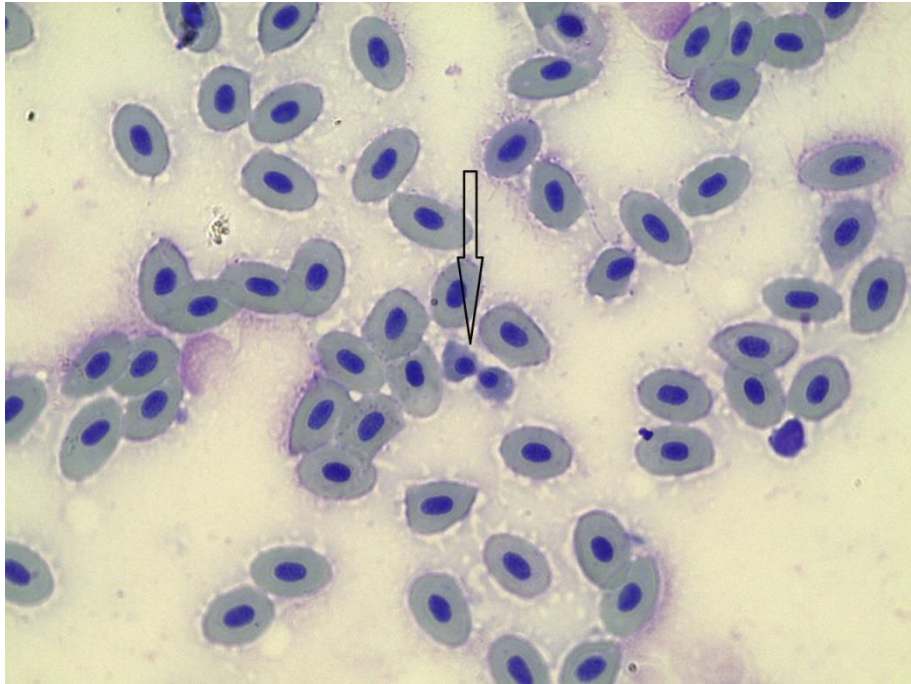
Resim 6.2. Çentikli nükleus



Resim 6.3. Tomurcuklu nükleus



Resim 6.4. Loblu nükleus



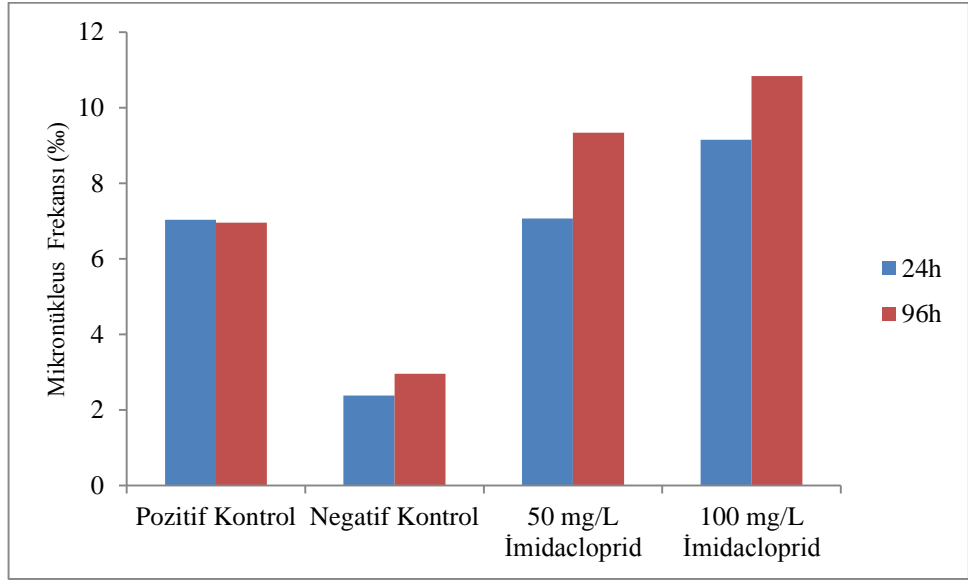
Resim 6.5. Binükleus

Bu çalışmada, iki farklı sürede, iki farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *O. niloticus* eritrositlerinde meydana gelen nükleus anormalliklerinin frekansları Tablo 4.1- 4.5 ve Şekil 4.1- 4.5 'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1 incelendiğinde görüleceği gibi imidaclopridin 50 mg/L ve 100 mg/L her iki uygulama süresinde negatif kontrolle karşılaştırıldığında MN frekanslarında anlamlı derecede artışlara sebep olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bunun yanında, en yüksek MN frekansı 96 saatlik MN imidacloprid uygulamasında görülmüştür. Buna göre 96 saatlik uygulama sonunda negatif kontrol grubundaki MN frekansı % 2,96 iken bu oran 50 mg/L ve 100 mg/L'lik dozlarda sırasıyla % 9,15 ve % 10,84 olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullandığımız EMS, negatif kontrol grubuna oranla her iki uygulama süresinde de MN frekanslarında anlamlı seviyede artışlara neden olmuştur ($p<0.05$). İmidacloprid uyguladığımız gruplarda hem uygulama süresindeki artışın hem de doz artışının MN frekanslarında bir artışa neden olduğu ve bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.1 *Oreochromis niloticus*'a ait Mikronükleus frekansları (%)

Süre	Mikronükleus frekansları (%)			
	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	50 mg/L İmidacloprid	100 mg/L İmidacloprid
24 Saat	7,03	2,38	7,07	9,15
96 Saat	6,96	2,96	9,34	10,84

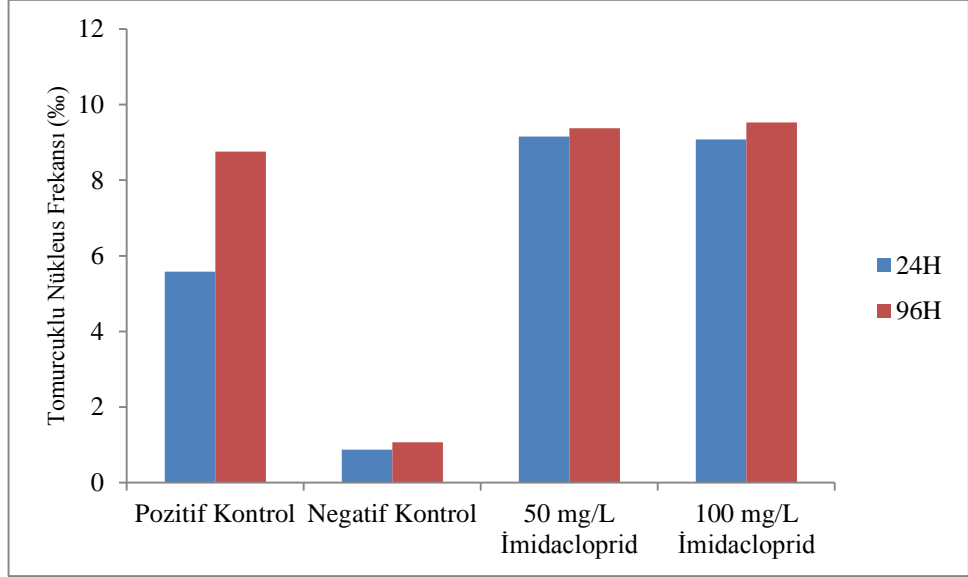


Şekil 4.1. Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Mikronükleus frekansları (%)

İmidaclopridin iki farklı dozuna (50 mg/L ve 100 mg/L) 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan *O. niloticus* örneklerinin kan eritrositlerinde yapılan morfolojik nükleus üzensizlik analizlerinin sonuçları Tablo 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ile Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5'te verilmiştir. Şekil 2 ve Tablo 2'de görüldüğü üzere pozitif kontrol olarak kullandığımız EMS tomurcuklu nükleus frekansında her iki doz ve uygulama süresinde de anlamlı düzeyde artışlar tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Negatif kontrol grubu ile uygulanan dozlar arasındaki farkta istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Her iki farklı uygulama süresinde (24 ve 96 saat) hem 50 mg/L hem de 100 mg/L'lik uygulamalar sonucunda görülen tomurcuklu nükleus frekanslarındaki artış birbiriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$).

Tablo 4.2. *Oreochromis niloticus*'a ait Tomurcuklu nükleus frekansları (%)

Süre	Tomurcuklu nükleus frekansları (%)			
	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	50 mg/L İmidacloprid	100 mg/L İmidacloprid
24 Saat	5,58	0,875	9,16	9,08
96 Saat	8,76	1,07	9,38	9,53

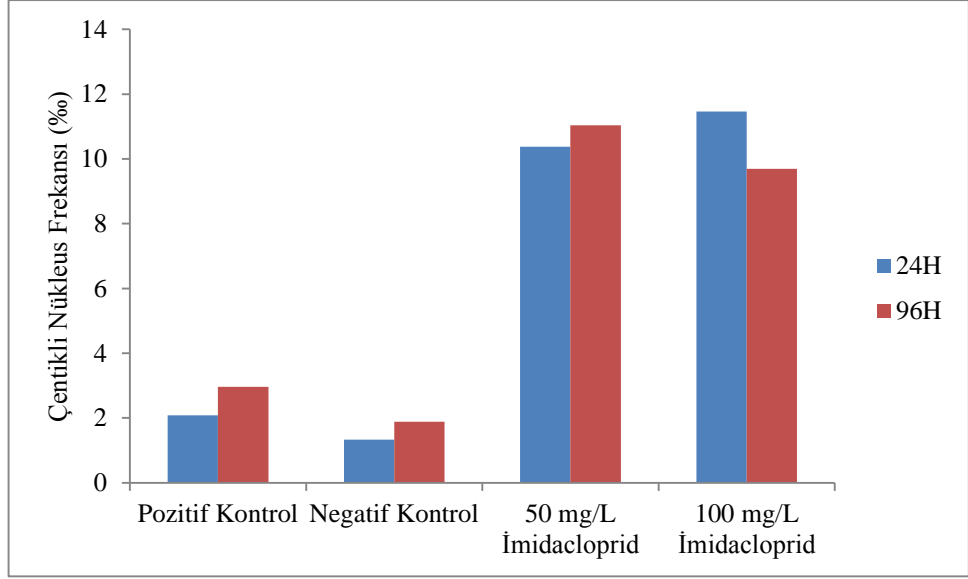


Şekil 4.2. Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Tomurcuklu nükleus frekansları (%)

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'teki çentikli nükleus verilerini incelediğimizde hem 24 saat hem de 96 saatlik maruziyet sürelerinde her iki dozdaki frekanslarda anlamlı oranda artışlar gözlemiştir ($p < 0.05$). Morfolojik nükleus düzensizlikleri içerisinde en yüksek orana 24 saatlik maruziyette 100 mg/L imidacloprid uygulanan tilapia kan örneklerinde çentikli nükleuslar olduğu görülmektedir. İmidaclopridin 96 saat ve 100 mg/L uygulandığı örneklerde çentikli nükleus frekansında 100 mg/L'nin 24 saatine oranla bir düşüş olduğuda tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *Oreochromis niloticus*'a ait Çentikli nükleus frekansları (%)

Süre	Çentikli nükleus frekansları (%)			
	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	50 mg/L İmidacloprid	100 mg/L İmidacloprid
24 Saat	2,083	1,333	10,375	11,458
96 Saat	2,961	1,884	11,038	9,692

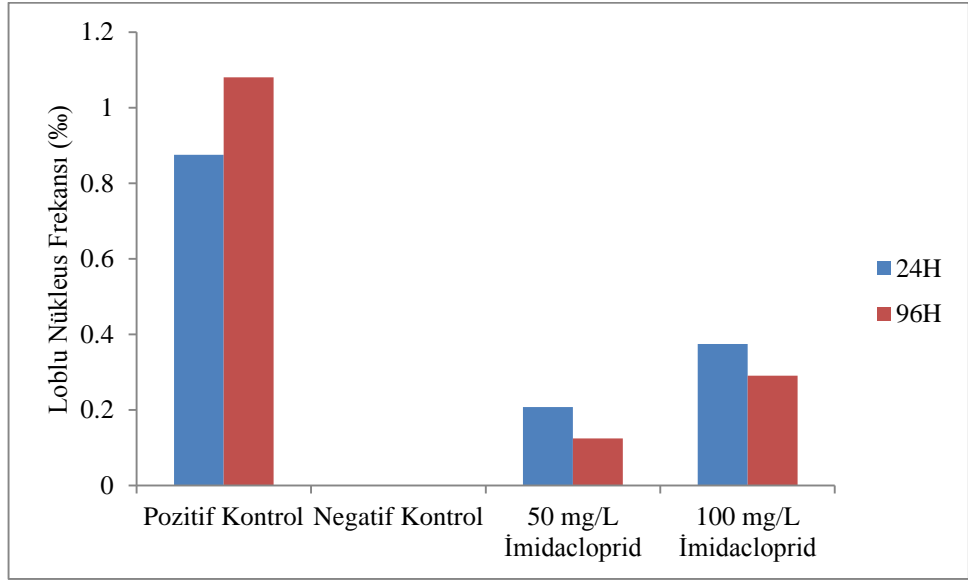


Şekil 4.3. Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Çentikli nükleus frekansları (%)

Negatif kontrol grubunda loblu nükleus oluşumu tespit edilemezken, uygulanan her iki doz ve sürede loblu nükleus frekanslarında anlamlı oranda artışlar meydana gelmiştir ($p < 0.05$). Loblu nükleus oluşumuna EMS'nin etkisi imidacloprid dozlarından daha fazla olmuştur. İmidacloprid dozlarında da 24 saatlik maruziyetin etkisi 96 saatlik maruziyetten daha fazla olmuştur (Şekil 4.4).

Tablo 4.4. *Oreochromis niloticus*'a ait Loblu nükleus frekansları (%)

Süre	Loblu nükleus frekansları (%)			
	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	50 mg/L İmidacloprid	100 mg/L İmidacloprid
24 Saat	0,875	0	0,208	0,375
96 Saat	1,08	0	0,125	0,291

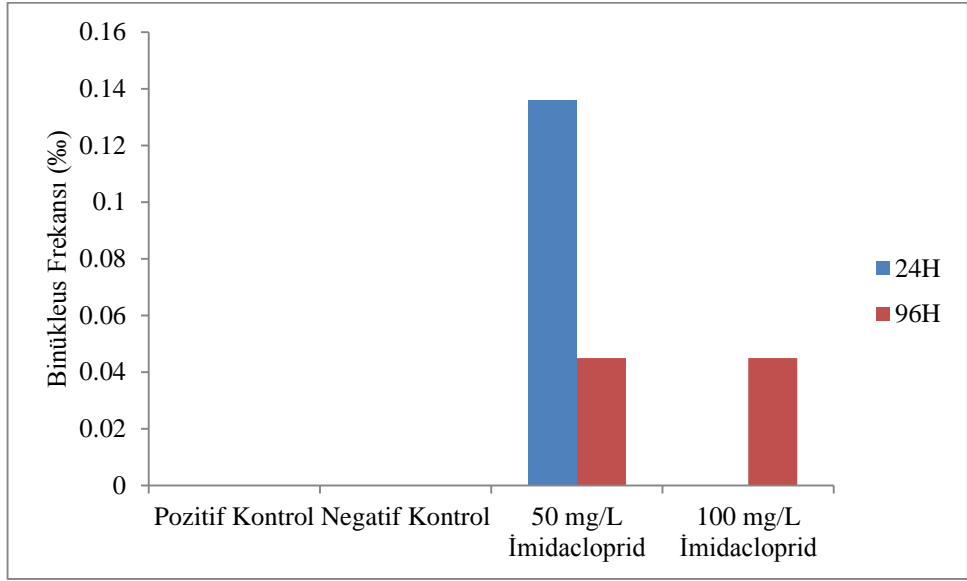


Şekil 4.4. Farklı imidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Loblu nükleus frekansları (‰)

İmidaclopride maruz kalma sonucunda negatif ve pozitif kontrol grubunda *O. niloticus* alyuvarlarında binukleusa rastlanmazken, 24 ve 96 saatlik 50 mg/L'lik maruziyetlerde binukleus frekansı sırasıyla 0,136 ve 0,045 olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *Oreochromis niloticus*'a ait Binükleus frekansları (‰)

Süre	Binükleus frekansları (‰)			
	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	50 mg/L İmidacloprid	100 mg/L İmidacloprid
24 Saat	0	0	0,136	0
96 Saat	0	0	0,045	0,045



Şekil 4.5. Farklı İmidacloprid konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'a ait 24 ve 96 saat sonrasındaki Binükleus frekansları (‰)

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde insan ve çevre sağlığı büyük önem kazanmıştır olup ve pestisitlerin de bulunduğu çevresel kirleticilerin istenmeyen etkilerinin kontrolü ve engellenmesi artık bir zorunluluktur. Özellikle pestisitlerin gelişigüzel kullanılması ciddi bir çevre sorunudur. İnsektisitler (%27,1), herbisitlerin (%47) ardından dünyada en yaygın kullanılan pestisitlerdir [62]. İnsektisitlerin hemen hemen tümü spesifik olmadıklarından sadece hedef organizmaları değil diğer omurgalı ve omurgasız hayvanları da etkilerler. En büyük çevresel etkilerini de sucul ekosistemi kirleterek göstermektedirler. Bu zararlı etkinin şiddeti insektisit çeşidine ve formülasyonuna, uygulama şekline, uygulanan doza, tarımsal arazinin topoğrafik yapısına ve insektitin üretim tipine bağlı olarak değişir. Günümüzde özellikle su rezervlerinin geri dönüşsüz bir şekilde bozulması sucul ekosistemlerde yapılan çalışmaların ağırlık kazanmasına sebep olmuştur [63-64]. İmidacloprid hayli değişken yarılanma ömrüyle (28-1250 gün) toprak tipi ve birçok faktöre bağlı olarak uzun süre toprakta kalabilir [65]. Aynı zamanda yağış ve toprak yapısına bağlı olarak neonikotinoidlerin yaklaşık % 20'si (imidacloprid gibi) su kütlelerine geçebilir [66]. Bu nedenle imidacloprid sadece insektlerde değil doğrudan hedefi olmayan solucanlar, amfipodlar, mikroalglar ve kabuklular gibi organizmalarda toksisiteye neden olabilmektedir [67]. Bu çalışmada dünyada yaygın olarak kullanılan, neonikotinoid grubu bir insektisit olan imidaclopridin saf etken madde olarak, hedef olmayan ekonomik bir organizma olan *Oreochromis niloticus* üzerinde in vivo genotoksik etkileri mikronükleus testi ve morfolojik nükleus düzensizlik analizleri kullanılarak araştırılmıştır.

Türkiye'yi de içine alan birçok ülkede imidacloprid kullanımı yaygın bir şekilde devam etmektedir. Buna rağmen bitkileri korumak için kullanılan imidaclopridin, arılar için yüksek risk oluşturması nedeniyle AB tarafından kullanımına bazı yasaklamalar ve sınırlamalar getirilmesi tavsiye edilmiştir [68] ve ABD-EPA tarafından genel kullanım amaçlı pestisitler içinde toksisite sınıfı II ve III ajan olarak sınıflandırılmaktadır [69]. Bu çalışmada imidaclopridin, iki farklı subletal konsantrasyonuna (50 ve 100 mg/L) 24 ve

96 saat süreyle maruz bırakılan *O. niloticus*'larda ortaya çıkan genotoksik etkinin mikronükleus testi ile ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Yaptığımız bu çalışmada MN frekansları da imidaclopridin dozuna ve uygulama zamanına bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli artışlar göstermiştir ($p<0,05$). 50 mg/L imidacloprid uygulanan örneklerde MN frekansı 24 saat sonunda ‰ 7,07 iken, 96 saat sonunda ‰ 9,34 olmuştur. 100 mg/L imidacloprid uygulanan örneklerde MN frekansı 24 saat sonunda ‰ 9,15 iken, 96 saat sonunda ‰ 10,84 olmuştur (Tablo 4.1). Bu artışlar diğer araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir [70-71-63-67]. Ansoar-Rodriguez ve çalışma arkadaşları [67] 250, 125 ve 62,5 µg/L dozlardaki imidaclopridi şeker kamışı yetiştirilen tarlalardan topladıkları *O. niloticus*'lara uygulamışlar ve meydana gelen genotoksik hasarı comet testi ile belirlemişlerdir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA'daki hasarın ve buna bağlı olarak da MN ve çekirdek anomali oluşumunun arttığını tespit etmişlerdir. Yine imidaclopridin balık dışındaki diğer canlılar üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Karahan [72] Anadolu Bal Arısına (*Apis mellifera anatolica*) besin olarak farklı dozlarda imidacloprid verildiğinde arılarda davranış bozuklukları ve kovana geri dönmeme tespit etmişlerdir. Yine Akbaş [73], Kurbağalara (*Rana ridindibula*) imidacloprid uyguladığında kurbağa iskelet kas hücrelerinin ultrastrüktürel yapılarında bozulmalar, mitokondrial hasar, sarkoplazmik retikulumda genişleme ve miyofibriller arasında genişlemeler tespit etmiştir. Mısır tohumları üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada çimlenme, fide büyümesi ve yaprak anatomisinin konsantrasyona bağlı olarak olumsuz etkilendiğini rapor etmişlerdir [74].

Ayrıca birçok pestisit çeşidinin farklı balık türleri üzerine genotoksik etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Ergene ve çalışma arkadaşları [63], eritrosit mikronükleus testi ile organofosforlu bir insektisit olan methamidophos'un *Clarias lazera* üzerindeki genotoksik etkilerini belirledikleri çalışmada; mikronükleuslu eritrosit frekansını kontrol gruplarında % 0,18, 100 ppm'lik en düşük doza maruz bırakılan balıklarda % 1,92 ve en yüksek 200 ppm'lik doza maruz bırakılan balıklarda ise % 3,26 olarak bulmuşlardır. Çavaş ve Ergene-Gözükara [75], pestisitlerin sucul ekosistemlerdeki genotoksik etkilerinin laboratuvar ortamında araştırılmasında balıkların da etkin bir şekilde kullanılabileceğini gösterdikleri ve bir insektisit olan lambda-cyhalorthin'in genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada *Garra rufa*'da (Cyprinidae) eritrositlerde

MN frekanslarının istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırdığını ifade etmişlerdir. Könen ve Çavaş [76], treflan'a maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'larda mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında oldukça önemli oranlarda artışların olduğunu belirlemişler ve trifluralinin EMS'nin oluşturduğundan daha yüksek oranda mikronükleus frekanslarına yol açtığını görmüşlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada da imidaclopridin EMS'nin neden olduğundan daha yüksek oranda mikronükleus frekansları tespit edilmiştir. Tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan ve organik klorlu bir insektisit olan endosülfanın *Sparus aurata* (Perciformes) üzerindeki etkilerini laboratuvar şartlarında inceleyen Neuparth ve çalışma arkadaşları [77]'da, doz ve süreye bağlı olarak eritrosit mikronükleus ve eritrosit morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarında anlamlı oranda artışlar tespit etmişlerdir. Selvi ve çalışma arkadaşları [78] *C. carpio* ları esbiothrin'in 5 ve 10 µg/L dozlarını 24, 48 ve 72 saat maruz bıraktıklarında, 5 µg/L 24 saat uygulanan grup dışında tüm gruplarda MN frekansında anlamlı bir artış ve 24 saat µg/L uygulanan grup dışında tüm gruplarda MN frekansında anlamlı artışlar tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak imidaclopridin sublethal dozlarda bile doz ve süre artışına bağlı olarak *O. niloticus* fingerlinglerinin eritrositleri üzerine, MN ve nükleus düzensizlik frekanslarında artışlara neden olduğu bu nedenle imidaclopridin doğrudan hedef organizması olmayan balıklar üzerine genotoksik etkiye sahip bir kimyasal olduğu söylenebilir.

Bu çalışmanın daha sonra *O. niloticus* fingerlinglerinin histopatolojik ve biyokimyasal stres tepkilerinin de ölçülerek daha da genişletilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Benzer çalışmalar özellikle ülkemizde ve dünyada yaygın olarak kullanılan pestisitlerin gıda olarak tüketilen diğer balık türleri ve sucul organizmalar üzerindeki etkilerini araştırmak için de yapılmalıdır.

İlaçlama yöntemi, ilaçlama sırasındaki hava koşulları, arazi yapısı gibi faktörler hesaba katılarak ilaçlama yapılmalıdır.

Tarımla uğraşanlara, Pestisit nasıl seçilir? Pestisitler nasıl kullanılır? Atıkları nasıl imha edilir? İlaçlama sonucunda boşalan pestisit ambalaj atıkları nasıl bertaraf edilmelidir? gibi konularda eğitimler verilmelidir.

Gıda olarak tüketilen sucul organizma veya besin zinciri elemanının bulunduğu su kaynaklarında pestisit seviyelerinin belirlenmesi için periyodik aralıklarla pestisit analizleri yapılmalıdır.

Tarımla uğraşanlara teşvikler verilerek kimyasal tarım yerine organik tarımı tercih etmeleri sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Yıldırım, E. “Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve Kullanılan İlaçlar” *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Yayınları*, No:219, Erzurum, 350 s, 2008.
2. Golfopoulos, S.K., Nikolaou, A.D., Kostopoulou, M.N., Xilourgidis, N. K., Vagi, M. C. Lekkas, D. T. “Organochlorine Pesticides in the Surface Waters of Northern Greece.” *Chemosphere*, 50: 507-516, 2003.
3. Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G. “Tarımsal Savaşmada Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları” *VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası*, Ankara, 3–7 Ocak 2005.
4. Atamanalp, M., Yanık, T. “Pestisitlerin Cyprinidae'lere toksik etkileri.” *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4): 555-563, 2001.
5. Verep, B., Kaplan, F., Yörük, Y., Turan, D. “Karbaril'in tatlisu kefali (*Leuciscus cephalus*) üzerine akut toksik etkisi.” *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3: 341-345, Trabzon, 2005.
6. Stalin, S.I., Kiruba, S., Das, S.S.M. “A Comparative study on the toxicity of a syntheticpyrethroid, deltamethrin and a neem based pesticide, azadirachtin to *Poeciliareticulata* Peters 1859 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae).” *Turk. J. Fish. Aquat. Sci*, 8: 01-05, 2008.
7. Morgan, E. R., Brunson, M. W. “Toxicities of Agricultural Pesticides to Selected Aquatic Organisms *SRAC Pub. No. 4600. 1-28*, 2002.
8. Toros, S. Maden, S. “Tarımsal Savaşın Yöntem ve ilaçları.” *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 1222 Ders Kitabı*, Ankara, 352,1991.
9. Altay, O. “İzmir Körfezinde Pestisit Kirliliğinin Araştırılması” *Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 85, 1997.
10. Öztürk, S. “Tarım İlaçları” . *Hasad Yayıncılık*. İstanbul, 1990.
11. Ware, G.W., Whitacre, D.M. “An Introduction to Insecticides. The Pesticide Book”, 6th ed., 2004.
12. El-Gendy, K.S., Aly N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A., El-Sebae, A.H., “ The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid.” *Food and Chemical Toxicology*, 48, 215-221, 2010.
13. Liu, G.Y., Miao,W., Ju, X.L. “Mechanisms of Imidacloprid Resistance in *Nilaparvata lugens* by Moleculer Modelling.” *Chinese Chemical Letters*, 21: 492-495, 2010.

14. Buckingham, S., Lapied, B., Corronc, H., Sattelle, F. "Imidacloprid Actions on Insect Neuronal Acetylcholine Receptors." *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2685-2692, 1997.
15. U.S.EPA. "Office of Pesticide Programs." *Pesticide fact sheet: Imidacloprid.*, Washington, D.C., Mar.18., 1994.
16. Matsuda K., Buckingham S.D., Kleier D., Rauh J.J., Grauso M., Sattelle D.B. "Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors." *Trends in Pharmacological Sciences*; 22, 11, 573-580, 2001.
17. Kidd, H., James, D. Eds. "Agrochemical Handbook. Third Edition." *Royal Society of Chemistry*. Cambridge, İngiltere., 1994.
18. Tomizawa, M., Casida, J.E. "Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action." *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*; 45: 247-268. 2005.
19. David D., George I. A., Peter J.V. "Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: Imidacloprid poisoning in a human." *Clinical Toxicology*; 45: 485-486, 2007.
20. Drobne D., Blazic M., Van Gestel C.A.M., Leser V., Zidar P., Jemec A., Trebse P. "Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea)." *Chemosphere*; 71, 1326-1334., 2008.
21. Tardiff, R.G. "Methods to Assess Adverce Effects of Pesticides on Non-Target Organism." Scobe 49.IPCS joint Symposia 16 SGOMSEC. *John Wiley and His Sons LTD*. England 270 p.,1988.
22. Burgeot, T., His, E., Galgani F. "The Micronucleus Assay in *Crassostera gigas* for the Detection of Seawater Genotoxicity." *Mutat. Res.* 342 pp, 125-140., 1995.
23. Sanchez-Galan, S., Linde Ar., Izquierdo JI., Garciazquez E. "Micronuclei and Flactuating Assymetry in Brown Trout (*Salmo trutta*): Complementary Methods to Biomoni-tor Freshwater Ecosystems." *Mutat. Res.* 412 pp, 219-225., 1998.
24. Majone F., Brunetti R., Fumagalli O., Gabriele M., Levis AG. "Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis*." *Mutat. Res.* 244: 147-151, 1990.
25. Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J.T., Newell G.W., Salamone M.F. "The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: a report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program." *Mutat. Res.*123: 61-118.,1983.

26. Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B., Trebse, P. "Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment." *Chemosphere*, 76: 907–914., 2009.
27. Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. "Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water." *Mutat. Res.* 343: 121-135., 1995.
28. Labay, K., Ould-Elhkim, M., Kles, V., Guffroy, M., Poul JM, Sanders P. "Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat." *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21: 441-51., 2001.
29. Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek, Z., Wierzycka, K., Swierniak, A. "Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis." *Int. J. Radiat. Biol.* 77: 631-6, 2001.
30. Çavaş, T. "Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronükleus ve AgNOR Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ ve Laboratuvar Koşulları Altında Araştırılması.", *Mersin üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi*, 2004.
31. Tuncer, E. "Tarımsal İlaçların Çevre Kirliliği Üzerine Etkileri ve Alınması Gereken Önlemler." *T.C. Tarım Bakanlığı Zir. Müc. ve Kar. Gen. Müd. Basılmamış Seminer Notları*, Sivas, 5s., 1987.
32. EPA (Environmental Protection Agency), "Types of Pesticides." Washington D.C., USA. (Online) <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm> (31 Aralık 2009)., 2009.
33. Devine, G.J. Furlong, M.J. "Insecticide use: Contexts and ecological consequences." *Agricultural and Human Values.* 24(3): 281-306, 2007.
34. Tomizawa, M., Casida, J.E. "Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action." *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*; 45: 247-268, 2005.
35. Kocaman, A.Y., Topaktaş, M. "In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes." *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 48: 483-490, 2007.
36. Dai, Y. J., Chen, T., Zhang, W. J., Liu, Z.H., Ge, F., Yuan, S., "Metabolism of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Thiacloprid by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Strain IM-2." *J. Agric. Food Chem*, 58(4): 2419-25, 2010.
37. İnternet: EPA, "Imidacloprid Summary Document Registration Review: Initial Docket December 2008." EPA-HQ-OPP-2008-0844, www.regulations.gov, 2010.

38. Tomizawa M., Casida J.E. "Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors." *British Journal of Pharmacology*. 127: 115-122, 1999.
39. Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B. "Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors." *Trends in Pharmacological Sciences*. 22(11): 573-580, 2001
40. Tomizawa, M., Casida, J.E. "Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action." *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*. 45: 247-268, 2005.
41. Fenech, M., Crott, J.W. "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclearbuds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay", *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Mutation Research*, 504: 131-136, 2002.
42. Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R. "The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity." *Mutat Res*, 244: 95-103., 1990.
43. Demirel, S, Zamani, A. "MN tekniği ve kullanım alanları." *Genel Tıp Dergisi*; 12(3): 123-7., 2002.
44. Von Ledebur, M.M., Schmid, W. "The micronucleus test: Methodological aspects." *Mutat Res*, 19: 109-17., 1973.
45. Högstedt, B., Karlsson, A. "The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used." *Mutat Res*, 156: 229-32., 1985.
46. Çavaş, T., Ergene Gözükara, S. "Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment." *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46: 64-70., 2005.
47. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L. Myers, M.S. "An assesment of the piscine micronucleus test as an in-situ biological indicator of chemical contaminant effects.", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 2723-2136. 1990.
48. Çavaş, T., Könen, S. "Askorbik asitin *O. niloticus* üzerindeki antigenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması." <http://20biyolojikongresi.pau.edu.tr> , 2010.
49. Hooftman, R.N., Raat, W.K. "Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaena*) by ethyl methanesulphonate." *Mutat. Res.* 104, 147- 152., 1982.

50. Hoofman, R.N., Vink, G.J. "Cytogenic Effects on the Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaea*) Exposed to Ethyl Methane Sulphonate, Benzo(a)pyrene and River Water.", *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5, 261- 269., 1981.
51. Al-Sabti, K. "Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L." *Comp. Biochem. Physiol*, 85C(1): 5- 9., 1986.
52. Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijanic, B., Knez, S. Stegnar, P. "Chromium induced micronuclei in fish", *J. Appl. Toxicol.* 14: 333-336, 1994.
53. Arkhipchuk, V.V. Garanko, N.N. "Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells ", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 42–52, 2005.
54. Ahmad, W., Ali, M.N., Farah, M.A., Ateeq, B. "Computerized automated morphometric assay including frequency estimation of pentachlorophenol induced nuclear anomalies (micronucleus) in catfish *Heteropneustes fossilis*", *Chromosoma*. 110(8): 570-4, 2002.
55. Abul Farah, M., Ateeq, B., Niamat Ali, M., Ahmad, W. "Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 25–29, 2003.
56. Ergene, S., Çavaş, T., Aymak, C. "Cypermethrin'in *Oreochromis niloticus* (L.,1758) üzerindeki genotoksik etkilerin mikronükleus testi ile araştırılması", *XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, Cilt 2: 765-771, 2001.
57. Neuparth, T., Bickham, W., Theodorakis, W., Costa, F.O., Costal, M.H. "Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assays", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76: 242-248, 2006.
58. Dikel, S. "Su Sıcaklığının Balık Yetiştiriciliğine Etkisi." *Alınleri Dergisi*, 16(B): 42-49, 2009.
59. Ergene, S., Kaya, F., Pekcan, I., Oral, A. "A Karyological analysis of *Oreochromis niloticus* L., 1758 (Pisces, Cichlidae) used in aquaculture", *Proceeding of the First International Symposium on Fisheries and Ekoloji*, Trabzon, Turkey, pp:191-195, 1998.
60. Cavas, T., Ergene Gozukara, S. "Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent", *Mutat. Res.*538(1-2):81-91, 2003.

61. Anonymous. "Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA, WPCF" Washington, D.C. 1971.
62. İnternet: Chakravarty, S., "World Agrochemical and Pesticide Market to Grow 8.7 % annually from 2014 to 2018" Erişim tarihi: 05.06.2014. <http://www.marketresearchreports.com/blog/2014/01/06/world-agrochemical-and-pesticide-market-grow-87-annually-20142018#sthash.Ah9mn8eN.dpuf>, 2014.
63. Ergene, S., Portakal, E., Karahan, A. "Karyological Analysis and Body Proportion of Catfish (Clariidae, *Clarias lazera*, Valenciennes, 1840) in the Göksu Delta, Turkey." *Tr. J. Zool.* 23: 423-426, 1999.
64. Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S. "Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri." *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2): 154-169, 2010.
65. Goulson, D. "An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides." *Journal of Applied Ecology*, 50, 977-987, 2013.
66. Kurwadkar, S.T., Dewinne, D., Wheat, R., McGaha, D.G., Mitchell, F.L. "Time Dependent Sorption Behavior of Dinotefuran, Imidacloprid and Thiamethoxam." *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48: 237-242, 2013.
67. Ansoar-Rodríguez, Y, Christofolletti, C. A., Marcato, AC, Correia ,JE, Fontanetti, C. S, Bueno, O. C, Malaspina, O. "Genotoxic Potential of the Insecticide Imidacloprid in a Non-Target Organism (*Oreochromis niloticus*-Pisces) *Journal of Environmental Protection*", 6: 1360-1367, 2015.
68. EU, "Comission implementing regulation (EU), No: 487/2013 of 24 may 2013." *Official journal of European Union*. P. 12-26, 2013.
69. EPA, "Office of Pesticide Programs, Pesticide Fact Sheet: Imidacloprid", Washington, DC, 1994.
70. Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Spano, M.A., Centeno, A.J. "Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury." *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 293-29, 1997.
71. Brunetti, R., Majone, F., Gola, I., Beltrame, C. "The Micronucleus Test; Examples of Application to Marine Ecology." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44: 65-68, 1998.
72. Karahan, A. "İmidacloprid ve thiamethoxaminin Anadolu Bal Arısı üzerine etkileri." *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.* 59 s., 2015.

73. Akbaş, D. “Neonikotinoid insektisitlerden imidaclopridin kurbağa (*Rana ridindibula*) iskelet kası üzerine elektrofizyolojik ve histolojik etkilerinin araştırılması.” *Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi.* 109 s., 2014.
74. Andaç Z. “İmidacloprid uygulamasının mısır kültür formlarında yarprak anatomisi parametrelerine etkisi.” *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.* 69 s., 2015.
75. Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. “Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cell”, *Mutat. Res.* 534(1-2): 93-99, 2003.
76. Könen, S., Çavaş, T. “Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test.” *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49 (6), 434–438, 2008.
77. Neuparth, T., Bickham, W., Theodorakis, W., Costa, F.O., Costal, M.H. “Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assay.”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76: 242-248, 2006.
78. Selvi, M., Çavaş, T., Benli, A. C. K., Memmi, B. K., Cinkiliç, N., Dinçel, A. S., Vatan, O., Yılmaz, D., Sarıkaya, R., Zorlu, T., Erkoç, F. “In vivo Genotoxicity Assessment of Esbiothrin in Fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) Using the Micronucleus Test and Comet Assay.” *Drug Metabolism Reviews.* 42: 126-127, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma SOYSALDI 1982 yılında Sivas'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladı. Süleyman Demirel Anadolu Lisesi mezunu olup, 2001 yılında kazandığı Gazi Üniversitesi Kırşehir Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2013 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 2016 yılında yüksek lisansını tamamladı.

Adres: Merkez /NEVŞEHİR

E-posta: fatma8280@hotmail.com