

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**MANEB ve METOKSİKLORUN, *BUFO BUFO* (LINNAEUS, 1758) ve  
*BUFO VIRIDIS* LAURENTI, 1768 (SALIENTIA: BUFONIDAE)  
POPULASYONLARINDA LARVA GELİŞİMİ ve ÜREME SİSTEMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Mert GÜRKAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 14/07/2011**

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG**

**ÇANAKKALE**

## DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

MERT GÜRKAN tarafından DOÇ. DR. SİBEL HAYRETDAG yönetiminde hazırlanan “MANEB ve METOKSİKLORUN, *BUFO BUFO* (LINNAEUS, 1758) ve *BUFO VIRIDIS LAURENTI*, 1768 (SALIENTIA: BUFONIDAE) POPULASYONLARINDA LARVA GELİŞİMİ ve ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG

---

Danışman

Prof. Dr. C. Varol TOK

---

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Figen ERKOÇ

---

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Şükran CİRİK

---

Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Belda ERKMEN

---

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2011

Prof. Dr. İsmet KAYA

---

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu doktora tezi ÇOMÜ-BAP tarafından 2010/02 no’lu projeden desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Mert GÜRKAN

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın yűrűtűlmesinde yardımlarını ve desteęini esirgemeyen ve her konuda yol gűsteren danıőmanım Çanakkale Onsekiz Mart Ŭniversitesi Biyoloji Bűlűmű űęretim űyesi sayın hocam **Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG**'a, çalıőmalarım sűresince bilimsel destek ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam **Prof. Dr. C. Varol TOK**'a, bu çalıőmayı 2010/02 no'lu proje kapsamında destekleyen **Çanakkale Onsekiz Mart Ŭniversitesi Rektűrlűęű Bilimsel Araőtırma Projeleri Komisyon Baőkanlıęı**'na, arazi çalıőmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım Batuhan Yaman YAKIN, Semih ŬSTEL ve Akın BULUT'a, istatistiksel analizlerin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Yahya TAYHAN'a, geçen sűrete manevi desteęini esirgemeyen Mısra BABAOGLU'na, ayrıca bana daima destek olan aileme en içten teőekkűrlerimi sunarım.

Mert GŬRKAN

## SİMGELER VE KISALTMALAR

♀♀: Dişi bireyler

♂♂: Erkek bireyler

**g:** Gram

**%:** Yüzde değer

$\bar{x}$ : Ortalama

**n:** Örneklem sayısı

**µm:** Mikrometre

**µl:** Mikrolitre

**µM:** Mikromolar

**µg:** Mikrogram

**mm:** Milimetre

**mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

**ark:** Arkadaşları

**p:** Önemlilik seviyesi

**CAS:** Kimyasal madde bilgi servisi

**FETAX:** Kurbağa embriyosu teratojenez denemesi Xenopus

**LC:** Letal konsantrasyon

**ppm:** Milyonda bir

**L:** Litre

**TVU:** Total vücut uzunluğu

**KU:** Kuyruk uzunluğu

**E:** En

**H&E:** Hematoksilen & Eosin

**PAS:** Periyodik asit schiff

**EDCs:** Endokrin Bozucu Kimyasallar

**Maneb:** Manganethilenbisdiyokarbamat

**Nb:** Neural boru

**S:** Somit

**Pt:** Pronefrik tübül

**K:** Karaciğer

**B:** Bağırsak

**Nt:** Notokorda

**Sl:** Solungaç lameli

**Gt:** Gonad taslağı

**M:** Mezonefroz

**O:** Ovaryum

**T:** Testis

**NF:** Nieuwkopp and Faber

## ÖZET

# MANEB ve METOKSİKLORUN, *BUFO BUFO* (LINNAEUS, 1758) ve *BUFO VIRIDIS* LAURENTI, 1768 (SALIENTIA: BUFONIDAE) POPULASYONLARINDA LARVA GELİŞİMİ ve ÜREME SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mert GÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG

14/07/2011, 140

Bu çalışmada, yurdumuzda yaşayan *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerine ait larvalarda, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin akut ve kronik toksik etkileri araştırılmıştır. Akut toksisite denemelerinde, 10-5000 µg/l maneb ve 1-100 µg/l doz aralığında metoksiklor, 21. evre larvalara 120 saat süreyle uygulanmıştır. Kronik toksisite denemelerinde ise 21. evre larvalara, 0,1-10 µg/l maneb ve 0,01-1 µg/l doz aralığında metoksiklor uygulaması yapılmıştır. *Bufo bufo* larvalarında, maneb için kronik toksisite denemeleri 35-55, metoksiklor ise 35-57 gün aralığında sürmüştür. *Bufo viridis* larvalarında ise maneb pestisitine ait kronik toksisite denemeleri 74-80, metoksiklor ise 74-88 gün aralığında sürmüştür. Akut denemeler neticesinde, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin larvalarda morfolojik ve histopatolojik değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Omurga eğriliği, visseral ödem ve kuyruk deformasyonları gözlenen morfolojik bulgulardır. Solungaçlarda lamellar birleşmeler, karaciğerde nekroz, pronefrik tübül deformasyonları, somit formasyonunda bozulmalar ve visseral ödem önemli histopatolojik bulgulardır. Larvaların metamorfozlarını tamamlamalarına kadar sürdürülen kronik denemeler sonucunda ise söz konusu pestisitlerin büyüme ve gelişmeyi baskılayıcı etkiler gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca maneb ve metoksiklorun, gonad gelişimi ve eşey

oranının değişimi üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir. Bu etkiler, söz konusu pestisitlerinin larvalarda endokrin bozucu etkilerinin olduğu sonucunu doğurmaktadır. Akut ve kronik toksisite denemelerine ait bulgular birlikte değerlendirildiğinde, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerine ait larvaların gelişim ve cinsiyet özelliklerinin kazanılmasında olumsuz etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, maneb, metoksiklor, larva



## ABSTRACT

### LARVA DEVELOPMENT and REPRODUCTIVE SYSTEM EFFECTS of MANEB and METHOXYCHLOR on *BUFO BUFO* (LINNAEUS, 1758) and *BUFO VIRIDIS* LAURENTI, 1768 (SALIENTIA: BUFONIDAE) POPULATIONS

Mert GÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair for Biology Thesis of Ph.D.

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG

14/07/2011, 140

At this study, were investigated acute and chronic toxic effects of maneb and methoxychlor pesticides on *Bufo bufo* and *Bufo viridis* larvae which lives in our country. Acute toxicity experiments, 10-5000 µg/l maneb and 1-100 µg/l doses range methoxychlor, 21<sup>st</sup> stage larvae were applied for 120 hours. In chronic toxicity experiments, 0,1-10 µg/l maneb and 0,01-1 µg/l dose range methoxychlor, 21<sup>st</sup> stage larvae were applied. Chronic toxicity experiments, for maneb 35-55, methoxychlor took 35-57 day range on *Bufo bufo* larvae. Chronic toxicity experiments belonging to maneb pesticides 74-80, 74-88 day range took for methoxychlor on *Bufo viridis* larvae. As a result of acute experiments, were found that maneb and methoxychlor pesticides caused by morphological and histopathological changes at larvae. Curvature of the vertebrae, visceral edema and tail deformations are observed morphological findings. Lamellar fusions of the gills, liver necrosis, pronephric tubule deformations, deteriorations of the somite formation and visceral edema are significant histopathological findings. As a result of chronic experiments carried out until the larvae complete to metamorphosing were shown that pesticides suppressive effects on growth and development. In addition, maneb and methoxychlor to be effective on gonadal development and sex ratio variation of larvae were observed. These effects on larvae occur that pesticides as the result of endocrine

disruptive affects. Taken together the findings of acute and chronic toxicity experiments, were found that maneb and methoxychlor pesticides have negative effects of development and gender characteristics on *Bufo bufo* and *Bufo viridis* larvae.

**Keywords:** *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, maneb, methoxychlor, larva

# İÇERİK

## Sayfa

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Toksikolojik Çalışmalarda Bioindikatör Türler Olarak Amfibiler.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Yurdumuzda Dağılışı Gösteren Bufonidae Familyasına Dahil Amfibi Türleri.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Bufonidae Familyasına Dahil Bazı Amfibi Türlerine Ait Larvalarda Yapılmış Toksikolojik ve Embriyolojik Çalışmalar.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Maneb Fungusinin Toksik Etkilerinin Araştırıldığı Bazı Çalışmalar .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5. Metoksiklor İnsektisitinin Toksik Etkilerinin Araştırıldığı Bazı Çalışmalar.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6. Larval Dönemdeki Amfibilerde Gonad Gelişimi.....</b>	<b>15</b>
<b>BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Larvaların Elde Edilmesi ve Saklama Koşulları .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Deney Düzenine Kurulması ve Pestisitlerin Uygulanması .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1. Akut toksisite denemeleri .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2. Kronik toksisite denemeleri .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Morfolojik İncelemeler .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Histopatolojik İncelemeler .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5. İstatistiksel Analizler .....</b>	<b>28</b>
<b>BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Larvaların Elde Edilmesine Ait Bulgular .....</b>	<b>29</b>

<b>4.2. Akut Toksikite Denemelerine Ait Araştırma Bulguları</b> .....	31
<b>4.2.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait araştırma bulguları</b> .....	32
<b>4.2.1.1. Morfolojik bulgular</b> .....	32
<b>4.2.1.2. Histopatolojik bulgular</b> .....	37
<b>4.2.1.3. İstatistiksel bulgular</b> .....	46
<b>4.2.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait araştırma bulguları</b> .....	57
<b>4.2.2.1. Morfolojik bulgular</b> .....	57
<b>4.2.2.2. Histopatolojik bulgular</b> .....	62
<b>4.2.2.3. İstatistiksel bulgular</b> .....	70
<b>4.3. Kronik Toksikite Denemelerine Ait Araştırma Bulguları</b> .....	82
<b>4.3.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarında kronik toksisite denemelerine ait araştırma bulguları</b> .....	82
<b>4.3.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarında kronik toksisite denemelerine ait araştırma bulguları</b> .....	97
<b>4.4. Tartışma</b> .....	115
<b>4.4.1. Larvaların elde edilmesine ait tartışma</b> .....	115
<b>4.4.2. Akut toksisite denemelerine ait tartışma</b> .....	116
<b>4.4.2.1. <i>Bufo bufo</i> ve <i>Bufo viridis</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait morfolojik tartışma</b> .....	116
<b>4.4.2.2. <i>Bufo bufo</i> ve <i>Bufo viridis</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait histopatolojik tartışma</b> .....	118
<b>4.4.2.3. <i>Bufo bufo</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait istatistiksel tartışma</b> .....	119
<b>4.4.2.4. <i>Bufo viridis</i> larvalarında akut toksisite denemelerine ait istatistiksel tartışma</b> .....	121
<b>4.4.3. Kronik toksisite denemelerine ait tartışma</b> .....	123
<b>4.4.3.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarında kronik toksisite denemelerine ait tartışma</b> .....	123
<b>4.4.3.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarında kronik toksisite denemelerine ait tartışma</b> .....	126

<b>BÖLÜM 5 - SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	129
---	-----

<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>131</b>
<b>Çizelgeler</b> .....	<b>I</b>
<b>Şekiller</b> .....	<b>IV</b>
<b>Özgeçmiş</b> .....	<b>XV</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Günümüzde özellikle tarımsal ve endüstriyel faaliyetlerde kullanılan kimyasal maddeler, insan ve ekosistem sağlığı üzerinde olumsuz etkiler doğurmaktadır. Bunlar arasında tarımsal faaliyetlerde istenmeyen zararlılarla mücadelede kullanılan pestisitler, çoğu zaman hedef olmayan organizmaların zarar görmesine veya ölümüne neden olmaktadır. Pestisitlerin kullanılmaya başlanması insanlık tarihi kadar eskidir. İlk kez M.Ö. 2500 – 1500 yılları arasında doğal toksik maddeler (sülfür, arsenik, civa ve kurşun) tarım zararlılarıyla mücadele amacıyla kullanılmıştır (Fridgen, 2009). Türkiye’de pestisit kullanılmaya başlanması 1960’lı yıllarda DDT (dikloro difenol trikloroetan) ile olmuştur (Kolankaya, 2006). Süre gelen zamanda insanoğlu tarafından üretilen yeni sentetik pestisitler tarımsal faaliyetlerde daha fazla kullanılır hale gelmiştir. Küresel ölçekte yılda milyarlarca ton pestisit, tarımsal faaliyetlerin yaklaşık %70’lik bir bölümünde hali hazırda kullanılmakta ve bunun sonucunda doğada bazı olumsuz etkiler gözlenmektedir (Arya, 2005).

Bilinçsiz ve kontrolsüz kullanım sonucu, doğada miktarı giderek artan pestisitler ve organizmalar arasında etkileşimlerin olması kaçınılmazdır. Bu etkileşimlerden en çok insan ve hayvansal organizmaların üreme sistemleri zarar görmektedir (Colborn, 1993). Günümüzde kullanılan pek çok pestisit, canlıların endokrin sistemi üzerinde etkilidir. Doğal ya da sentetik olabilen ve endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılan bu maddeler, endokrin sistem tarafından sentezlenen endojen kimyasalların aktivitelerini taklit ettikleri, engelledikleri ya da değiştirdikleri için son yıllarda fazlaca dikkat çekmektedirler (Bandiera, 2006). Bu kimyasallar, östrojen ve androjen reseptörleri ile reaksiyona girip, endojen hormonlara agonist ya da antagonist olarak etki gösterebilirler. Endokrin bozucu kimyasalların, endojen hormonlar üzerindeki söz konusu etkileri sonucunda, organizmada ciddi sağlık sorunları meydana gelmektedir (Goldman, 1997). Gonad ve diğer üreme organlarında görülen anomaliler, sperm yoğunluğundaki azalmalar ve bunların etkisiyle popülasyonların üreme başarısındaki kayıplar bu sorunlardan en önemlileridir (Guillette ve ark., 1994; Facemire ve ark., 1995; Allner ve ark., 2009).

Çalışmada kullanılan pestisitlerden birisi olan maneb (CAS No: 12427-38-2), ditiyokarbamatlı pestisitlerdendir. Maneb, endokrin bozucu kimyasallar arasında yer almaktadır (Edwards ve ark., 1991). Tarımda fungusit olarak kullanılan mangan ethilenbisditiyokarbarmatın yaygın adıdır (Kapoor ve ark., 1994). Maneb; meyve, sebze,

buğday ve bunun yanı sıra ceviz, fındık, fıstık gibi kabuklu mahsullerin tarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yurdumuzda da tarımsal faaliyetlerde kullanımı oldukça yaygındır (Tezcan, 2009).

Çalışmada kullanılan bir diğer pestisit olan metoksiklor (CAS No: 72-43-5), organoklorlu bir insektisittir. DDT'nin analogu olup, aromatik halkaya bağlı klorlar yerine metoksi (-OCH<sub>3</sub>) grupları geçmiştir (Vural, 1996). Metoksiklor; sivrisinek, ekin zararlısı ve karaböceklerle mücadelede kullanılan bir insektisittir. Endokrin ve üreme sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı metoksiklor, endokrin bozucu kimyasallar kategorisine dahildir (Chapin ve ark., 1997; Hu ve Kupfer, 2002; Choi ve ark., 2004). Farklı türler üzerinde yapılan araştırmalar, metoksiklorun özellikle fertilité başarısını düşürücü etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Martinez ve Swartz, 1992; Fort ve ark., 2004a; Fort ve ark. 2004b; Gupta ve ark., 2006). Organizmada bu etki, metoksiklorun dişi bireylerin ovaryumunda atreziye neden olması ve bu sebeple ovaryum hücrelerinin hormon sentez ve sekresyon yeteneklerinin sekteye uğraması veya erkek bireylerde testiküler dejenerasyon neticesinde sperm sayısı ve kalitesinde azalmalar şeklinde gözlenmektedir (Martinez ve Swartz, 1992; Mwatibo ve Green, 1998). Yapılan bazı çalışmalarda ise metoksiklorun sadece östrojenik etki gösterdiği belirtilmektedir (Ousterhout ve ark., 1981). Söz konusu çelişki, in vitro çalışmalarda metoksiklorun östrojen reseptörlerine bağlanma afinitesinin oldukça düşük olması ancak in vivo çalışmalarda ise metoksiklorun endokrin bozucu etkilerinin bariz gözlenmesinden kaynaklanmaktadır (Bulger ve ark., 1985). Metoksiklorun tarımsal faaliyetlerde kullanımı Avrupa Birliği'ne üye ülkelerde 2002 yılında, ABD'de 2003 yılında yasaklanmıştır. Söz konusu yasaklamalara rağmen Bulut ve ark. (2010)'nın Afyonkarahisar'da yapmış oldukları içme sularındaki organoklorlu pestisit kalıntıları konulu çalışmalarında, içme sularındaki metoksiklor miktarının kabul edilebilir değerlerin üstünde olduğu bildirilmektedir. Ayrıca yasaklanmış olmasına rağmen metoksiklor ve diğer pek çok organoklorlu pestisit Türkiye'deki sucul ekosistemlerde mevcut olduğu farklı çalışmalarda belirtilmektedir (Tuncer ve ark., 1998; Çalışkan ve Yerli, 2000; Ekmekçi ve ark., 2000; Erkmen, 2004; Uluocak ve Egemen, 2005). Bu durum, yasal düzenlemelere karşın bu pestisitlerin yasa dışı yollarla günümüzde halen kullanıldığını göstermektedir.

Son zamanlarda, amfibi populasyonlarında küresel ölçekte gözlenen azalmalar ve nedenleri ciddi bir ekolojik problem halini almıştır. Özellikle son 25 yılda amfibi populasyonlarında gözlenen bu azalmalar daha dramatik boyutlara ulaşmıştır (Beebe ve Griffiths, 2005). Geçen süreçte, 35 amfibi türünün nesli kesin olarak sona tükenmiş, 26 tür ise yapılan çalışmalarda doğada tespit edilememiştir (Stuart ve ark., 2004). Söz konusu azalmaların nedenlerini açıklayabilmek için pek çok hipotez ortaya atılmıştır. Bunlardan bazıları; kimyasal kirlilik, habitat bozulmaları, hastalıklar, predasyon, tür içi ve türler arası rekabet, atmosferik ozon seviyesindeki azalmaya bağlı ultraviyole radyasyonun artışıdır (Bernabo ve ark., 2008). Bunlar arasında, kimyasal kirliliğe bağlı olarak meydana gelen habitat bozulmaları, amfibi neslinin devamını önemli ölçüde tehdit etmektedir. Kimyasal kirleticiler arasında doğal habitatları en fazla etkileyenler; zirai kimyasallar (gübre, insektisit, fungusit, herbisit) ve fabrikaların toksik atıklarıdır (Stuart ve ark., 2004). Tarımsal faaliyetler sırasında kullanılan pestisitlerin kontrolsüz ya da bilinçsiz bir şekilde kullanılmasıyla, doğal habitatlar zarar görmekte ve sonuçta insan etkisiyle meydana gelen bir kimyasal kirlilik gözlenmektedir. Pestisitlerin canlılarda; üreme, büyüme ve gelişim üzerindeki olumsuz etkileri özellikle sucul ekosistemlerde daha bariz şekilde ortaya çıkmaktadır (Munoz ve ark., 2009). Risk değerlendirilmesi yapıldığında, amfibiler diğer sucul omurgalılara nazaran daha ciddi tehdit altındadırlar (Tyler, 1994). Amfibilerin, yumurta bırakmak için genellikle tarım alanları yakınlarındaki sığ ve mevsimsel su birikintilerini kullanmaları, bu riskin daha fazla olmasındaki en önemli nedendir (Colins ve Storfer, 2003). Embriyonik ve larval dönemlerini su içerisinde geçiren amfibilerin; vücutlarının küçük olması, derilerinin oldukça hassas ve geçirgen olması, aktivite kapasitelerinin sınırlı olması ortamdaki kirleticilere karşı hassasiyetlerini daha fazla arttırmaktadır (Wells, 2007). Bu özelliklerinden dolayı amfibiler özellikle sucul ekosistemlerdeki çevresel değişikliklerin anlaşılmasında oldukça sık kullanılan bioindikatör türler halini almıştır (Wyman, 2005).

Bu çalışmada, *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerine ait larvalarda, akut ve kronik olarak maneb ve metoksiklor pestisitlerinin uygulanması sonucu; larval dönemde meydana gelebilecek morfolojik ve histolojik anomaliler, mortalite oranları, pestisitlerin letal konsantrasyonları, pestisit maruziyetine bağlı olarak oluşacak eşey oranındaki farklılıklar ve metamorfoz süresindeki sapmalar belirlenmesi ve bu sayede, doğada pestisitlere



kendiliğinden maruz kalabilecek amfibi türlerindeki toksik etkilerin detaylı bir biçimde ortaya koyulması amaçlanmıştır. Söz konusu türlerin larvaları kullanılarak, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmaması ve literatürde bu yöndeki eksiklik üzerine, çalışmamızın önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Toksikolojik Çalışmalarda Bioindikatör Türler Olarak Amfibiler

Son yıllarda yoğunlaşan insan aktiviteleri neticesinde ekolojik sistemlerde hızlı bir değişim gözlenmektedir. Bu ekolojik değişimin nedenlerinin araştırıldığı pek çok bilimsel çalışma mevcuttur. Söz konusu çalışmalarda, olası ekolojik etkilerin ortaya koyulması için değişik hayvan türleri model organizma olarak kullanılmıştır. Bu türler içerisinde amfibilerin, özellikle üreme dönemlerinde suya daha fazla bağımlı olmaları ve larval dönemlerini tamamen su içerisinde geçirmeleri sebebiyle akuatik toksisite çalışmalarında sıkça kullanıldığı belirtilmektedir (Hopkins, 2007). Özellikle metamorfoz sürecindeki etkilerin araştırılmasında model organizma olarak en sık kullanılan amfibilerin, *Xenopus laevis* ve *Rana catesbeiana* örnekleri olduğu bildirilmektedir (Brown ve Cai, 2007). Bu amaçla geliştirilen metodlardan en sık kullanılanı ‘Kurbağa Embriyosu Teratojeniz Denemesi Xenopus (FETAX)’tur. FETAX metodu, zararlı kimyasal maddelerin söz konusu türün embriyonik ve larval dönemindeki toksik etkilerinin araştırılması için tasarlanmıştır.

Amfibilerin yaşam tarzının yanı sıra, küresel ölçekte gözlenen amfibi türlerindeki azalmalar, bu türler üzerinde yapılan toksikolojik çalışmaların sayıca artmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Stuart ve ark., 2004). Bu türlerin, doğal habitatlarda meydana gelebilecek değişiklikler karşısında oldukça duyarlı olmasının en önemli nedeninin, hassas ve geçirgen bir deriye sahip olmaları olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra amfibilerden, laboratuvar koşullarında embriyo ve larva elde etmenin kısmen kolay olması ve metamorfoz sürecinin takip edilebilme rahatlığı bu türlerin toksikolojik çalışmalar için elverişli yönleridir (Rowe ve ark., 2003).

Endokrin bozucu kimyasalların (EDCs) üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında amfibiler uygun model organizmalardır (Fridgen, 2009). Bunun en önemli nedeninin amfibilerde primer eşey karakterlerinin, larval dönemde bipotansiyel gelişim göstermesi, erginlerinde ise sekonder gelişebilecek olan eşey karakterlerinin östrojenik ve steroid ajanlara oldukça hassas olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Hayes, 1998; Mackenzie ve ark., 2003).

**2.2. Yurdumuzda Dağılışı Gösteren Bufonidae Familyasına Dahil Amfibi Türleri**

Bufonidae familyası kuyruksuz kurbağaların büyük gruplarından birisini teşkil eder. Bu familya genel olarak 7 alt familyaya ayrılır. Bunlardan, Türkiye’de temsilcileri bulunan alt familya Bufoninae’dir. Yurdumuzda bu alt familyaya ait sadece **Bufo** cinsi yaşar. Türkiye’de bu genusa dahil **Bufo bufo** ve **Bufo viridis** türlerinin dağılışı gösterdiği bildirilmektedir (Özeti ve Yılmaz, 1994).

**Bufo bufo** örnekleri, yurdumuzda Kuzeybatı Anadolu, Trakya, Ege, Karadeniz sahilleri ve Akdeniz sahillerinde dağılışı göstermektedir (Özeti ve Yılmaz, 1994). Trakya için üreme mevsiminin Mart ortasından Nisan sonuna kadar devam ettiği, ayrıca Nisan ayı ortasında da su içinde yumurtalara ve yüzen ergin hayvanlara rastlandığı belirtilmektedir. Trakya’da yaşayan **Bufo bufo** örnekleri için metamorfozun, Haziran başlarına kadar sürebileceği bildirilmektedir (Yılmaz, 1984). **Bufo bufo**, karasal bir tür olmakla beraber senede bir defa üremek için suya girer. Tercih ettiği sular çoğunlukla havuz veya gölcüklerdir, bazen sığ sularda da bulunur (Özeti ve Yılmaz, 1994).

**Bufo viridis** örneklerine, uygun habitat bulunduğu takdirde Türkiye’nin her tarafında (hem alçak ovalarda hem de yüksek dağlarda) rastlanılabilir (Özeti ve Yılmaz, 1994). Yapılan çalışmalarda, üreme mevsiminin başlangıcı Mart ayının ortası olarak kabul edilmektedir. Ancak üreme zamanı, mevsim şartlarına göre çok değişiklik göstermektedir. Yılmaz (1984), Trakya’da yapmış olduğu çalışmada, su içerisindeki ilk numunelere Mart ayı ortalarında, ilk yumurtalara ise Nisan başlarında rastlandığını bildirmektedir. Ayrıca Mayıs ayı başlarında henüz karaya çıkmakta olan genç numunelere rastlanmakla beraber, Keşan’da Haziran ayı başlarında henüz larva halinde yakalanan örneklerin olması sebebiyle, mevsimsel şartların bu türün üremesi üzerine son derece etkili olduğunu rapor etmiştir. Stöck ve ark. (2006), yapmış oldukları moleküler taksonomik çalışmadan sonra, tür ismi **Pseudepidalea viridis** olarak değiştirilmiştir.

**2.3. Bufonidae Familyasına Dahil Bazı Amfibi Türlerine Ait Larvalarda Yapılmış Toksikolojik ve Embriyolojik Çalışmalar**

**Bufo bufo** larvalarına 24, 48 ve 72 saat süreyle amonyum nitrat uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada, 50 mg/L amonyum nitrat uygulaması yapılan larvalarda metamorfoz süresinin kontrol grubu larvalara göre uzadığı bildirilirken, en yüksek doz

olan 100 mg/L amonyum nitrat uygulanan larvaların metamorfoz sürelerinde, kontrol grubuna oranla önemli bir farkın olmadığı rapor edilmiştir (Xu ve Oldham, 1997).

*Bufo quercus* örneğine ait farklı gelişim evrelerindeki larvalara 96 saat süreyle azadiraktin uygulaması yapılmıştır. Çalışmada 12, 16 ve 24. evre larvalar kullanılmıştır. Uygulama sonunda LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Gelişimin ilerleyen safhalarında, larvaların toksik maddeye karşı daha fazla direnç gösterdiği mortalite oranları ile ortaya koyulmuştur (Punzo, 1997).

*Bufo viridis* örneklerine ait larvalarda pronefroz ve mezonefroz tip böbreğin morfolojisi ve ultrastrüktürel yapısı araştırılmıştır. Bu çalışmada, her iki böbrek tipine ait yapıların larval dönemde, gelişim evrelerine göre gözlenen morfolojik ve histolojik farklılıkları detaylı bir biçimde rapor edilmiştir (Mobjerg ve ark., 2000).

Kete ve Yılmaz (2000), *Bufo viridis* larvalarının gelişim biyolojilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, İzmir ve civarında yaşayan *Bufo viridis* örneklerinden elde edilen larvaların embriyonik ve larval gelişimi doğal koşullar altında takip edilmiştir. Belli periyotlarda larvalara ait morfolojik karakterler incelenerek, bunların metamorfoz sürecindeki yapısal değişimleri bildirilmiştir.

Katzmann ve ark. (2003), *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarının metamorfoz süresince gelişimlerini incelemişlerdir. Bu çalışmada türlerin tek başına ve birlikte aynı ortam koşulları altında barındırıldıklarında meydana gelecek olan tür içi ve türler arası rekabetin, larval gelişime olası etkileri araştırılmıştır. Ayırt edici morfolojik karakterler olarak vücut uzunluğu ve vücut ağırlığının kullanıldığı çalışmada, haftalık periyotlarda larvaların evreleri belirlenmiştir. *Bufo bufo* larvalarının, tek başlarına ve *Bufo viridis* larvalarıyla birlikte barındırıldığı koşullar altında metamorfozlarını tamamlama sürelerinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde *Bufo bufo* larvalarıyla birlikte barındırılan *Bufo viridis* larvalarında ise metamorfoz süresinin 6 gün kısaldığı rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada; *Bufo bufo* larvalarında gonad gelişimi ve gonad taslaklarında gözlenen ultrastrüktürel farklar ortaya koyulmuştur. *Bufo bufo* larvalarında eşey farklılaşmasının asimetric düzende meydana geldiği yani germ hücrelerinin öncelikle ovaryuma farklılaşma eğiliminde olduğu, testislere farklılaşmanın ise germ hücreleri ile medullar somatik hücreler arasında meydana gelen etkileşimlerden sonra olduğu

bildirilmiştir (Falconi ve ark., 2004).

Ahmad ve ark. (2005), *Bufo melanostictus* larvalarına, farklı dozlarda ACTH (adenokortikotropik hormon) uygulaması yapmışlardır. Çalışmada, büyüme hormonuyla antagonist etki gösterdiği bilinen ACTH etkisiyle; 0,01 IU/ml dozda kontrol grubuna oranla, larvaların gelişiminde gecikme görüldüğü bildirilmiştir.

*Bufo viridis* larvalarında, herhangi bir kimyasal ajan maruziyeti olmaksızın, derideki mukus bezinin konik hücrelerindeki glikokonjugatların histokimyasal yapısı incelenmiştir (Şahin ve ark., 2008).

Yin ve ark. (2008), *Bufo bufo gargarizans* larvalarında; asetoklor, butaklor, klorimuron-etil ve paraquat pestisitlerinin, letal-subletal konsantrasyonlardaki toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, söz konusu pestisitlere 96 saat maruziyet neticesindeki LC<sub>50</sub> değerleri ve larvalarda gözlenen davranışsal değişiklikler bildirilmiştir. Ayrıca bu pestisitlere subletal konsantrasyonlarda maruz bırakılan larvalarda oluşabilecek DNA hasarları comet yöntemiyle incelenmiş ve pestisitlerin artan dozlarında genotoksik etkilerin daha bariz gözlemlendiği belirtilmiştir.

*Bufo bufo* larvalarına organoklorlu bir pestisit olan endosulfanın; 24, 48 ve 96 saat maruziyeti sonucu oluşabilecek toksik etkiler araştırılmıştır. Çalışmada, maruziyete bağlı olarak solungaç morfolojisi ve histolojisinde meydana gelen değişiklikler immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelenmiş, nitrik oksit sentezindeki değişiklikler ve endosulfan pestisitine ait LC<sub>50</sub> değerleri rapor edilmiştir. Solungaçlarda oluşan hasar sonucu, gaz alışverişinde sorun yaşandığı ve buna bağlı olarak mukus salgısının miktarının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, solungaç epitelinde görülen inflamasyon ve oksijen miktarındaki azalmaya refleks olarak, uygulamanın özellikle 24. ve 48. saatlerinin ardından nitrik oksit sentezinin arttığı rapor edilmiştir (Bernabo ve ark., 2008).

Brunelli ve ark. (2009), çalışmalarında *Bufo bufo* larvalarına 25. evreden metamorfoz sonuna kadar 0,01, 0,05 ve 0,1 mg/l dozlarda endosulfan uygulaması yapmıştır. 43-52 gün aralığında süren uygulama periyodu süresince; larvaların ağırlık artışı, gelişimleri, mortalite oranları ve yüzme akvitileri incelenmiştir. Bu çalışmada, 0,05 ve 0,1 mg/l endosulfan uygulamasının yapıldığı larvalarda metamorfoz süresinin, kontrol grubu larvalara göre uzadığı, morfolojik anomaliler gözlemlendiği, ağırlık artışında azalmanın olduğu ve davranışsal değişikliklerin gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu etkilerden dolayı

endosulfan pestisitinin, amfibilerin larval gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Jones ve ark. (2009), *Bufo boreas* ve *Bufo americanus* türlerinin de dahil olduğu, 3 farklı familyaya ait 9 amfibi türü üzerine endosulfanın toksik etkilerinin araştırdıkları çalışmada, söz konusu pestisit amfibiler için oldukça toksik olduğunu rapor etmişlerdir.

#### **2.4. Maneb Fungusitinin Toksik Etkilerinin Araştırıldığı Bazı Çalışmalar**

Yapılan literatür araştırması sonucunda, manebin toksik etkilerini ortaya koymayı amaçlayan ve değişik türler üzerinde gerçekleştirilmiş pek çok çalışmaya rastlanmıştır.

*Xenopus laevis* larvalarına 0,1-5 ppm konsantrasyon aralığında, 10 gün süreyle maneb uygulaması yapılmıştır. Uygulamanın ardından yapılan incelemelerde, pestisite maruz bırakılan larvalarda notokord eğriliği ve kuyruk uzunluğunda kısalma tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, pestisit maruziyetine bağlı olarak larvalarda yüzme mesafesinin kısaldığı ve göz retinası melanosomlarının melanin pigmentlerinde azalmalar görüldüğü bildirilmiştir (Bancroft ve Prahlad, 1973).

Larsson ve ark. (1976), sıçanlarda yüksek dozlarda maneb uygulamasının teratojenik etki gösterdiğini fakat benzer etkinin farelerde gözlenmediğini bildirmişlerdir. Sıçanlarda, maneb maruziyeti sebebiyle ortaya çıkan malformasyonları; üyelerdeki anatomik deformasyonlar ve kraniofasiyal defektler olarak rapor etmişlerdir.

Dört farklı kemirgen türü üzerinde maneb ve iki metabolitinin (EBIS ve ETU) prenatal toksik etkilerinin incelendiği çalışmada, 480 mg/kg/gün maneb uygulamasının yapıldığı sıçanların fetuslarında hidrosefali gözlendiği bildirilmiştir (Chernoff ve ark., 1979).

Gosselin ve ark. (1984), köpeklerde akut maneb uygulamasının, organizmada refleks ve kas tonusunda azalma, denge kaybı ve solunumda kısmi felç gibi etkilerinin olduğunu rapor etmiştir.

*Triturus cristatus carnifex* örneklerinde deri yoluyla 10-12 hafta süreyle, 5 ppm maneb 80 (%80 manganez etilenbisdiokarbamat, %20 diğer içerikler) uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada, uygulamanın ardından örneklerden postamputasyon yöntemiyle ekstremite uzaklaştırılmıştır. Pestisit uygulamasının yapıldığı semenderlerde, ekstremite rejenarasyon süresinin kontrol grubundaki semenderlere göre daha uzun

sürdüğü belirtilmiştir (Zavanella ve ark., 1984).

Maci ve Arias (1987), manebin ticari formülasyonu olan maneb 80'in (%80 manganez etilenbisditiokarbamat, %20 diğer içerikler) tavuk embriyolarındaki toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, her grupta 157-207 adet tavuk yumurtası, 0,5, 1,5, 4,5 ve 13,5 g/l dozlardaki maneb solüsyonlarına, 30 saniye süreyle batırılmak suretiyle maruz bırakılmıştır. Uygulamanın ardından, inkübasyonunu tamamlayan yumurtaların açılmaları sağlanmıştır. Yapılan incelemeler neticesinde, manebin tavuk embriyolarında üye taslaklarının gelişiminde düşük oranda deformasyonlara neden olduğu rapor edilmiştir.

Tavuk yumurtalarında manebin toksik etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada; yumurtalar, %0,2 ve %1,2 maneb solüsyonlarına, 30 saniye batırılmak suretiyle maruz bırakılmışlardır. İnkübasyonun 18. gününde yumurtalar açılarak incelenmiştir. Yapılan incelemeler neticesinde, manebin teratojenik ve embriyotoksik bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Munk ve Schulz, 1989).

Kaloyanova ve Chemishanska (1989), albino sıçanlara inhalasyon yoluyla; 2, 12 ve 135 mg/m<sup>3</sup> dozlarda manebi 4,5 ay süreyle uygulamışlardır. Çalışma sonunda, erkek ratların testislerindeki sertoli hücrelerinde atrofik değişiklikler, seminifer tübül sayısında azalmalar gibi üreme kapasitesini azaltıcı yönde etkilerin gözlemlendiği bildirilmiştir.

CD-1 ırkı fareler, gebeliklerinin 6.-15. günleri arasında 1200 mg/kg/gün manebe maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada, doğan yavrularda manebin, iskelet sistemi üzerine etkileri araştırılmıştır. Doğum sonrası dönemde, 60.-65. günler arasındaki yavrular incelenmiştir. Manebe maruz bırakılan farelerin yavrularında, servikal ve kaudal bölge omurlarında ossifikasyon yoğunluğunun daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Beck, 1990).

Edwards ve ark. (1991), manebin sıçanlarda LD<sub>50</sub> değerinin 5000-8000 mg/kg olduğunu rapor etmişlerdir. Kidd ve James (1991), manebin farelerde LD<sub>50</sub> değerinin 8000 mg/kg olduğunu bildirmişlerdir.

Özbay ve ark. (1991), maneb ve zineb fungusitlerinin toksik etkilerini albino fareler üzerinde araştırmışlardır. 200 g maneb/100 l ve 300 g zineb/100 l konsantrasyonlarda hazırlanan pestisit çözeltileri marul aracılığıyla, 13 hafta süreyle farelere uygulanmıştır. Uygulama haftada 3 kez yapılmıştır. Çalışma sonunda karaciğer ve böbrek dokuları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Söz konusu dokularda, fungusit uygulamasına bağlı olarak mononükleer hücre infiltrasyonu ve doku nekrozunun gözlemlendiği rapor edilmiştir.

CR (R) ırkı sıçanlarda, maneb fungusitinin maternal ve yavrular üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, 20, 100 ve 500 mg/kg/gün dozlardaki maneb gebeliğin 6.-15. günleri arasında uygulanmıştır. 20. günde laparohysterectomi ile yavrular anneden ayrılmıştır. 20 mg/kg/gün maneb uygulamasının yapıldığı sıçanlarda ve yavrularında sistemik bir etkinin gözlenmediğini bildirmişlerdir. 500 mg/kg/gün maneb uygulaması yapılan sıçanlarda ise hareket kabiliyetinde bozulma ve postural defektler gözlenmiştir. 100 mg/kg/gün maneb uygulamasının yapıldığı gruptan itibaren fetüslerde gelişimsel toksik etkiler ve postimplantasyon kayıplarına rastlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca 100 ve 500 mg/kg/gün maneb uygulanan sıçanların fetüslerinde, ağırlık artışı ve besin tüketiminin diğer gruplara göre düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Nemec ve ark.,1993).

Güven ve ark. (1998), propineb ve maneb'in gebelik sürecindeki dişi sıçanlar ve fetüslerindeki toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, böbrek histopatolojisi ve bazı organlarda uygulanan kimyasalların birikim miktarları araştırılmıştır. Gebeliğin 6. gününden doğuma kadar 250 ppm manebe maruz bırakılan dişi sıçanların, böbreklerinde önemli histopatolojik bulgulara rastlandığı bildirilmiştir. Ayrıca fetüslerin organlarında söz konusu maddelerin, yüksek miktarlarda tespit edilmesi sebebiyle bu maddelerin plasenta bariyerini kolayca aşabildiğini bildirmişlerdir.

Maneb'in sıçanların testisleri üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, üç hafta süren uygulamanın ardından, kontrol ve uygulama grubu sıçanların testis ağırlıkları arasında istatistiksel yönden önemli fark olmadığı rapor edilmiştir. Histolojik kesitlerde, bazı seminifer tübüllerin içindeki spermatozoada deformasyonlara ve vaskularizasyona rastlandığı bildirilmiştir. Elektron mikroskobu incelemelerinde ise interstisyel hücreler ve kan damarlarında uygulamaya bağlı önemli bir bulguya rastlanmadığı rapor edilmiştir (Deveci, 2006).

Malleem ve ark. (2006), erkek tavşanlara beş hafta süreyle; 2, 3, 5 ve 8 mg/kg/gün maneb fungusitini gavaj aracılığıyla uygulamışlardır. Çalışma sonunda yapılan ölçümlere göre uygulama grubu tavşanların vücut ağırlığında artış olduğunu bildirmişlerdir. Biyokimyasal analizlerde, uygulama grubu tavşanlarda plazma trigliserit, glukoz ve kolesterol seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir. Beş ve 8 mg/kg/gün maneb uygulanan gruplardaki tavşanların, böbrek ve testis ağırlığında azalma olduğu bildirilirken,



karaciğer ağırlığında ise artış olduğu belirtilmiştir. Uygulama grubu tavşanlarda; tiroksin konsantrasyonunda düşüş, sperm sayısı, hızı ve hareket yeteneğinde azalmaların olduğu rapor edilmiştir.

### **2.5. Metoksiklor İnsektisitinin Toksik Etkilerinin Araştırıldığı Bazı Çalışmalar**

Yapılan literatür araştırması sonucunda, metoksiklorun toksik etkilerini ortaya koymayı amaçlayan ve değişik türler üzerinde gerçekleştirilmiş pek çok çalışmaya rastlanmıştır.

Dişi sıçanlara, 15. laktasyon gününden itibaren 25, 50, 100 ve 200 mg/kg/gün metoksiklor uygulamasının, yavru bireylerin üreme sistemi gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Metoksiklorun, dişi bireylerde vajinal açılmayı ve ilk estrusu hızlandırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. Erkeklerde ise pestisit maruziyetine bağlı olarak, seminal vezikül, kauda epididimis ve hipofiz ağırlıklarında bariz azalmalar ve büyümede gerilemeler görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca testis ağırlığı ve histolojisinin pestisit uygulamasından çok az etkilendiğinin belirtildiği bu çalışmada, testikular sperm üretimi, sperm morfolojisi ve mobilitesinin uygulamadan etkilenmediği rapor edilmiştir (Gray ve ark., 1989).

Cupp ve Skinner (2001), metoksiklor ve östrojenik etki gösterdiği bilinen HPTE metabolitinin, sıçan testislerindeki seminifer kord formasyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. In vitro çalışmada, embriyonik gelişimin 13. günündeki testis dokusu hücre kültürleri; 0,2, 2 ve 20 µM metoksiklor, 1, 3, 6, 15, 30 ve 60 µM HPTE solüsyonuna maruz bırakılmışlardır. Çalışma sonunda metoksiklor uygulaması yapılan hiçbir grupta kord gelişimini tamamen inhibe edici bir durum gözlenmediği bildirilmiştir. Ancak 2 ve 20 µM metoksiklor uygulaması gruplarındaki seminifer kordların daha şişkin görünümde oldukları rapor edilmiştir.

In vitro çalışmada, keçilerin epididimal sperm hücrelerinde, metoksiklorun toksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 1, 10 ve 100 µM/l metoksikloru tek başına ve ayrıca yine aynı dozlarda metoksiklora ilave olarak, her grup için 100µM/l C vitamini karışımını sperm hücresi kültürlerine ilave etmişlerdir. Çalışma sonunda, tek başına metoksiklor ve C vitaminiyle birlikte metoksiklor uygulandığı gruplardaki spermlerin, hareket yetenekleri ve hayatta kalma sürelerinde önemli bir farkın olmadığı rapor edilmiştir. Ancak tek başına

metoksiklor uygulamasının, oksidatif stresi tetikleyici etki gösterdiği ve bu sayede antioksidant enzim seviyelerinde düşüş gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca söz konusu etkilerin, C vitamini ilave edilen gruplarda gözlenmediği bildirilmiştir (Gangadharan ve ark., 2001).

Shimuzu ve ark. (2001), sıçan ve tavşanda, metoksiklorun prenatal gelişim üzerindeki toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, dişi sıçanlara gebeliğin 6.-19. günleri arasında 0, 1, 50 ve 150 mg/kg/gün metoksiklor, dişi tavşanlara ise gebeliğin 6.-27. günleri arasında 0, 1, 15 ve 45 mg/kg/gün metoksiklor uygulaması yapılmıştır. Doğumun ardından yapılan incelemelerde, her iki türde de pestisit maruziyetine bağlı malformasyonlara rastlanmamıştır.

Farelere, 10-20 gün arasında, 32 mg/kg/gün metoksiklor uygulamasının, ovaryum yüzey epiteli kalınlığını ve antral folikül sayısını arttırıcı etkileri olduğu bildirilmiştir (Borgeest ve ark., 2002).

Gebe sıçanlara doğumdan bir hafta önce 5-150 mg/kg/gün doz aralığında metoksiklor uygulamasının, doğan erkek yavruların testiküler büyüklüklerinde, epididimal spermatozoon sayısı ve sertoli hücresi sayısında azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir (Johnson ve ark., 2002).

Latchoumycandane ve ark. (2002), ergin sıçanların epididimal antioksidan sistemleri üzerine metoksiklorun toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla sıçanlara; 50, 100 ve 200 mg/kg/gün metoksiklor, oral yolla 1, 4 ve 7 gün süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonunda; total vücut ağırlığı, testis, karaciğer ve böbrek ağırlıklarının pestisit maruziyetine bağlı bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir. Ancak tüm dozlar ve uygulama sürelerinde epididimis, seminal vezikül ve ventral prostat ağırlıklarında pestisit maruziyetine bağlı azalmalar görüldüğü rapor edilmiştir.

Sprague-Dawley ırkı sıçanların üreme sistemi gelişimi üzerine, metoksiklorun tek başına ve bitkisel östrojen genistein ile birlikte uygulandığında oluşturacağı toksik etkiler araştırılmıştır. Sıfır ve 800 ppm metoksiklor uygulamasının yapıldığı çalışmada, metoksiklorun büyümede azalmaya sebep olduğu ancak gebeliğin sonuçlanmasında olumsuz bir etkisinin gözlenmediği rapor edilmiştir (You ve ark., 2002).

Amstislavsky ve ark. (2003), gebe farelere 2-4 gün arasında, 16,5 mg/kg/gün metoksiklor uygulamasının, embriyo gelişimini baskılayıcı etkileri olduğunu

bildirmişlerdir. Ayrıca metoksiklorun nuklear fragmentasyonu ve mikronukleus frekansını arttırıcı etkileri olduğunu rapor etmişlerdir.

Bevan ve ark. (2003), *Xenopus laevis* örneklerinin erken larval gelişim evrelerinde metoksiklora maruz bırakılması sonucu oluşan toksik etkileri araştırmışlardır. Bu çalışmada, 5 µM uygulanan metoksiklorun; omurga eğriliği, iç organlar boşluğunda şişkinlik gibi total malformasyonlara neden olduğu ve neural crest hücrelerinin farklılaşması üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Golub ve ark. (2003), dişi rhesus maymunlarına, peripubertal periyot boyunca 25 ve 50 mg/kg/gün metoksiklor uygulaması yapmışlardır. Çalışma sonunda metoksiklorun ebeveynlerde; adet döngüsünü baskılayıcı, foliküler fazı kısaltıcı, ovaryum kistlerinin sayısını arttırıcı etkiler gösterdiği ve yeni doğan yavrularda ise büyümeyi baskılayıcı etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Metoksiklorun, erkek Sprague-Dawley ırkı sıçanlarda prolaktin salgılamasını arttırıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (Lafuenta ve ark., 2003).

Fort ve ark. (2004b), *Xenopus laevis* örneklerine ait larvaların, dört farklı gelişim evresi üzerinde metoksiklorun toksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada;

1. Erken embriyo-larval denemeler (NF evre 8-46). Larvalara; 0,0001-1 mg/l doz aralığında metoksiklor, 4 gün süresince,
2. Arka bacak gelişim denemeleri (NF evre 8-54). Larvalara; 0,0001-0,1 mg/l doz aralığında metoksiklor, 30 gün süresince,
3. Metamorfoz sonlanma denemeleri (NF evre 58-66). Larvalara; 0,0001-0,1 mg/l metoksiklor, 18 gün süresince,
4. Ergin *Xenopus laevis* örneklerine, 0,001-0,1 mg/l metoksiklor, 30 gün süresince uygulanmıştır.

Erken embriyo-larval denemeler neticesinde, metoksiklorun mortalite oranını etkilemediği ancak iç organlarda ödem, kraniyofasiyal dismorfogenez ve az oranda notokord lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Arka bacak gelişim denemesinin sonuçlarına göre; 0,1 mg/l metoksiklorun, tiroid bezinde foliküler hiperplaziyi arttırıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir. Metamorfozun sonlanmasına yakın evrelerde uygulanan metoksiklorun, kuyruk rezorbsiyonunu inhibe edici etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ergin örneklere uygulanan metoksiklorun her iki eşeye ait gonadlarda olumsuz etkiler gösterdiği,

0,005 mg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı örneklerde üreme başarısının azaldığını bildirmişlerdir.

*Xenopus tropicalis* örneklerine ait larvalar (NF evre, 8); 90 gün süresince, 1-100 µg/l doz aralığında metoksiklora maruz bırakılmışlardır. Bu çalışmada, 10 µg/l'den fazla dozdaki metoksiklorun larval büyüme baskılayıcı etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca çalışmanın 30. gününden itibaren 10 µg/l dozdaki metoksiklorun, larvaların tiroid bezinde hiperplaziye neden olduğu rapor edilmiştir. Uygulama sonunda pestisit uygulamasının yapıldığı larvalarda; harici malformasyonlara, karaciğer ve gonadlarda deformasyonlara rastlandığı bildirilmiştir. 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruptaki juvenil kurbağalarda, eşey oranının dişiye doğru yöneldiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra dişilere ait örneklerin ovaryum ağırlığında ve oosit sayısında azalma, erkek örneklerde ise testis ağırlığı ve sperm sayısında azalmalar belirlendiği rapor edilmiştir (Fort ve ark., 2004a).

Gupta ve ark. (2007), metoksiklor ve iki metabolitinin (mono-OH metoksiklor, bis-OH metoksiklor) toksik etkilerini, ergin babun ovaryumlarından izole edilmiş antral foliküller üzerinde incelemiştir. Metoksiklorun 1-100 µg/ml, mono-OH metoksiklorun 0,1-10 µg/ml ve bis-OH metoksiklorun 0,1-10 µg/ml doz aralığında hücre kültürü ortamına, 96 saat süreyle uygulanmasının ardından antral foliküller incelenmiştir. Yapılan incelemelerde, söz konusu kimyasalların foliküler büyüme engelleyici ve atrezik foliküllerin sayısını arttırıcı etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

## **2.6. Larval Dönemdeki Amfibilerde Gonad Gelişimi**

Amfibilerin metamorfoz sürecindeki, organ taslaklarının oluşumu ve işlevsellik kazanmaları belirli bir sırada gerçekleşir. Organogenez sırasında gonad taslaklarının meydana gelmesi, amfibi sınıfına dahil türler içerisinde farklılık göstermektedir.

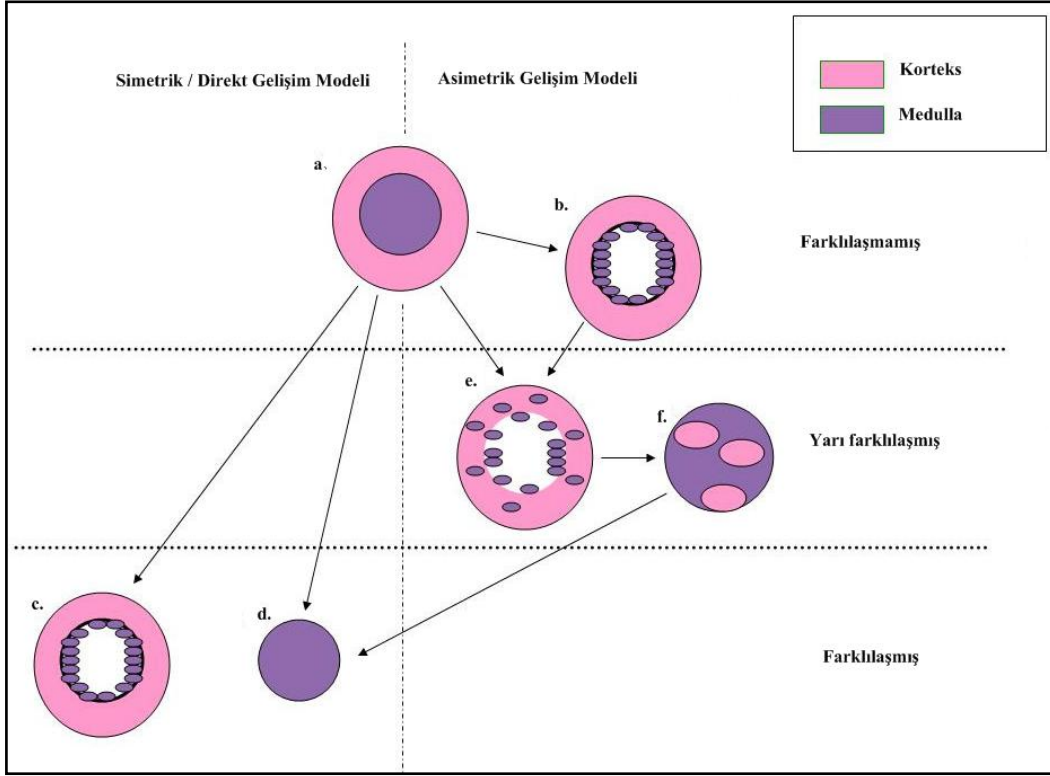
Witschi (1929), çalışmasında bazı amfibi türlerinde gonadların 'simetrik model' gelişim gösterdiğini bildirmiştir. Buna göre, larval evrede henüz farklılaşmamış gonad taslağının, doğrudan dişi ya da erkek gonada farklılaşabilme yeteneğinde olduğunu rapor etmiştir. Germ hücrelerinin pasif rol oynadığı bu tip gonad farklılaşmasında, oogenezin gonad taslağındaki kortikal somatik hücrelerin, spermatogenezin ise medullar somatik hücrelerin uyarılmasıyla meydana geldiğini bildirmiştir.

Bir diğer çalışmada, bazı amfibi türlerindeki gonad gelişiminin çift potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada; gonad taslağının, testis ya da ovaryuma farklılaşabilme kapasitesi olduğu rapor edilmiştir (Hayes, 2000).

Bufonidae familyasına dahil türlerde yapılan bir çalışmada, eşey organları gelişiminin ilkel ovaryum yapısında olan Bidder's organı sayesinde olduğu rapor edilmiştir. Bu yapının, larval gelişimin erken evrelerinde her iki eşeyde de gelişiminin gözlemlendiği, ovaryum ve testis farklılaşmasından önce oluşumunu tamamladığı bildirilmiştir (Petrini ve Zaccanti, 1998).

Falconi ve ark. (2004), çalışmalarında *Bufo bufo* larvalarında gonadların 'asimetrik model' gelişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna göre farklılaşmamış gonad taslağı ilk olarak bazal laminayla birbirinden ayrılmış korteks ve medulladan oluşan ovaryuma farklılaşır. Testislere farklılaşmanın, gonadal somatik hücrelerin, üreme hücrelerini tetikleyerek spermatogeneze sevk etmelerinin ardından, korteks ve medulla kısımlarının birleşmesi ve bazal laminanın kaybolmasıyla meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Fridgen (2009), *Rana pipiens* larvalarına atrazin uygulamasının gelişime etkilerini araştırdığı çalışmada, gonadların 'simetrik' ve 'asimetrik' gelişim modelini şematize etmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Amfibilerde gonad farklılaşması. a. Farklılaşmamış gonad taslağı, b. ve c. Bazal laminayla birbirinden ayrılmış korteks ve medulla bölgelerinden oluşan erken evre ovaryumu, d. Testis, e. Farklılaşmamış gonad taslağı ya da ovaryumdan gelişen ve bazal laminanın ortadan kalkmasıyla meydana gelen medulla ve korteks karışımı, f. Yarı farklılaşmış gonad, körelmiş testikular oosit (Fridgen, 2009).

Literatür özetinde de belirtildiği üzere, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kullanıldığı pek çok toksikolojik çalışma mevcuttur. Söz konusu pestisitlerin toksik etkileri, farklı uygulama dozları ve maruziyet biçimleri göz önünde bulundurularak, değişik canlılar üzerinde test edilmiştir. Benzer şekilde özellikle amfibi larvalarının hayvan materyali olarak kullanıldığı toksikolojik çalışmalara da literatürde rastlamak mümkündür. Ancak *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerinin larval dönemlerinde maneb ve metoksiklor pestisitlerine maruziyeti sonucu oluşacak toksik etkileri içeren bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

### BÖLÜM 3

#### MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 2010 yılı Şubat ayında, Çanakkale’de yapılan arazi çalışmaları ile toplanan amplexus halindeki 8 *Bufo bufo* (4 ♂♂; 4 ♀♀) örneğinden elde edilen 480 adet larva ve 12 *Bufo viridis* (6 ♂♂; 6 ♀♀) örneğinden elde edilen 480 adet larva kullanılmıştır.

Amplexus halindeki ergin kurbağa örnekleri, genellikle gün batımından sonra mevsimsel sığ su birikintilerinin yakınlarından, elle ve hayvanlara eziyet edilmeden yakalanmıştır. Toplanan örnekler, ıslatılmış bez torbalar içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir.

Yumurtlamanın gerçekleşebilmesi için amplexus halindeki kurbağa örnekleri, içerisinde 5 cm derinliğinde saf suyun ve ağaç dallarının bulunduğu 259×476×209 mm ebatlarındaki plastik kaplara alınmıştır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Amplexus halindeki *Bufo bufo* örnekleri.



Şekil 3.2. Amplexus halindeki *Bufo viridis* örnekleri.

**3.1. Larvaların Elde Edilmesi ve Saklama Koşulları**

Plastik kaplar içerisinde, yumurtlama ve ardından gerçekleşen döllenme sonrasında ergin kurbağa örnekleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kordon halinde bırakılan döllenmiş *Bufo bufo* (Şekil 3.1.1) ve *Bufo viridis* (Şekil 3.1.2) yumurtaları, 4 eşit parçaya ayrılarak 350×350×250 mm ebatlarında, içi 10 cm derinliğinde saf su dolu cam akvaryumlara alınmıştır. Akvaryumlardaki suya ait bazı fiziksel parametrelerden; çözülmüş oksijen, sıcaklık, pH ve elektriksel iletkenlik değerleri çalışma süresince, Thermo Orion 3 Star portatif ekolojik kit kullanılarak ölçülmüştür. Larvalar, doğal ışık alabilecekleri yerde, mevsimsel fotoperiyoda maruz bırakılmışlardır. Günlük periyotlarda ölen larvalar, dışkılar ve fazla besin maddeleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Larvalar, gelişimin erken evrelerinde bitkisel balık yemi, ilerleyen evrelerde ise haşlanmış marul ve ıspanakla beslenmişlerdir.



Şekil 3.1.1. Kordon halinde bırakılan döllenmiş *Bufo bufo* yumurtaları.



Şekil 3.1.2. Kordon halinde bırakılan döllenmiş *Bufo viridis* yumurtaları.



### 3.2. Deney Düzenine Kurulması ve Pestisitlerin Uygulanması

*Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvaları, 21. evreden (Gosner, 1960) itibaren maneb ve metoksiklor pestisitlerine maruz bırakılmışlardır. Pestisit uygulamasına başlamak için 21. evrenin seçilmesinin nedeni, larvaların bu evreyle birlikte tamamen solungaç solunumuna geçmeleridir. Maneb ve metoksiklor pestisitlerinin toksik etkilerini araştırmak amacıyla 2 farklı uygulama yapılmıştır.

#### 3.2.1. Akut toksisite denemeleri

21. evre *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle aşağıda belirtilen dozlarda maneb ve metoksiklor uygulaması yapılmıştır.

Uygulanan Pestisit: Maneb

Uygulama Grupları:

Kontrol Grubu (K): 0 µg/l

1. Doz (1D): 10 µg/l

2. Doz (2D): 50 µg/l

3. Doz (3D): 100 µg/l

4. Doz (4D): 1000 µg/l

5. Doz (5D): 5000 µg/l

Uygulanan Pestisit: Metoksiklor

Uygulama Grupları:

Kontrol Grubu (K): 0 µg/l

1. Doz (1D): 1 µg/l

2. Doz (2D): 5 µg/l

3. Doz (3D): 10 µg/l

4. Doz (4D): 50 µg/l

5. Doz (5D): 100 µg/l

Akut toksisite denemelerine ait uygulama dozları belirlenirken, pestisitlerin sudaki maksimum çözünürlük konsantrasyonları dikkate alınmıştır. Bu amaçla yapılan literatür taramasında, metoksiklorun 25°C sudaki maksimum çözünürlüğü 100 µg/l, manebin ise 6000 µg/l olduğu bildirilmektedir (Kidd ve James, 1991).

Uygulamaya geçmeden önce, %98 maneb (Merck) için 5000 µg/l, % 98 metoksiklor (Merck) için ise 100 µg/l'lik stok solusyonlar saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok solusyonlar, çalışma başlangıcında taze olarak hazırlanmış olup, gruplara belirtilen dozlarda saf su ile seyreltilerek uygulanmıştır. Çalışma süresince larvalar mevsimsel fotoperiyoda maruz bırakılmıştır.

Akut toksisite denemelerinde, her grup için morfolojik anomalisi ve gelişim bozukluğu olmayan 20 adet sağlıklı larva kullanılmıştır. Larvalar, içerisinde 5 litre uygulama solusyonunu bulunduran, 350×350×250 mm ebatlarındaki cam akvaryumlarda

pestisitlere maruz bırakılmıştır (Şekil 3.2.1.1). Larvalara uygulama sürecinde her hangi bir besin maddesi verilmemiştir. Çalışma süresince 24 saatlik periyotlarda ölen larvalar ve dışkıları ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ayrıca 24 saatlik periyotlarda akvaryumlardaki suya ait çözülmüş oksijen, sıcaklık, pH ve elektriksel iletkenlik değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.2.1.1. Akut toksisite denemesine ait uygulama akvaryumları.

### 3.2.2. Kronik toksisite denemeleri

21. evre *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarına, kuyruk rezorbsiyonunun sonlandığı ve ekstremit gelişiminin tamamlandığı 46. evreye kadar aşağıda belirtilen dozlarda maneb ve metoksiklor uygulaması yapılmıştır.

Uygulanan Pestisit: Maneb

Uygulama Grupları:

Kontrol Grubu (K): 0 µg/l

1. Doz (1D): 0,1 µg/l

2. Doz (2D): 0,5 µg/l

3. Doz (3D): 1 µg/l

4. Doz (4D): 5 µg/l

5. Doz (5D): 10 µg/l

Uygulanan Pestisit: Metoksiklor

Uygulama Grupları:

Kontrol Grubu (K): 0 µg/l

1. Doz (1D): 0,01 µg/l

2. Doz (2D): 0,05 µg/l

3. Doz (3D): 0,1 µg/l

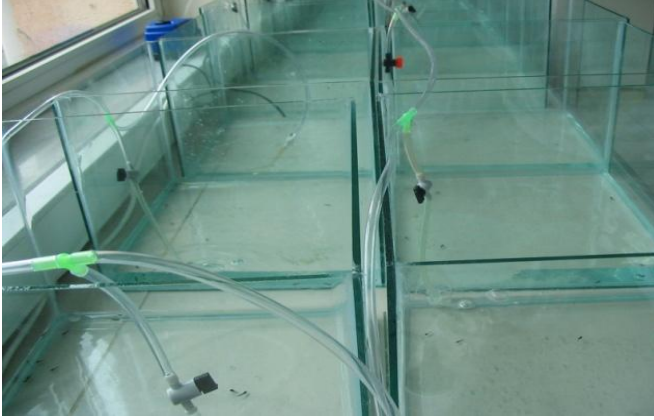
4. Doz (4D): 0,5 µg/l

5. Doz (5D): 1 µg/l

Uygulamaya geçmeden önce, %98 maneb (Merck) için 10 µg/l, % 98 metoksiklor (Merck) için ise 1 µg/l'lik stok solusyonlar saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok solusyonlar, çalışma başlangıcında taze olarak hazırlanmış olup gruplara belirtilen dozlarda saf suda seyreltilerek uygulanmıştır. Çalışma süresince; günlük periyotlarda ölen

larvalar ve dışkıları ortamdaki uzaklaştırılmış, 5 günlük periyotlarda ise akvaryumlar temizlenerek, solusyonlar tazelenmiştir. Larvalar, çalışma süresince mevsimsel fotoperiyoda maruz bırakılmışlardır.

Kronik toksisite denemelerinde, her grup için morfolojik anomalisi ve gelişim bozukluğu olmayan 60 adet sağlıklı larva kullanılmıştır. Larvalar içerisinde 5 litre uygulama solusyonunu bulunduran 350×350×250 mm ebatlarındaki cam akvaryumlarda pestisitlere maruz bırakılmıştır (Şekil 3.2.2.1).



Şekil 3.2.2.1. Kronik toksisite denemesine ait uygulama akvaryumları.

Çalışma süresince larvalar, haşlanmış marul ve ıspanakla beslenmişlerdir. Üç günlük periyotlarda akvaryumlardaki suya ait çözülmüş oksijen, sıcaklık, pH ve elektriksel iletkenlik değerleri ölçülmüştür. Ayrıca 7-11 günlük periyotlarda larvaların morfolojik ölçümleri yapılmış ve histolojik çalışma için örnek alınmıştır. *Bufo bufo* larvalarında maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik etkilerinin araştırıldığı denemede 5 örnekleme, *Bufo viridis* larvalarında maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik etkilerinin araştırıldığı denemede ise 10 örnekleme yapılmıştır. Örnekleme tarihleri Çizelge 3.2.2.1. ve Çizelge 3.2.2.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2.2.1. *Bufo bufo* larvalarına maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik uygulamasına ait örnekleme tarihleri

Örnekleme	1	2	3	4	5
Tarihi	18.03.2010	25.03.2010	01.04.2010	08.04.2010	15.04.2010

Çizelge 3.2.2.2. *Bufo viridis* larvalarına maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik uygulamasına ait örnekleme tarihleri

Örnekleme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tarihi	04.03.2010	12.03.2010	18.03.2010	29.03.2010	05.04.2010	15.04.2010	21.04.2010	29.04.2010	05.05.2010	11.05.2010

*Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerinde, uygulama gruplarındaki larvaların en az %50'sinin metamorfozu tamamladığı güne kadar sürdürülen kronik toksisite denemelerinde, larvaların pestisitlere toplam maruziyet süreleri Çizelge 3.2.2.3., Çizelge 3.2.2.4, Çizelge 3.2.2.5. ve Çizelge 3.2.2.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.2.2.3. *Bufo bufo* larvalarında maneb pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri

Uygulanan Pestisit	Maneb					
Uygulama Dozları ( $\mu\text{g/l}$ )	0	0,1	0,5	1	5	10
Maruziyet Süresi (gün)	35	35	35	41	48	55

Çizelge 3.2.2.4. *Bufo bufo* larvalarında metoksiklor pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri

Uygulanan	Metoksiklor					
Pestisit						
Uygulama	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Dozları ( $\mu\text{g/l}$ )						
Maruziyet	35	35	35	48	54	57
Süresi (gün)						

Çizelge 3.2.2.5. *Bufo viridis* larvalarında maneb pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri

Uygulanan	Maneb					
Pestisit						
Uygulama	0	0,1	0,5	1	5	10
Dozları ( $\mu\text{g/l}$ )						
Maruziyet	74	74	74	76	78	80
Süresi (gün)						

Çizelge 3.2.2.6. *Bufo viridis* larvalarında metoksiklor pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri

Uygulanan	Metoksiklor					
Pestisit						
Uygulama	0	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Dozları ( $\mu\text{g/l}$ )						
Maruziyet	74	74	74	74	81	88
Süresi (gün)						

### 3.3. Morfolojik İncelemeler

Akut toksisite denemeleri sonunda ve kronik toksisite denemeleri süresince yapılan örneklemelemlerde, larvalara ait ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), kuyruk uzunluğu (mm) ve en (mm) değerleri ölçülmüştür. Bunlardan ıslak ağırlık ölçümleri, 0,0001 g hassasiyetteki terazide yapılmıştır. Bu amaçla, larvalar darası alınmış lam üzerine yerleştirilmiş, ardından fazla su kurutma kağıdı kullanılarak çekilmiştir. Total vücut uzunluğu, kuyruk uzunluğu ve en ölçümleri için 0,01 mm hassasiyetli dijital kumpas kullanılmıştır. Larvalara ait söz konusu morfolojik ölçümlerde kullanılan referans noktaları Şekil 3.3.1.'de sunulmuştur.

Total Vücut Uzunluğu (TVU): Burun ucundan kuyruk ucuna olan mesafe,

Kuyruk Uzunluğu (KU): Kloak açıklığından kuyruk ucuna olan mesafe,

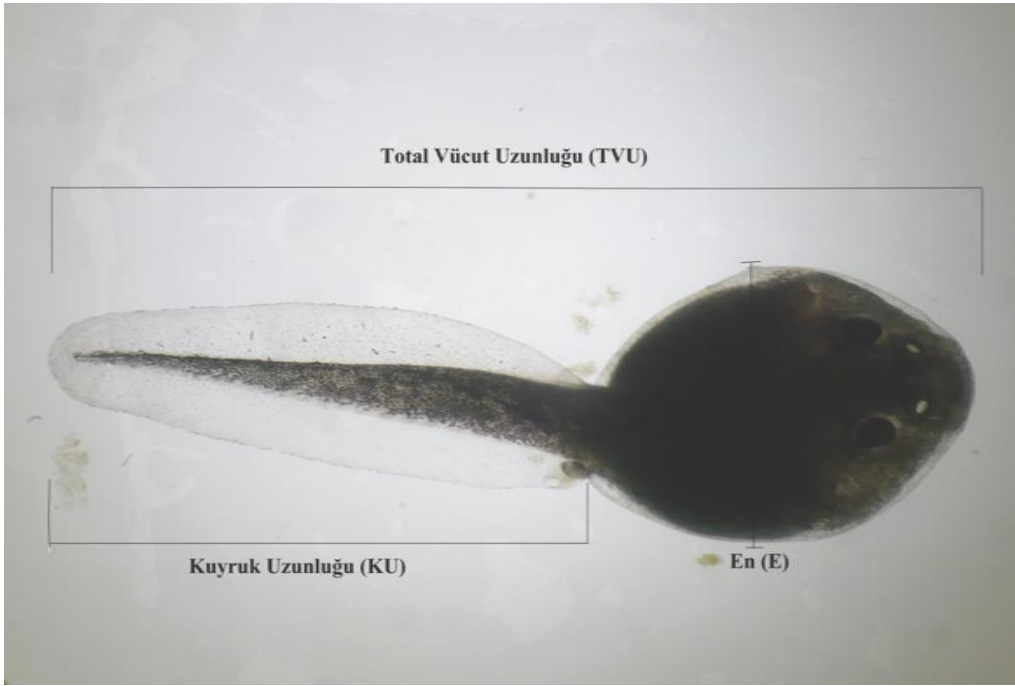
En (E): Gövdenin en geniş yerinden alınan ölçüm.

Akut toksisite denemeleri için tüm uygulama gruplarından deney sonunda hayatta kalan 10'ar adet larva, kronik toksisite denemelerinde ise yine tüm uygulama gruplarından 10'ar adet larva incelenmiştir.

Ayrıca larvalar, Olympus SZ model alttan aydınlatmalı binokülerde morfolojik açıdan detaylı olarak incelenmiştir. İncelemeler neticesinde, larvalarda görülen visseral ödem, kuyruk deformasyonları ve omurga eğriliği gibi morfolojik anomaliler kaydedilerek, gerekli makroskobik fotoğraflar çekilmiştir.

Akut toksisite denemeleri sonunda hayatta kalan tüm larvaların gelişim evreleri (Gosner, 1960) belirlenerek, pestisit maruziyetinin larval gelişime etkileri ortaya koyulmuştur.

Kronik toksisite denemelerinde ise her örnekleme gününe ait kontrol ve uygulama gruplarına dahil 10'ar adet larvanın gelişim evreleri belirlenmiştir. Bu sayede *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneği kontrol grubu larvaların metamorfoz süreleri ortaya koyularak türe özgü larval dönem süreleri belirlenmiştir. Pestisit uygulamasının yapıldığı gruplarda ise maneb ve metoksiklorun larval gelişim sürecine etkileri belirlenmiştir.



Şekil 3.3.1. Morfolojik ölçümlere ait referans noktaları (TVU: Total vücut uzunluğu, KU: Kuyruk uzunluğu, En: E).

### 3.4. Histopatolojik İncelemeler

Akut toksisite denemeleri sonunda (120. saat), kontrol ve uygulama gruplarına dahil hayatta kalan tüm larvalar histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Larvalar, bouin solusyonunda 8 saat süreyle tespit edildikten sonra, preparasyon gününe kadar %70'lik etil alkol içerisinde saklanmıştır. Preparasyon aşamasında larvalar sırasıyla %80, %90, %96 ve absöü etil alkol serilerinden geçirilmiştir. Ardından ksilen ve parafin serilerinden geçirilen larvalar, parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Elde edilen bloklardan, 8 µm

kalınlığında seri enine kesitler hazırlanmış ve bu kesitler histopatolojik incelemeler için Hematoksilen&Eosin (H&E) ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar, Olympus CX21 marka ışık mikroskobunda incelenmiş ve Olympus BX51 marka ışık mikroskobunda, Olympus Analysis LS programı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Histopatolojik incelemelerde visseral ödem, notokord lezyonları, solungaç defektleri, karaciğer ve pronefrik tübül deformasyonları gibi histopatolojik bulgular detaylı olarak incelenmiştir.

Kronik toksisite denemelerinde ise uygulama sonunda kontrol ve uygulama gruplarına dahil 10'ar adet larvanın seri enine kesitleri H&E ile boyanarak histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Bu amaçla belirtilen protokol çerçevesinde hazırlanan histolojik preparatlar, ışık mikroskobunda incelenmiş ve gerekli görülenlerin fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca kontrol ve uygulama gruplarına dahil 10'ar adet metamorfozunu tamamlamış *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarının seri enine kesitleri, Periyodik Asit Schiff (PAS) yöntemiyle boyanmıştır. Yöntemin detayları aşağıda belirtilmiştir;

1. % 0,5'lik periyodik asit solusyonu: Preparatlar 7 dakika bekletildi,
2. Akar distile suyla yıkama,
3. Schiff solusyonu: Preparatlar 20 dakika bekletildi,
4. Akar distile suyla yıkama,
5. Mayer's Hematoksilen solusyonu: Preparatlar 1 dakika bekletildi,
6. Akar distile suyla yıkama,
7. Asit-alkol: Preparatlar 15 saniye bekletildi,
8. Scott's solusyonu: 15 saniye bekletildi,
9. Akar distile suyla yıkama,
10. Dehidratasyon,
11. Ksilenlerden geçirerek temizleme,
12. Entellan kullanarak kapama.



### **3.5. İstatistiksel Analizler**

Elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla SPSS 17.0 ve Minitab 15 istatistiksel paket programları kullanılmıştır. Pestisitlerin letal konsantrasyon değerleri (LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>), Finney'in probit analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Akut çalışmanın morfolojik ölçümlerine (ıslak ağırlık, total vücut uzunluğu, kuyruk uzunluğu ve en) ait değerler ve kronik çalışmanın larval gelişim evresi değişimleri, varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Ayrıca akut çalışmada, kontrol ve uygulama grupları arasındaki total uzunluk değişimlerinin karşılaştırılmasında diskriminant analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık 0,05 olarak alınmıştır.

## BÖLÜM 4

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Larvaların Elde Edilmesine Ait Bulgular

Çanakkale ve civarında Şubat ayında yapılan arazi çalışmalarında sığ su birikintileri içerisinde amplexus halindeki *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örnekleri toplanmıştır. Amplexus halindeki ilk *Bufo viridis* örneklerine 15.02.2010 tarihinde, 12°C hava sıcaklığında, *Bufo bufo* örneklerine ise 19.02.2010 tarihinde, 10°C hava sıcaklığında rastlanmıştır. Her iki türe ait örnekler su içerisindeyken yakalanmıştır. Örneklerin toplandıkları sulara ait sıcaklık (°C), çözünmüş oksijen (mg/l) ve pH değerleri Çizelge 4.1.1. ve Çizelge 4.1.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1.1. *Bufo bufo* örneklerinin toplandığı suya ait bazı ekolojik veriler

Sıcaklık (°C)	Çözünmüş oksijen(mg/l)	pH
9,53	5,85	5,25

Çizelge 4.1.2. *Bufo viridis* örneklerinin toplandığı suya ait bazı ekolojik veriler

Sıcaklık (°C)	Çözünmüş oksijen(mg/l)	pH
11,21	5,62	5,88

Amplexus halindeki kurbağa örnekleri, nemli bez torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. *Bufo viridis* örneklerine ait ilk döllenmiş yumurtalar 16.02.2010 tarihinde elde edilmiştir (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. Ampleksus halindeki *Bufo viridis* örnekleri ve yumurtalar.

*Bufo viridis* örneklerinin, laboratuvar koşulları altında gerçekleşen yumurtlama ve döllenme olaylarının ardından, ebeveynler akvaryumlardan alınarak tekrar doğaya salınmıştır. Yumurtlamanın gerçekleştiği suya ait sıcaklık ( $^{\circ}\text{C}$ ), çözülmüş oksijen (mg/l) ve pH parametreleri Çizelge 4.1.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1.3. *Bufo viridis* örneklerinin yumurtladığı suya ait bazı ekolojik veriler

Sıcaklık ( $^{\circ}\text{C}$ )	Çözülmüş oksijen(mg/l)	pH
19,25	8,25	6,7

Ampleksus halinde doğadan toplanan *Bufo bufo* örneklerinin, laboratuvar koşulları altında yumurtlaması sağlanamamıştır. Örneklerin ampleksus davranışı 6 gün sürmüş fakat yumurtlama gerçekleşmemiştir. Yumurtlamanın sağlanması amacıyla örnekler Terzioğlu Yerleşkesi içinde bulunan havuz içerisine salınmıştır. Havuzda yapılan düzenli kontroller neticesinde, 28.02.2010 tarihinde döllenmiş *Bufo bufo* yumurtaları havuzdan toplanarak laboratuvara getirilmiştir. (Şekil 4.1.2). Yumurtlamanın gerçekleştiği havuz suyuna ait sıcaklık ( $^{\circ}\text{C}$ ), çözülmüş oksijen (mg/l) ve pH parametreleri Çizelge 4.1.4.'de sunulmuştur.



Şekil 4.1.2. Döllenmiş *Bufo bufo* yumurtalarının havuzdan toplanması.

Çizelge 4.1.4. *Bufo bufo* örneklerinin yumurtladığı suya ait bazı ekolojik veriler

Sıcaklık ( $^{\circ}$ C)	Çözülmüş oksijen(mg/l)	pH
11,5	5,21	6,1

*Bufo bufo* örneklerine ait döllenmiş yumurtaların çapları 2,15-2,28 mm arasında, *Bufo viridis* örneklerinin ise 1,88-2,01 mm arasında ölçülmüştür.

#### 4.2. Akut Toksikite Denemelerine Ait Araştırma Bulguları

Maneb ve metoksiklor pestisitleri, 21. evre *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarına 5 gün süreyle belirtilen dozlarda uygulanmıştır. Uygulamanın ardından; morfolojik bulgular, histolojik bulgular, günlere bağlı mortalite grafikleri, larvaların pestisit konsantrasyonuna bağlı hayatta kalma eğrileri, pestisitlerin larvalara letal konsantrasyon değerleri ( $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$ ) ve morfolojik ölçümlere ait istatistiksel analizler sırasıyla sunulmuştur.

#### **4.2.1. *Bufo bufo* larvalarında akut toksisite denemelerine ait araştırma bulguları**

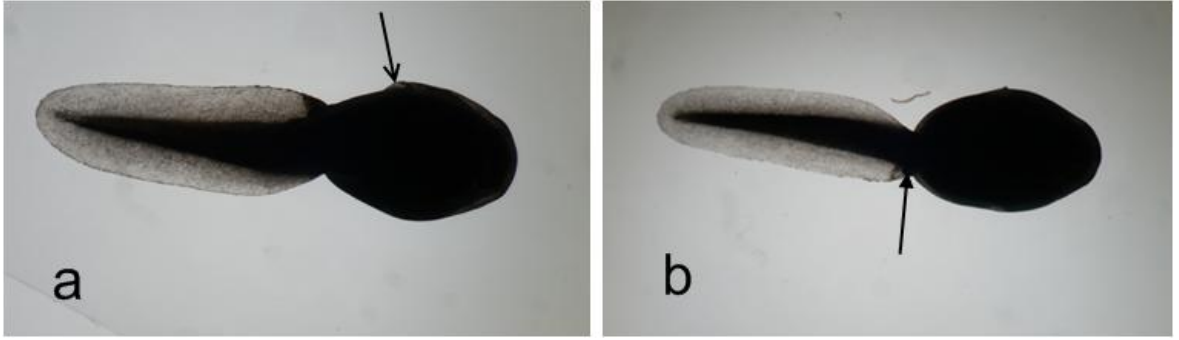
##### **4.2.1.1. Morfolojik bulgular**

Akut toksisite denemeleri sonunda, pestisit uygulamasının yapılmadığı kontrol grubu larvalarda herhangi bir morfolojik anomaliye rastlanmamıştır (Şekil 4.2.1.1.1). Çalışma sonunda, kontrol grubu larvaların operculum gelişimlerini tamamladıkları ve arka ekstremite taslaklarının gelişmeye başladığı 25.-27. evreler arasında oldukları belirlenmiştir.

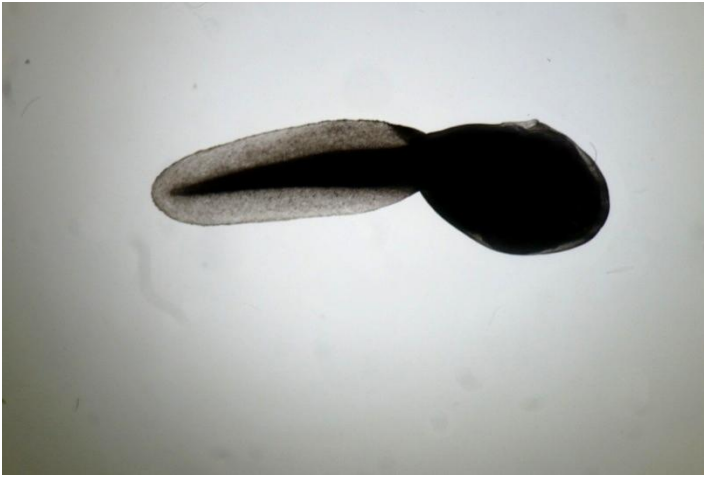
Maneb ve metoksiklor pestisitlerine maruz bırakılan uygulama grubu larvalarda ise doza bağlı artış gösteren; büyüme ve gelişmede gecikme, morfolojik anomaliler ve deformasyonlar tespit edilmiştir.

10 µg/l ve 50 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda, düşük miktarda gözlenen kuyruk deformasyonları dışında önemli bir morfolojik bulgu belirlenmemiştir (Şekil 4.2.1.1.2 ve Şekil 4.2.1.1.3). Her iki uygulama grubuna dahil larvaların gelişimlerinde gecikme tespit edilmemiştir. Bu gruplara dahil larvalar, kontrol grubu larvalarla aynı gelişim evreleri arasındadır.

100 µg/l ve 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda gözlenen en önemli morfolojik bulgu visseral ödemdir (Şekil 4.2.1.1.4). 100 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvaların, 23-26. gelişim evreleri arasında; 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvaların ise 22-24. gelişim evreleri arasında oldukları belirlenmiştir. 5000 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta, çalışma sonunda 2 adet larvanın hayatta kalması sebebiyle morfolojik değerlendirmeye alınmamıştır.



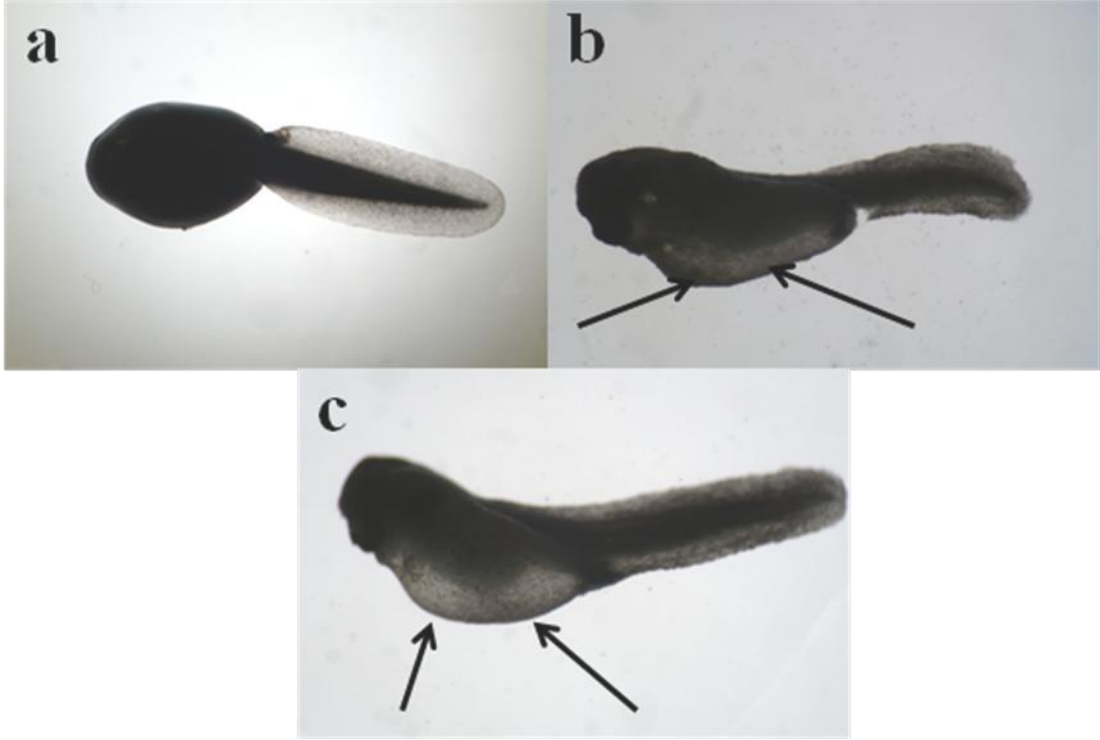
Şekil 4.2.1.1.1. Kontrol grubu *Bufo bufo* larvaları. a. 25. evre *Bufo bufo* larvasında operculum (↑), b. 27. evre *Bufo bufo* larvasında, arka ekstemite taslağı (↑).



Şekil 4.2.1.1.2. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan 25. evre *Bufo bufo* larvasında düşük miktarda kuyruk deformasyonu.

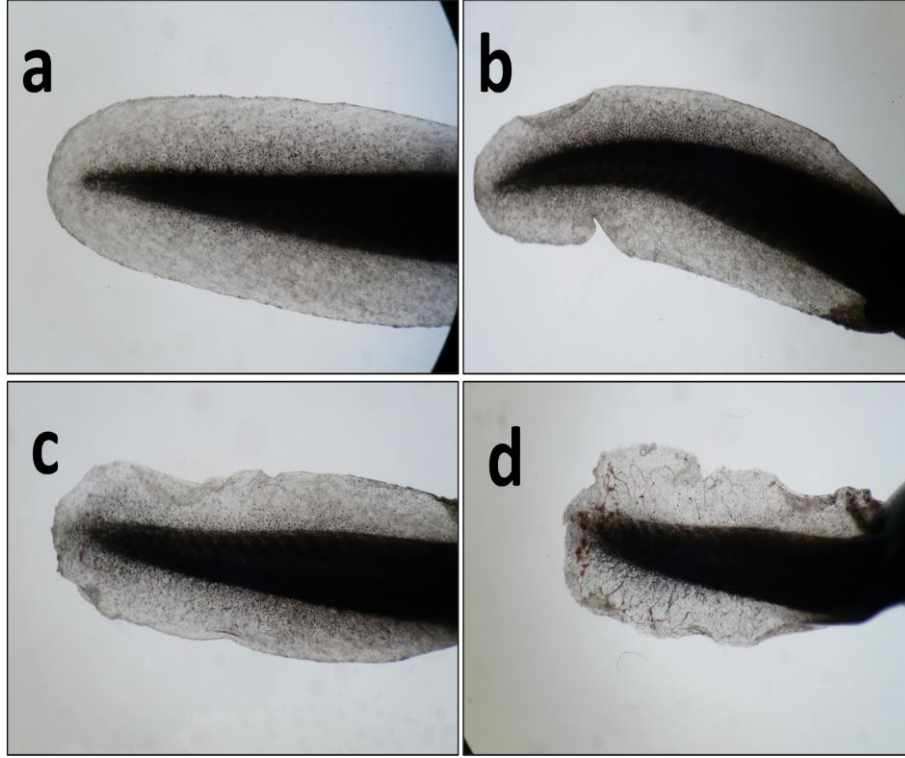


Şekil 4.2.1.1.3. 50 µg/l maneb uygulaması yapılan 27. evre *Bufo bufo* larvasında düşük miktarda kuyruk deformasyonu



Şekil 4.2.1.1.4. Kontrol ve manebe uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvaları. a. Kontrol grubu 27. evre *Bufo bufo* larvası, b. 100 µg/l manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo bufo* larvasında visseral ödem (↑), c. 1000 µg/l manebe maruz bırakılan 22. evre *Bufo bufo* larvasında visseral ödem (↑).

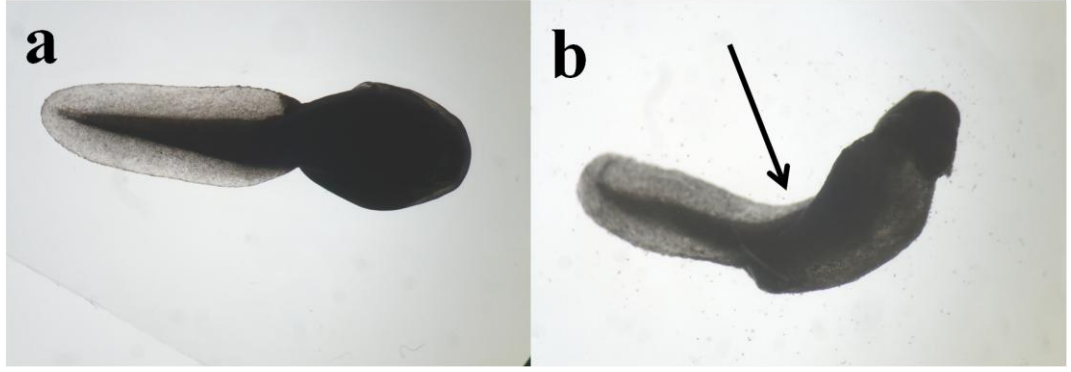
Manebe maruz bırakılan *Bufo bufo* larvalarında doza bağlı artış gösteren kuyruk deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.2.1.1.5). En bariz kuyruk deformasyonu, 1000 µg/l manebe uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvalarda tespit edilmiştir.



Şekil 4.2.1.1.5. Kontrol grubu ve manebe uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarında kuyruk deformasyonları. a. Kontrol grubu 27. evre *Bufo bufo* larvası, b. 50 µg/l manebe maruz bırakılan 27. evre *Bufo bufo* larvası, c. 100 µg/l manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo bufo* larvası, d. 1000 µg/l manebe maruz bırakılan 22. evre *Bufo bufo* larvası.

Metoksiklor uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarında gözlenen en önemli morfolojik bulgular; omurga eğriliği, visseral ödem ve kuyruk deformasyonlarıdır. 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvalarda ileri derecede omurga eğriliği tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.1.6). Bir, 5 ve 10 µg/l metoksiklora maruz bırakılan larvaların gelişiminde gecikme ve önemli bir morfolojik anomali tespit edilmemiştir. Bu gruplara dahil larvalarda, gelişim evresi aralığı, 25.-27. evreler olarak belirlenmiştir. Ancak 50 µg/l ve 100µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların gelişiminde gecikmeler gözlenmiştir. Larvaların, 50 µg/l metoksiklor uygulama grubunda 23.-26., 100 µg/l metoksiklor uygulama grubunda ise 22-26. gelişim evresi aralığında oldukları tespit edilmiştir.





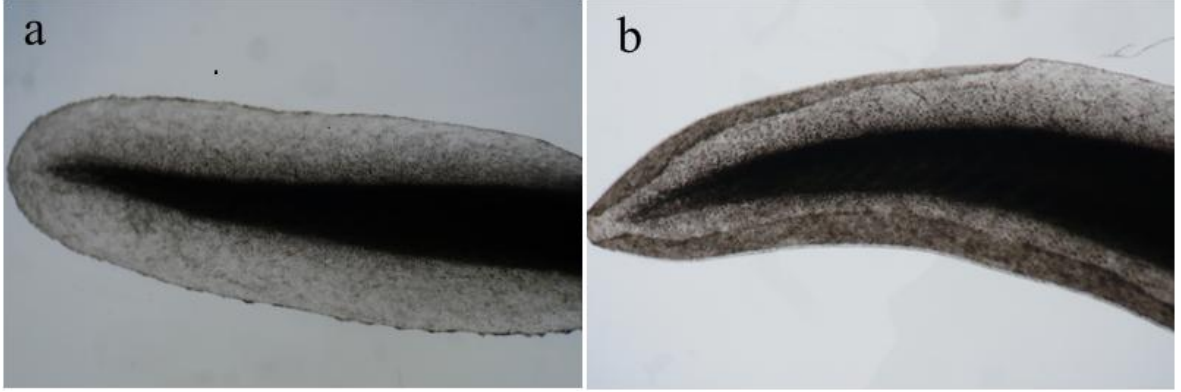
Şekil 4.2.1.1.6. Kontrol ve 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvaları. a. Kontrol grubu 26. evre *Bufo bufo* larvası, b. 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı 23. evre *Bufo bufo* larvasında omurga eğriliği (↑).

Elli µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruptaki larvalarda düşük seviyede omurga eğriliği ve visseral ödeme rastlanmıştır (Şekil 4.2.1.1.7).



Şekil 4.2.1.1.7. 50 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı 25. evre *Bufo bufo* larvası.

Yüz  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamasının yapıldığı larvalarda kuyruk deformasyonları tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.1.8).

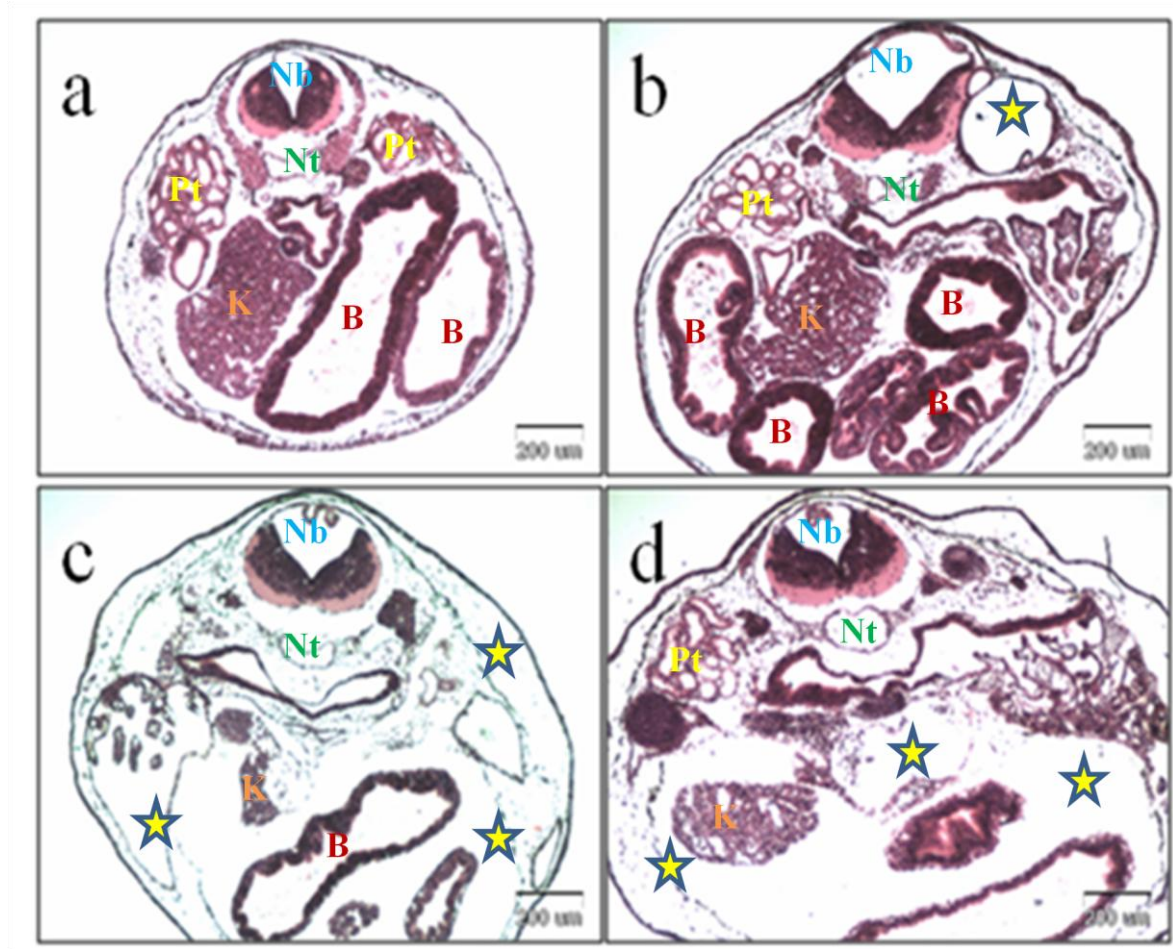


Şekil 4.2.1.1.8. Kontrol ve metoksiklor uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarında kuyruk. a. Kontrol grubu 26. evre *Bufo bufo* larvasında kuyruk, b. 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil 23. evre *Bufo bufo* larvasında kuyruk deformasyonu.

#### 4.2.1.2. Histopatolojik bulgular

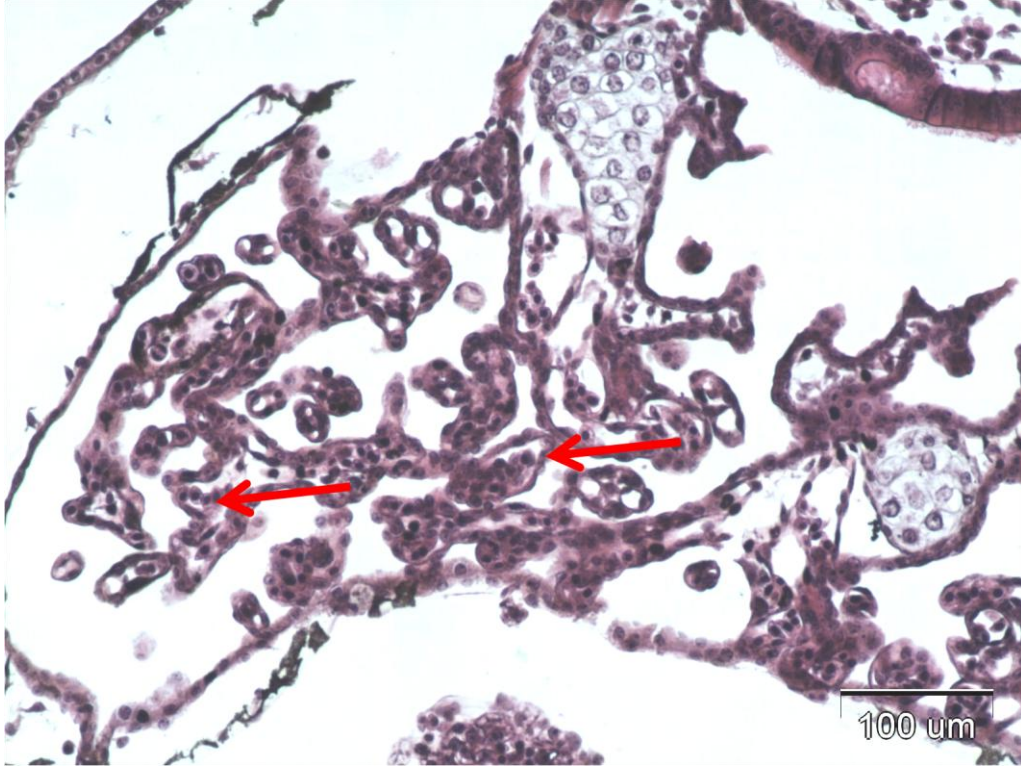
Akut toksisite denemeleri sonunda, pestisit uygulamasının yapılmadığı kontrol grubu larvalarda herhangi bir histolojik anomaliye rastlanmamıştır. Maneb ve metoksiklora maruz bırakılan *Bufo bufo* larvalarından hazırlanan histolojik kesitlerde, doza bağlı olarak artış gösteren visseral ödem oluşumu, solungaçlarda lamellar birleşme, pronefrik tübül ve karaciğerde nekroz ve notokord defektleri gözlenmiştir.

On  $\mu\text{g/l}$  ve 50  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda önemli bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. Ancak, 100; 1000 ve 5000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda ileri derecede visseral ödem oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.1).



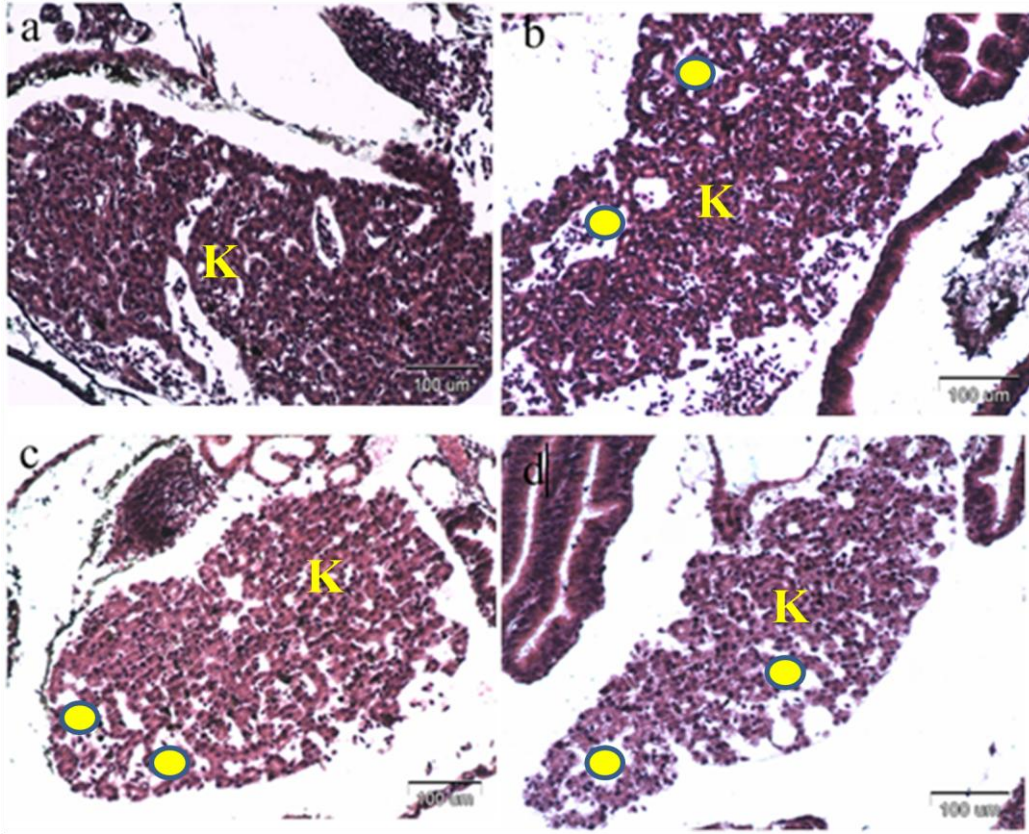
Şekil 4.2.1.2.1. Kontrol grubu ve maneb uygulamalarının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler. a. Kontrol grubu, b. 100 µg/l maneb uygulama grubu larvada visseral ödem (★), c. 1000 µg/l maneb grubu larvada visseral ödem (★), d. 5000 µg/l maneb grubu larvada visseral ödem (★), (H&E).

Bin µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvaların solungaçlarında lamellar birleşmeler tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.2).



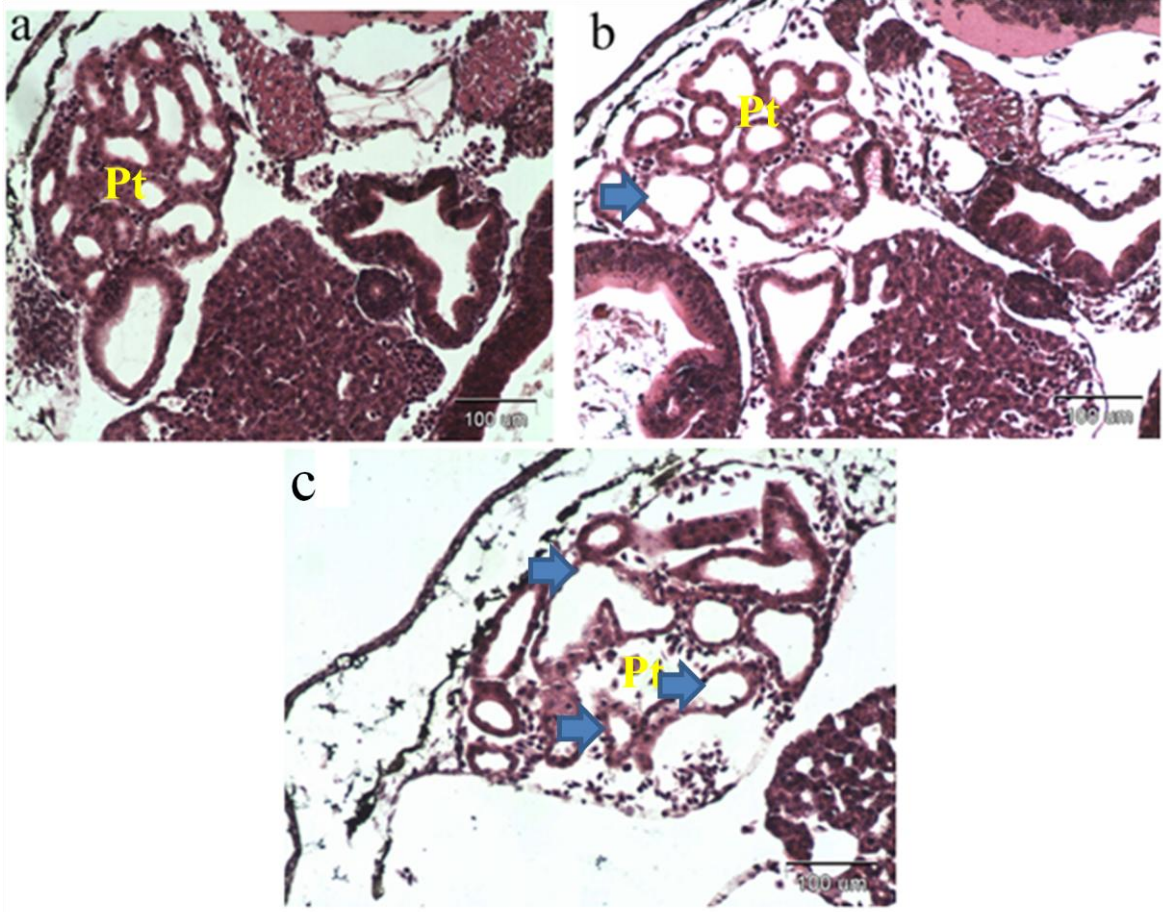
Şekil 4.2.1.2.2. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvasında solungaçlardan geçen enine kesitte lamellar birleşmeler (↑), (H&E).

Yüz, 1000 ve 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda doza bağlı artış gösteren karaciğer nekrozu gözlenmiştir (Şekil 4.2.1.2.3).



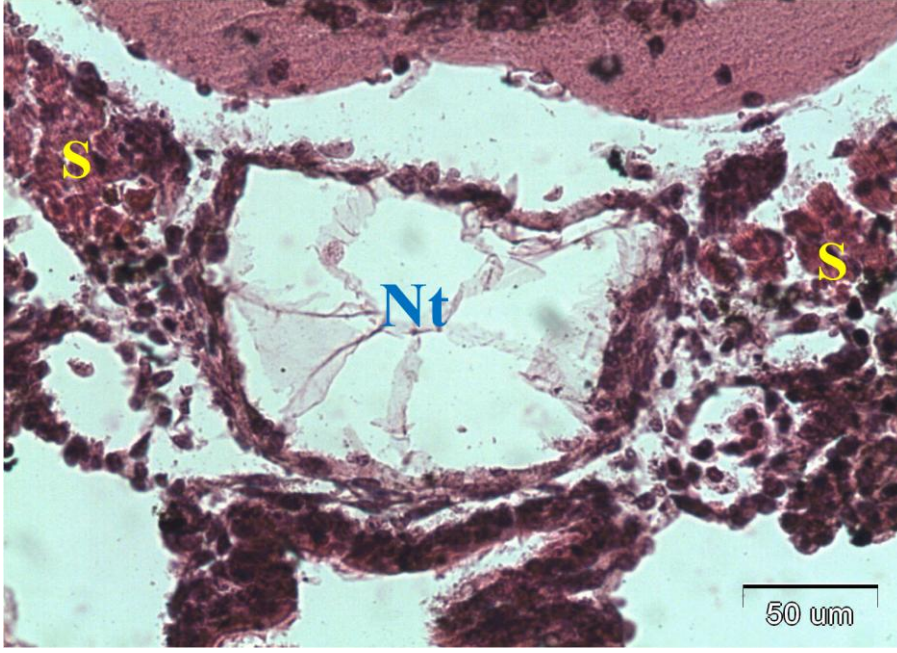
Şekil 4.2.1.2.3. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarına ait karaciğerden geçen enine kesitlerdeki karaciğer nekrozları. a. Kontrol grubu, b. 100 µg/l maneb uygulama grubu larvada karaciğer nekrozu (●), c. 1000 µg/l maneb uygulama grubu larvada karaciğer nekrozu (●), d. 5000 µg/l maneb uygulama grubu larvada karaciğer nekrozu (●), (H&E).

Bin ve 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda pronefrik tübül epitel hücrelerinde deformasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.4).

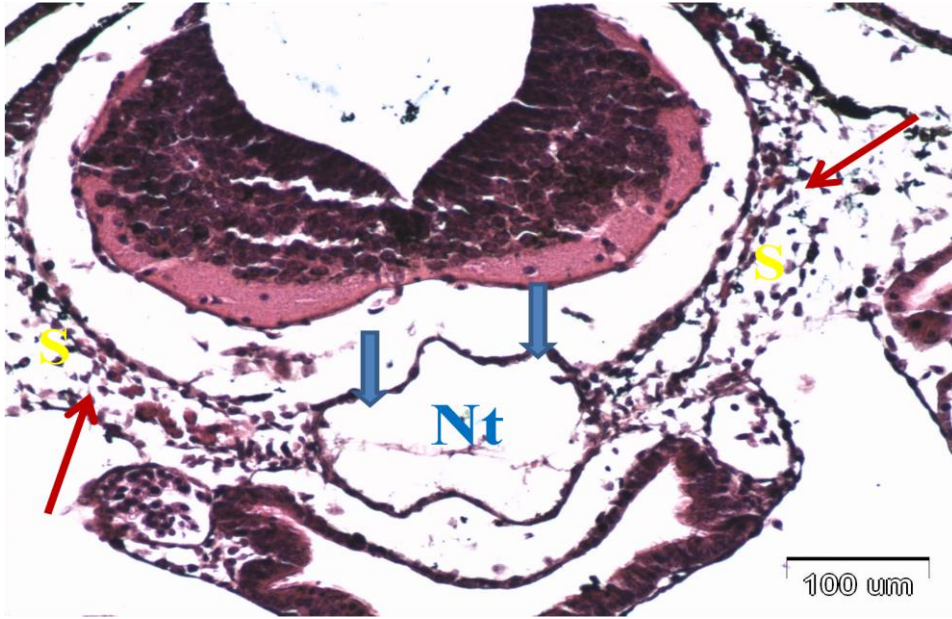


Şekil 4.2.1.2.4. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarına ait pronefrik tübüllerden geçen enine kesitler. a. Kontrol grubu, b. 1000 µg/l maneb uygulama grubu larvada pronefrik tübüllerde epitel hücre deformasyonu (➡), c. 5000 µg/l maneb uygulama grubu larvada pronefrik tübüllerde epitel hücre deformasyonu (➡), (H&E).

Bin ve 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda notokord defektleri gözlenmiştir. Ayrıca 5000 µg/l maneb grubuna dahil larvalarda somit formasyonunda bozulmaların da olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.5 ve Şekil 4.2.1.2.6).

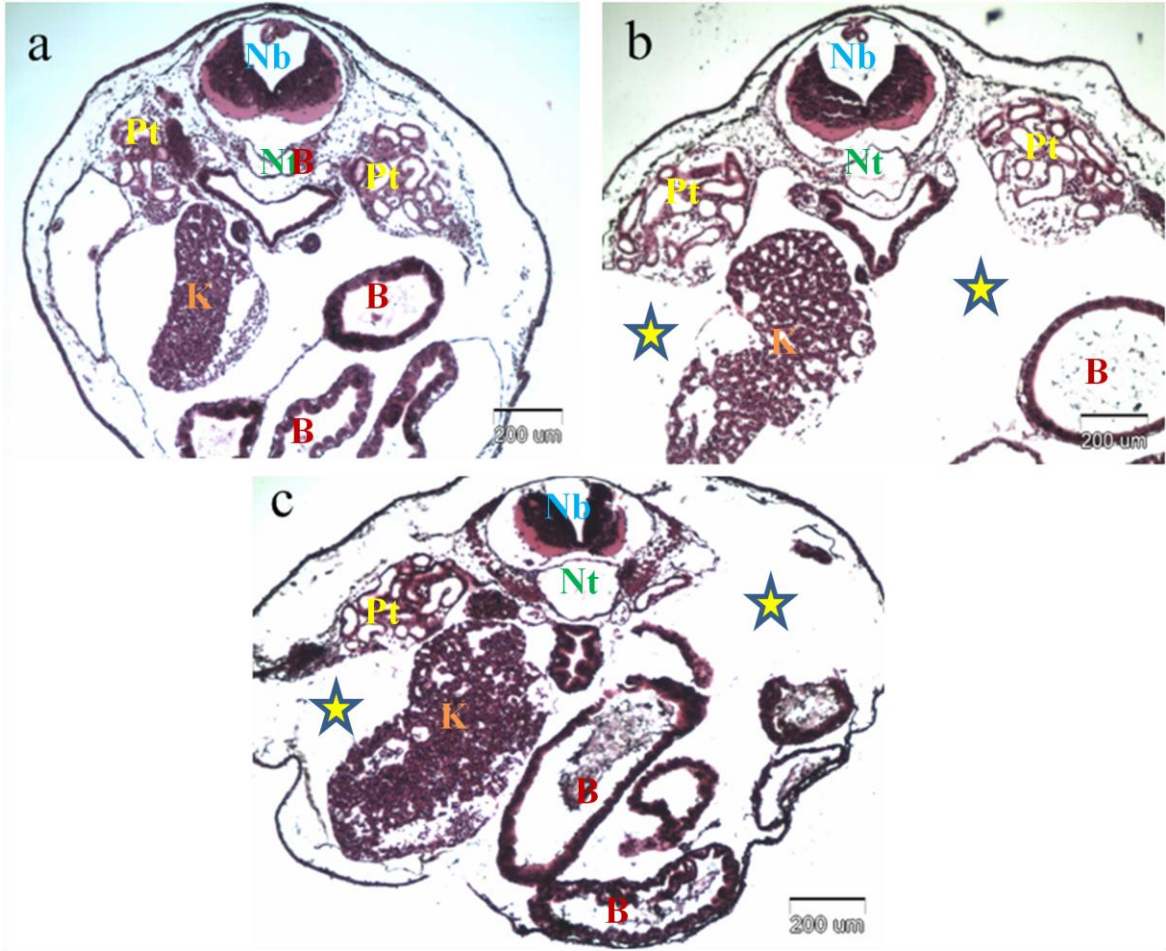


Şekil 4.2.1.2.5. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvasında notokorda defekti, (H&E).



Şekil 4.2.1.2.6. 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo bufo* larvasında notokorda defekti (↓) ve somit formasyonundaki bozulmalar (↖), (H&E).

Metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvalarında, maneb uygulamasına benzer histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Kontrol grubu ile 1; 5 ve 10 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı larvalarda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. 50 µg/l ve 100 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı larvaların iç organlarından geçen enine kesitlerde visseral ödem ve karaciğer nekrozu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.7).



Şekil 4.2.1.2.7. Kontrol grubu ve metoksiklor uygulamalarının yapıldığı *Bufo bufo* larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler. a. Kontrol grubu, b. 50 µg/l metoksiklor uygulama grubu larvada visseral ödem (★), c. 100 µg/l metoksiklor uygulama grubu larvada visseral ödem (★), (H&E).

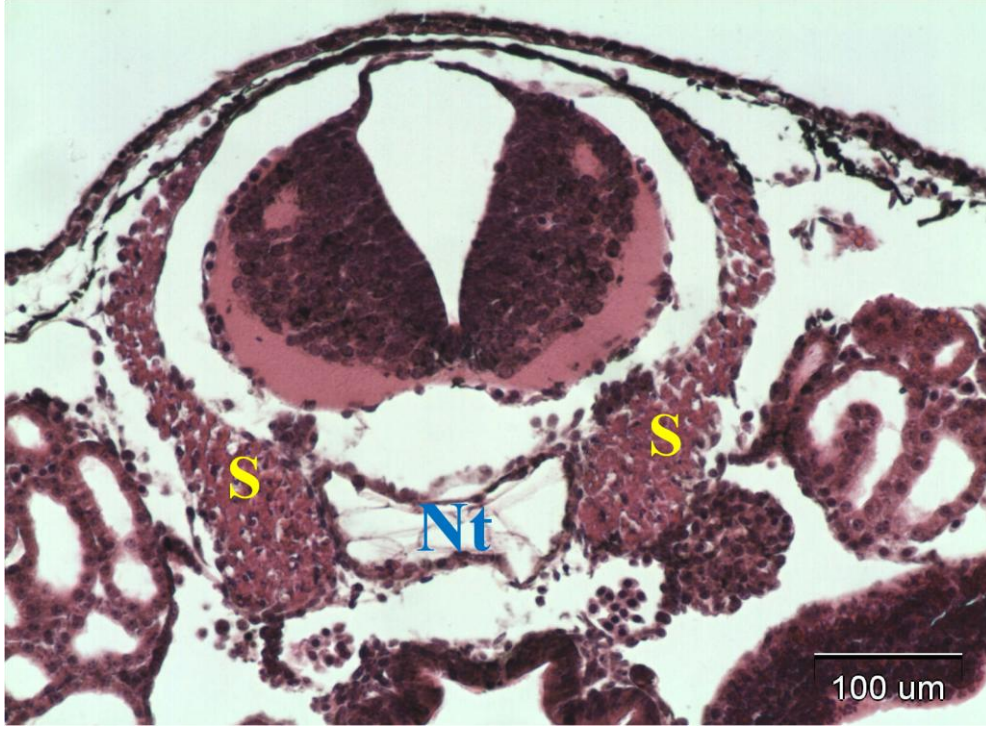


Yüz  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamalarının yapıldığı larvaların, pronefrik tübüllerinden geçen enine kesitlerde deformasyonlara rastlanmıştır (Şekil 4.2.1.2.8).

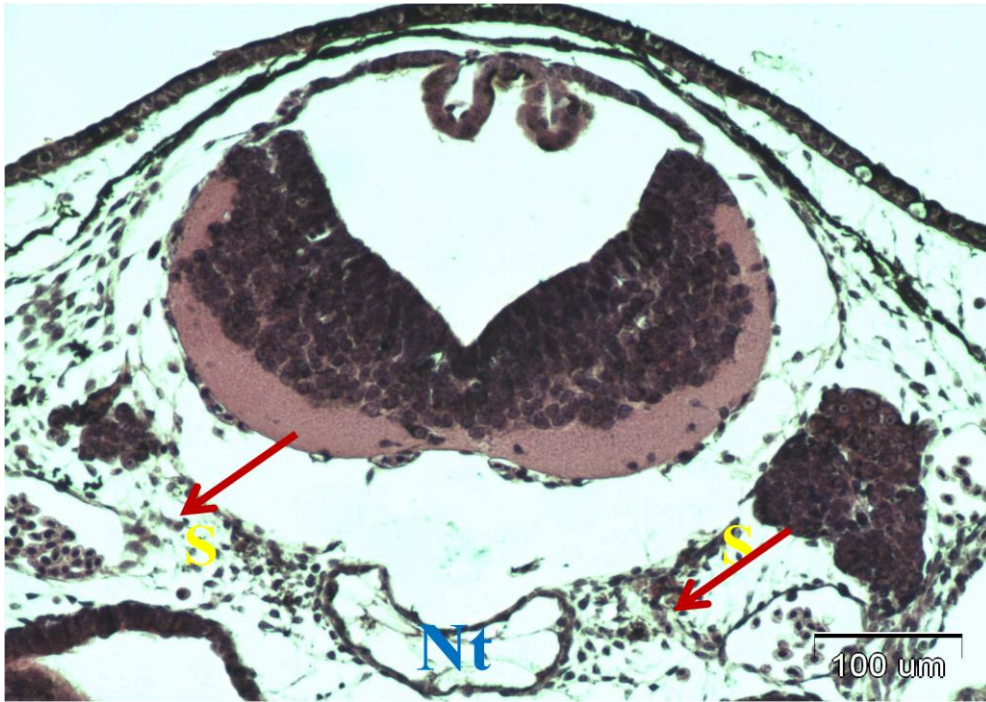



Şekil 4.2.1.2.8. 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvasında, pronefrik tübüllerde, epitel hücre deformasyonu (→), (H&E).

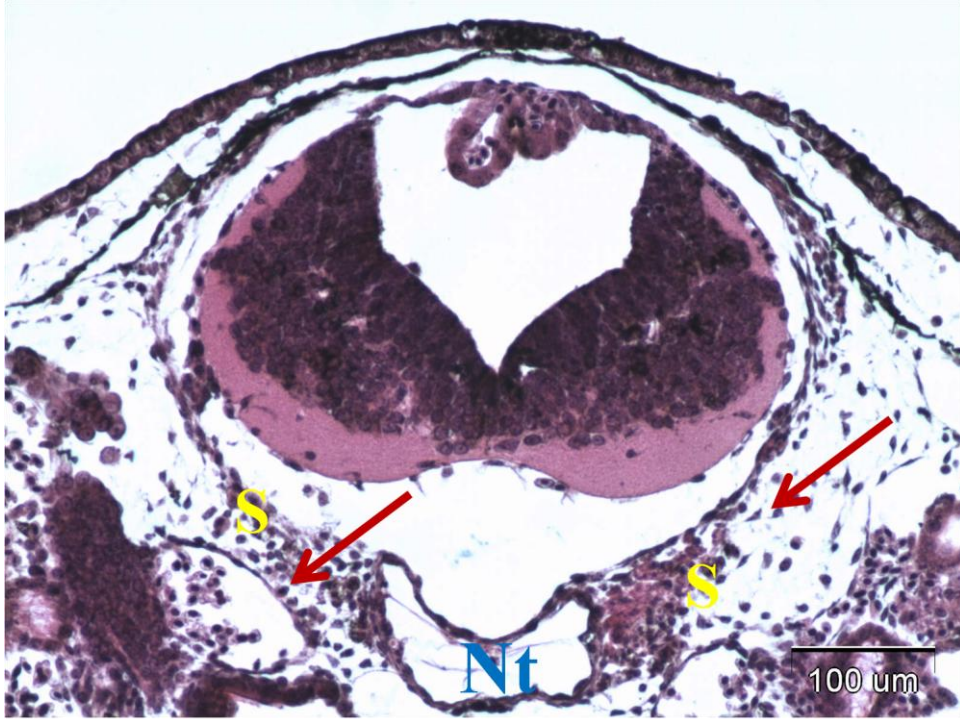
Kontrol grubu larvaların somit formasyonunda herhangi bir histolojik anomali tespit edilmemiştir (Şekil 4.2.1.2.9). 50  $\mu\text{g/l}$  ve 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamalarının yapıldığı larvaların somit formasyonunda ileri derecede bozulmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.2.10 ve Şekil 4.2.1.2.11).




Şekil 4.2.1.2.9. Kontrol grubu *Bufo bufo* larvası, somitlerden geçen enine kesit, (H&E).



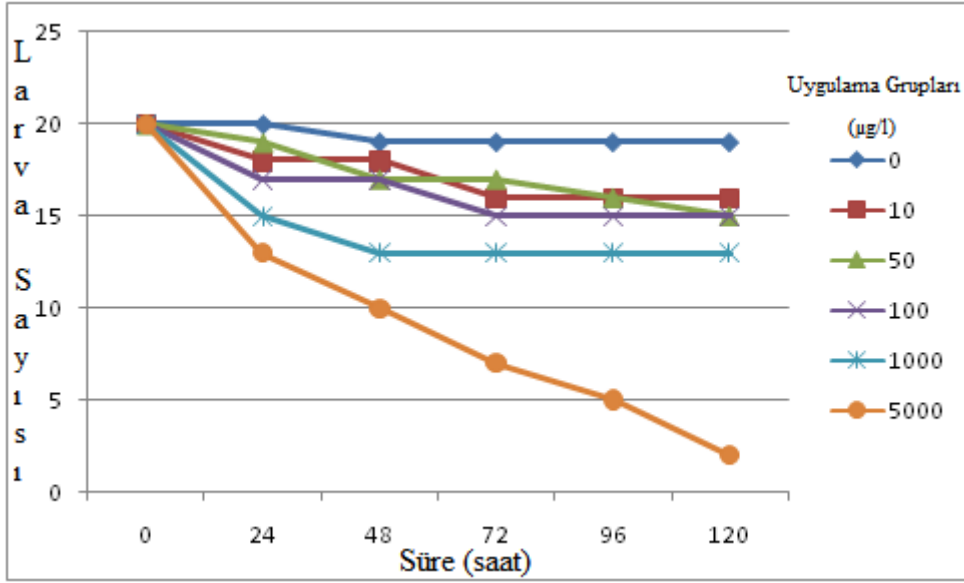
Şekil 4.2.1.2.10. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvası, somit formasyonunda bozulmalar (  ), (H&E).



Şekil 4.2.1.2.11. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvası, somit formasyonunda bozulmalar (  ), (H&E).

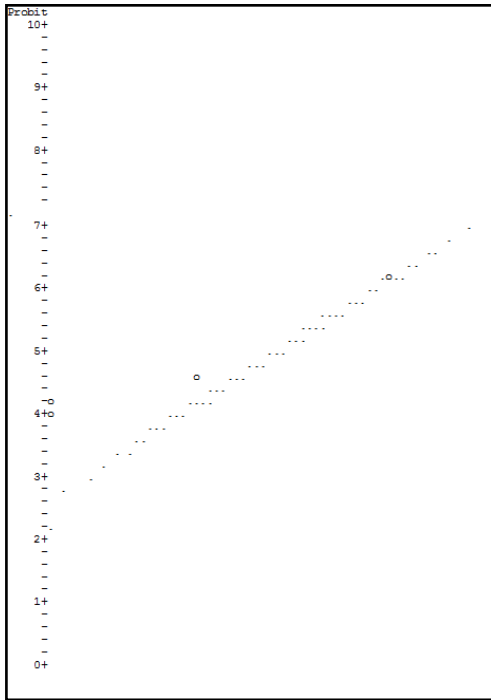
#### 4.2.1.3. İstatistiksel bulgular

*Bufo bufo* larvalarına 120 saat süreyle maneb uygulamasının yapıldığı akut toksisite denemelerinde; deney sonunda kontrol grubu larvalarda 1 adet doğal ölüm gözlenmiştir. En fazla sayıda ölüm; çalışma en yüksek doz olan 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı grupta tespit edilmiştir. Bu grupta ölen larva sayısı 18'dir. Akut toksisite denemeleri süresince, 24 saatlik periyotlarda uygulama dozlarına bağlı olarak hayatta kalan larvaların sayılarını gösteren grafik diğer sayfada sunulmuştur (Şekil 4.2.1.3.1).



Şekil 4.2.1.3.1. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı (n: 20 larva).

Çalışma sonundaki mortalite değerlerine göre, lineer transformasyonla verilen probit grafiği Şekil 4.2.1.3.2’de sunulmuştur.



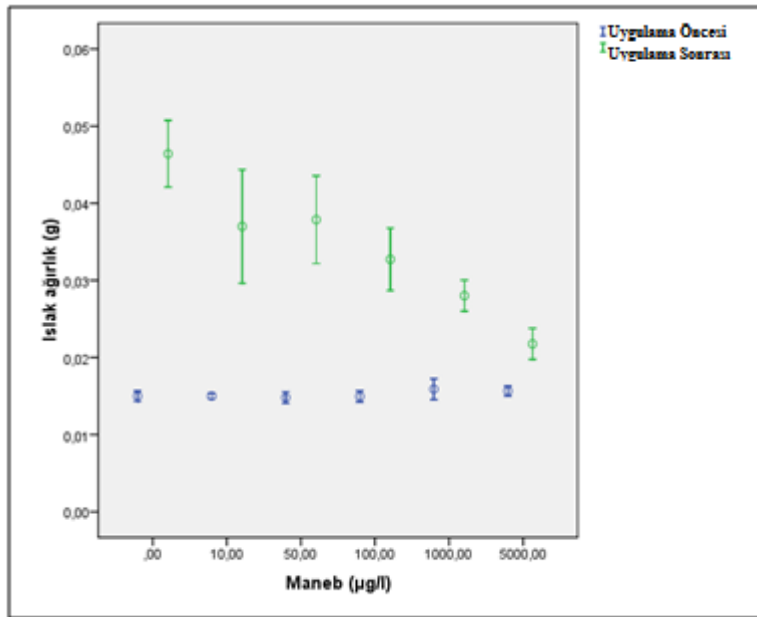
Şekil 4.2.1.3.2. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından probit grafiği.

21. evre *Bufo bufo* larvalarına maneb pestisitinin 120 saat süreyle uygulanmasının ardından hesaplanan LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub> değerleri, Çizelge 4.2.1.3.1’de sunulmuştur.

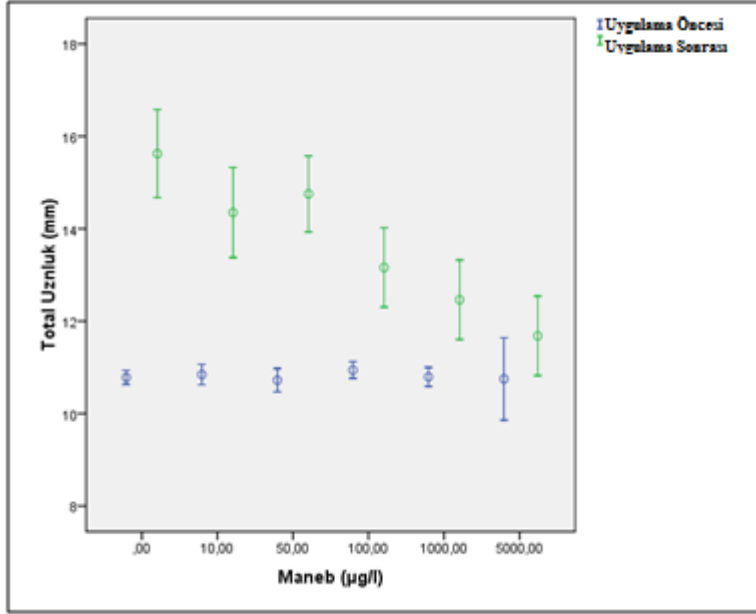
Çizelge 4.2.1.3.1. *Bufo bufo* larvalarında, maneb pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri (µg/l)

LC değerleri	Konsantrasyon (µg/l)	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
LC <sub>10</sub>	700,674	71,257	1341,501
LC <sub>50</sub>	1966,345	818,468	3313,641
LC <sub>90</sub>	5518,282	3280,245	23457,988

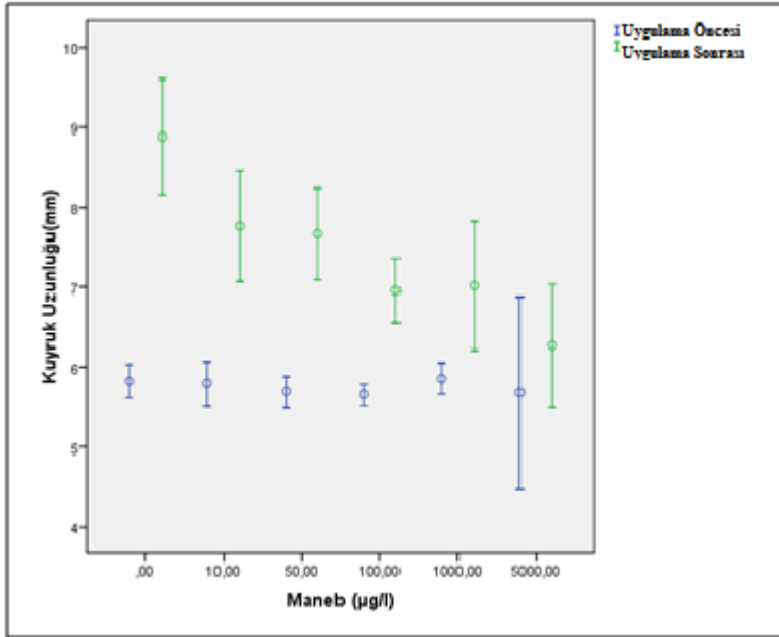
Toksisite denemeleri başında ve sonunda larvaların, ıslak ağırlık (Şekil 4.2.1.3.3), total vücut uzunluğu (Şekil 4.2.1.3.4), kuyruk uzunluğu (Şekil 4.2.1.3.5) ve en (Şekil 4.2.1.3.6) gibi morfolojik karakterler için yapılan ölçümlere ait değişim grafikleri sırasıyla sunulmuştur.



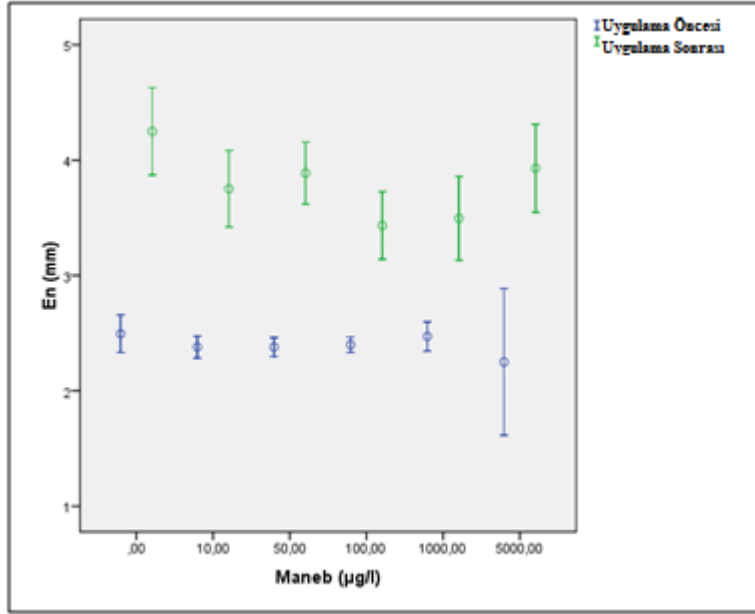
Şekil 4.2.1.3.3. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.1.3.4. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.1.3.5. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



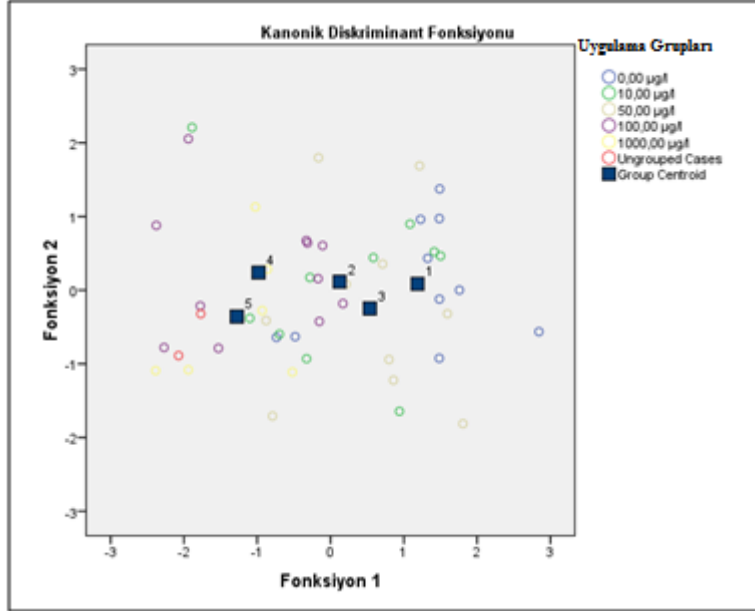
Şekil 4.2.1.3.6. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri.

*Bufo bufo* larvalarına maneb uygulamasının yapıldığı akut çalışma sonunda, uygulama gruplarındaki ölçümü yapılan söz konusu morfolojik karakterlerin, ortalama değerleri ve standart hatalar, Çizelge 4.2.1.3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.1.3.2. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar

Uygulama Grupları (µg/l)	Özellik							
	Islak Ağırlık (g)		Tot. Uzunluk (mm)		En (mm)		Kuyruk Uz. (mm)	
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM
0	0,04641	0,00605	15,625	1,331	4,250	0,529	8,885	1,011
10	0,03700	0,01030	14,351	1,362	3,752	0,465	7,760	0,969
50	0,03787	0,00796	14,754	1,149	3,888	0,377	7,665	0,802
100	0,03273	0,00563	13,161	1,200	3,434	0,411	6,957	0,566
1000	0,02801	0,00217	12,463	0,929	3,496	0,392	7,016	0,870
5000	0,02720	0,00226	11,705	0,361	3,930	0,424	6,270	0,849

Uygulama sonunda pestisit maruziyetine bağlı olarak total vücut uzunluğu değişimlerinin, gruplar arasındaki farklılıklarının ortaya koyulması amacıyla kanonik diskriminant analizi yapılmıştır. Analize ait grafik aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2.1.3.7).



Şekil 4.2.1.3.7. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar (■1: Kontrol Grubu: 0,00 µg/l; ■2: 10 µg/l; ■3: 50 µg/l; ■4: 100 µg/l; ■5: 1000 µg/l maneb).

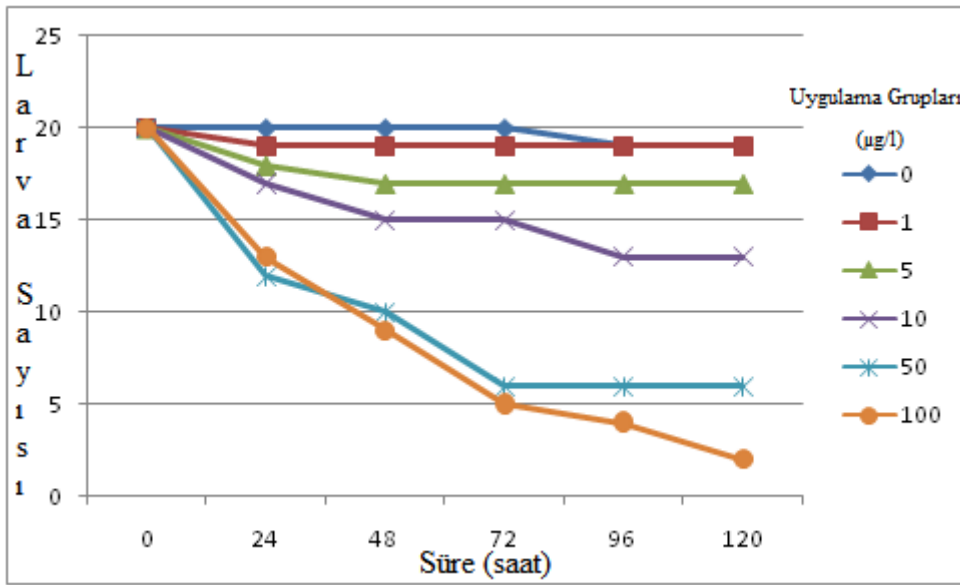
Ayırma analizinde oluşan iki fonksiyon, toplam varyansın %100'ünü açıklamış ve 1. fonksiyonun p değeri önemli çıkmıştır (Çizelge 4.2.1.3.3).

Çizelge 4.2.1.3.3. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler

Fonksiyon	Özdeğer	Varyans (%)	Total (%)	Kanonikal Korelasyon	Wilks Lambda	Chi-kare	df	p
1	1,113	98,8	98,8	0,726	0,467	33,106	8	0,000
2	0,013	1,2	100,0	0,114	0,987	0,572	3	0,903

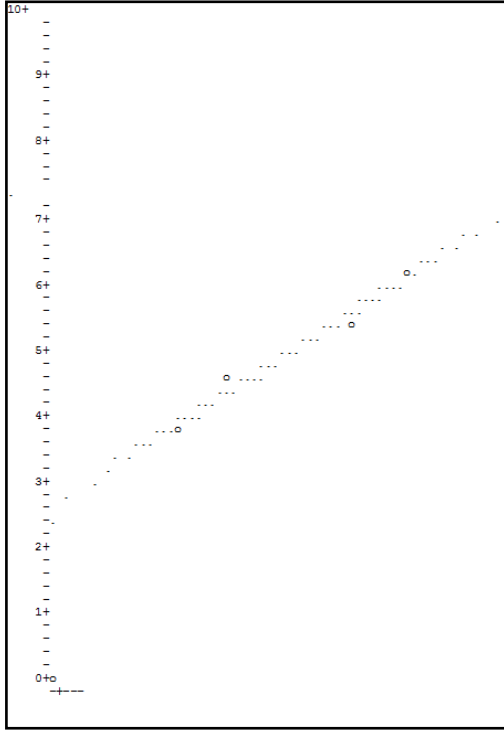


*Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulamasının yapıldığı akut toksisite denemelerinde ise deney sonunda kontrol grubu larvalarda 1 adet doğal ölüm gözlenmiştir. En fazla sayıda ölüm, çalışmada en yüksek doz olarak uygulanan 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı grupta tespit edilmiştir. Bu grupta, deneme sonunda 18 larvanın öldüğü tespit edilmiştir. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruba dahil larvaların morfolojik ölçümleri, ileri derecedeki anomalilerden dolayı istatistiksel bulgulara dahil edilmemiştir. Toksikite denemeleri süresince, uygulama dozlarına bağlı olarak hayatta kalan larvaların sayılarını gösteren grafik aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2.1.3.8).



Şekil 4.2.1.3.8. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı (n: 20 larva).

Çalışma sonundaki mortalite değerlerine göre, lineer transformasyonla verilen probit grafiği Şekil 4.2.1.3.9'da sunulmuştur.



Şekil 4.2.1.3.9. *Bufo bufo* larvalarına 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından probit grafiği.

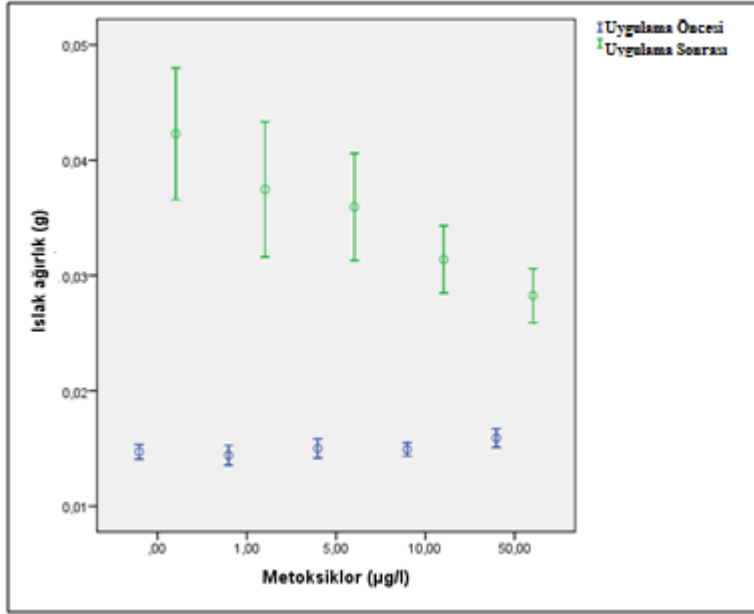
21. evre *Bufo bufo* larvalarına metoksiklor pestisitinin 120 saat süreyle uygulanmasının ardından hesaplanan  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  ve  $LC_{90}$  değerleri, Çizelge 4.2.1.3.4’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.1.3.4. *Bufo bufo* larvalarında, metoksiklor pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g/l}$ )

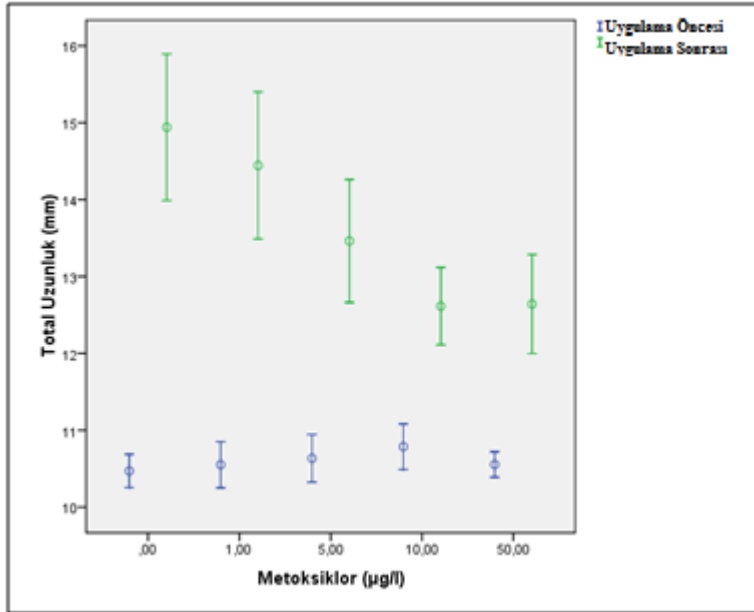
LC değerleri	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/l}$ )	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
$LC_{10}$	4,057	0,860	8,281
$LC_{50}$	22,104	12,035	36,256
$LC_{90}$	120,424	66,212	404,015

Toksisite denemeleri başında ve sonunda larvaların ıslak ağırlık (Şekil 4.2.1.3.10), total vücut uzunluğu (Şekil 4.2.1.3.11), kuyruk uzunluğu (Şekil 4.2.1.3.12) ve en (Şekil

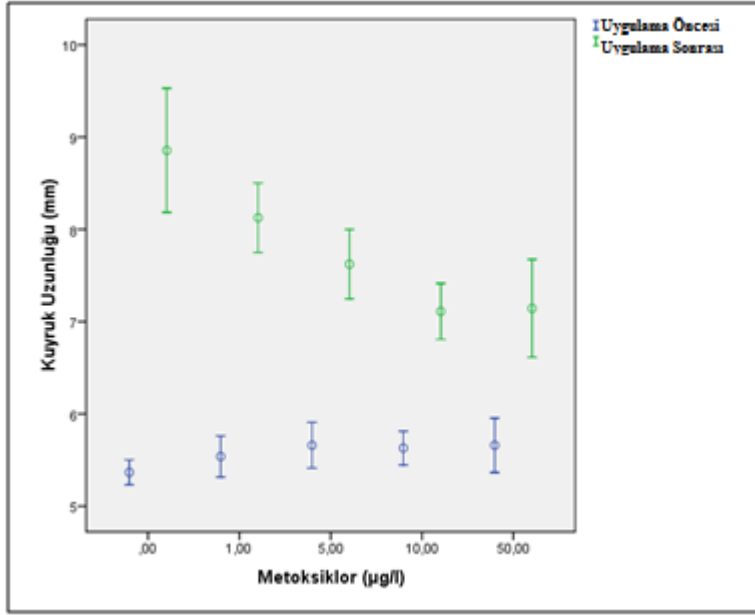
4.2.1.3.13) gibi morfolojik karakterler için yapılan ölçümlere ait değişim grafikleri sırasıyla sunulmuştur.



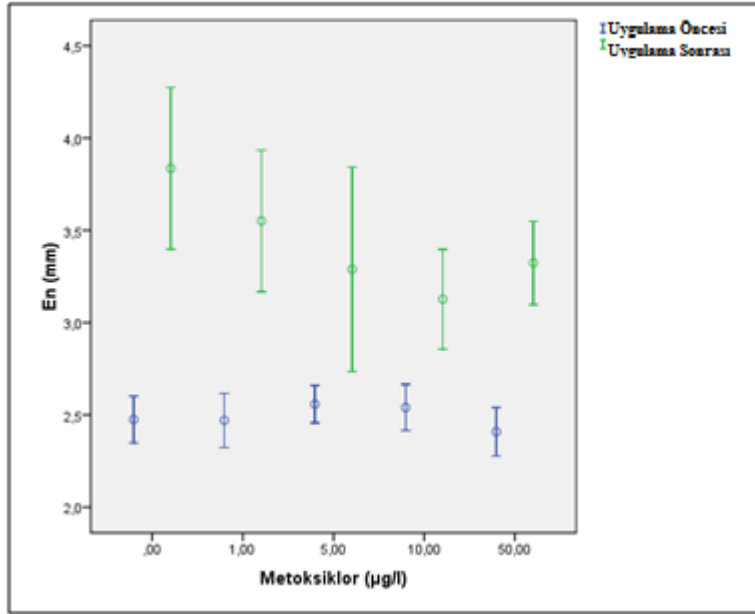
Şekil 4.2.1.3.10. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.1.3.11. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.1.3.12. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.1.3.13. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri.

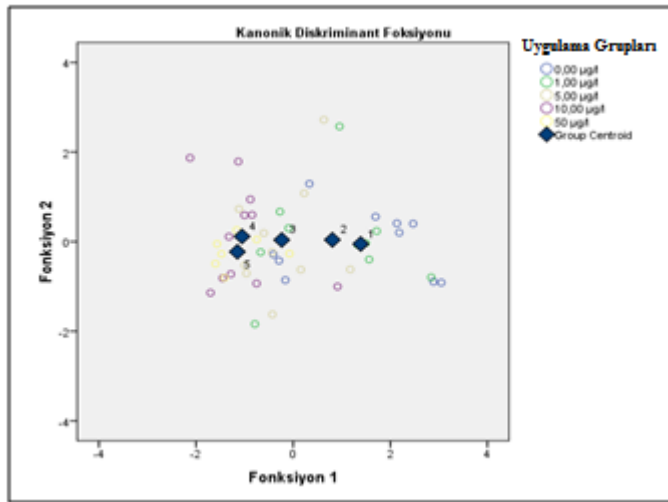
*Bufo bufo* larvalarına metoksiklor uygulamasının yapıldığı akut çalışma sonunda, uygulama gruplarındaki ölçümü yapılan söz konusu morfolojik karakterlerin; ortalama

değerleri ve standart hatalar, Çizelge 4.2.1.3.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.1.3.5. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar

Uygulama Grupları (µg/l)	Özellik							
	Islak Ağırlık (g)		Tot. Uzunluk (mm)		En (mm)		Kuyruk Uz. (mm)	
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM
0	0,04414	0,00570	15,140	1,247	3,907	0,605	9,034	0,796
1	0,03533	0,00825	14,254	1,374	3,490	0,539	8,013	0,585
5	0,03821	0,00589	13,665	1,208	3,438	0,708	7,776	0,496
10	0,03129	0,00428	12,645	0,716	3,021	0,442	7,099	0,430
50	0,02795	0,00298	12,641	0,771	3,376	0,226	7,175	0,616
100	0,02780	0,00265	12,710	0,789	2,960	0,336	6,720	0,528

Uygulama sonunda, pestisit maruziyetine bağlı olarak total vücut uzunluğu değişimlerinin, gruplar arasındaki farklılıklarının ortaya koyulması amacıyla kanonik diskriminant analizi yapılmıştır. Analize ait grafik aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2.1.3.14).



Şekil 4.2.1.3.14. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar (♦1: Kontrol Grubu: 0,00 µg/l; ♦2: 1 µg/l; ♦3: 5 µg/l; ♦4: 10 µg/l; ♦5: 50 µg/l).

Ayırma analizinde oluşan iki fonksiyon, toplam varyansın %100'ünü açıklamış ve 1. fonksiyonun p değeri önemli çıkmıştır (Çizelge 4.2.1.3.6).

Çizelge 4.2.1.3.6. *Bufo bufo* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler

Fonksiyon	Özdeğer	Varyans (%)	Total (%)	Kanonikal Korelasyon	Wilks Lambda	Chi-kare	df	p
1	2,432	98,9	98,9	0,856	0,312	62,264	8	0,000
2	0,044	1,1	100,0	0,267	0,867	3,431	3	0,587

#### **4.2.2. *Bufo viridis* larvalarında akut toksisite denemelerine ait araştırma bulguları**

##### **4.2.2.1. Morfolojik bulgular**

Akut toksisite denemeleri sonunda, pestisit uygulamasının yapılmadığı kontrol grubu larvalarda herhangi bir morfolojik anomaliye rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2.1.1). Çalışma sonunda, kontrol grubu larvaların, arka ekstremite taslaklığının gelişmeye başladığı ilk evre olan 26. evre ile gelişimin sürdüğü 28. evreler arasında oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.2.2.1.1. Kontrol grubu, 28. evre *Bufo viridis* larvası.

Maneb ve metoksiklor pestisitlerine maruz bırakılan uygulama grubu larvalarda ise doza bağlı artış gösteren; büyüme ve gelişmede gecikme, omurga eğriliği, visseral ödem ve kuyruk deformasyonları tespit edilmiştir.

On  $\mu\text{g/l}$  manebe maruz bırakılan *Bufo viridis* larvalarının, kontrol grubuna benzer şekilde 26.-28. evreler arasında oldukları tespit edilmiştir. Uygulamaya bağlı herhangi bir morfolojik anomaliye rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2.1.2).



Şekil 4.2.2.1.2. 10  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulaması yapılan, 26. evre *Bufo viridis* larvası.

Elli  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo viridis* larvalarında, büyüme ve gelişmenin baskılandığı, bu gruba dahil larvaların 23.-26. gelişim evreleri arasında oldukları belirlenmiştir. Ayrıca larvalarda düşük miktarda kuyruk deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.1.3).



Şekil 4.2.2.1.3. 50  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulaması yapılan, 26. evre *Bufo viridis* larvası.

Yüz  $\mu\text{g/l}$  ve 1000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının larvalarda, büyüme ve gelişimin ileri derecede baskılandığı tespit edilmiştir. 100  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların operculum gelişimlerini tamamlayamadıkları ve 23.-25. evreler arasında oldukları belirlenmiştir. 1000  $\mu\text{g/l}$  manebe maruz bırakılan larvaların ise 23.-24. evreler arasında oldukları gözlenmiştir. Ayrıca her iki uygulama grubuna dahil larvalarda ileri derecede visseral ödem tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.1.4).



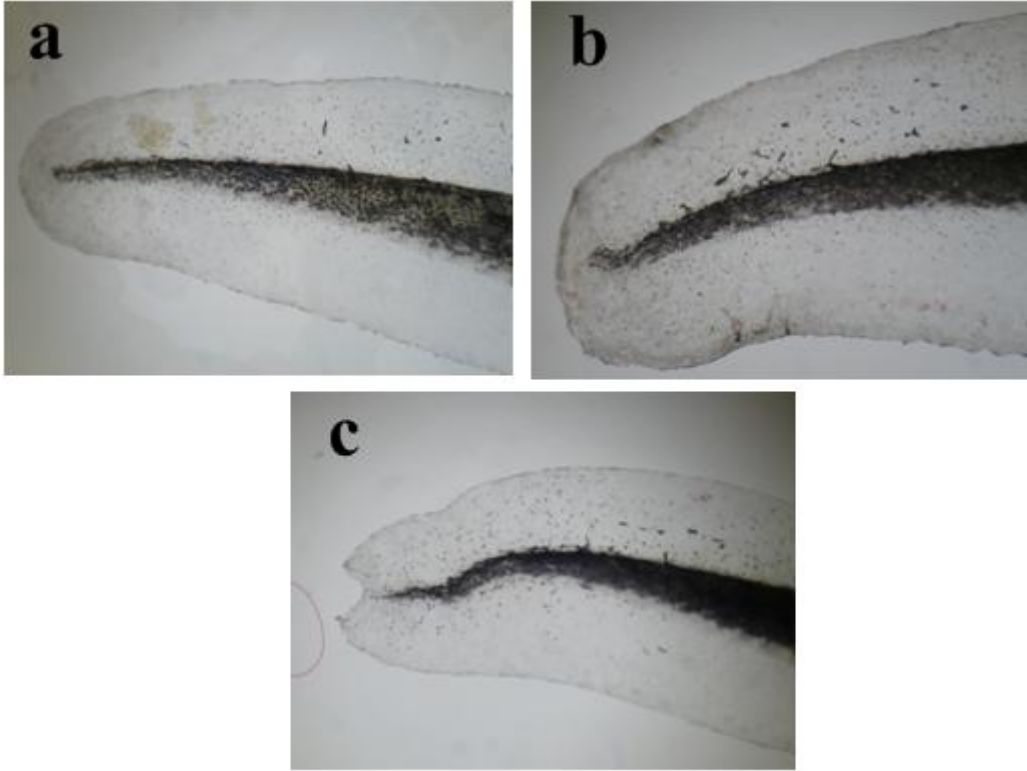
Şekil 4.2.2.1.4. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı *Bufo viridis* larvaları.

a. Kontrol grubu, 26. evre *Bufo viridis* larvası, b. 100  $\mu\text{g/l}$  manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo viridis* larvasında visseral ödem ( $\uparrow$ ), c. 1000  $\mu\text{g/l}$  manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo viridis* larvasında visseral ödem ( $\uparrow$ ).

Yüz  $\mu\text{g/l}$  ve 1000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının larvalarda, kuyruk deformasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.1.5).

Çalışma sonunda 5000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı tüm larvalar öldüğü için değerlendirmeye alınamamıştır.





Şekil 4.2.2.1.5. Kontrol ve maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarına ait kuyruk. a. Kontrol grubu, 26. evre *Bufo viridis* larvasına ait kuyruk, b. 100 µg/l manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo viridis* larvasına ait kuyruk, c. 1000 µg/l manebe maruz bırakılan 23. evre *Bufo viridis* larvasına ait kuyruk.

Metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında ise büyüme ve gelişimde doza bağlı olarak artış gösteren gecikmeler tespit edilmiştir.

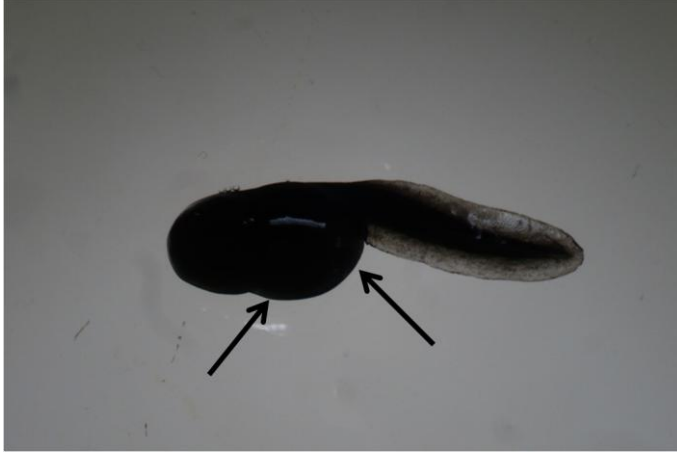
Bir µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarının, kontrol grubuna benzer şekilde 26.-28. evreler arasında oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.1.6).



Şekil 4.2.2.1.6. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan, 27. evre *Bufo viridis* larvası.

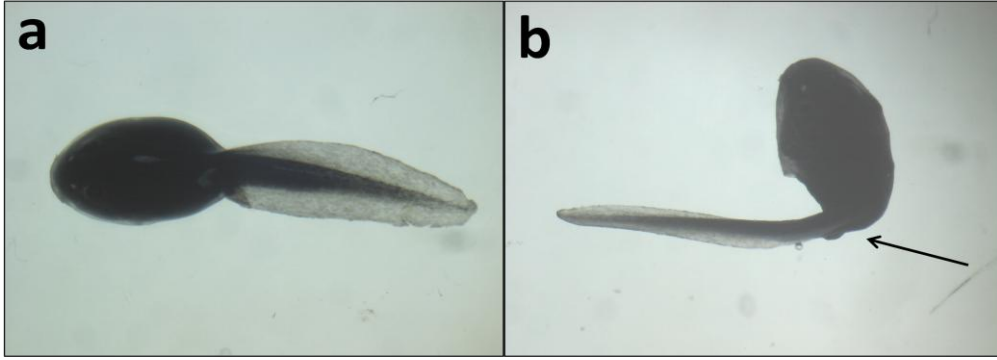
Beş µg/l ve 10 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvaların büyüme gelişimlerinde gecikmeler tespit edilmiştir. Bu gruba dahil larvaların, 23.-27. evreler arasında oldukları belirlenmiştir.

Elli µg/l metoksiklor uygulanan larvalarda ise gözlenen en önemli morfolojik bulgu visseral ödemdir (Şekil 4.2.2.1.7). Bu gruba dahil larvaların, 23.-25. evreler arasında oldukları tespit edilmiştir.

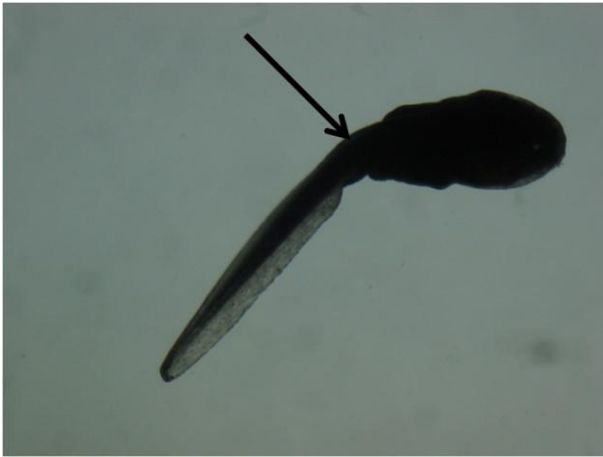


Şekil 4.2.2.1.7. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan 25. evre *Bufo viridis* larvasında visseral ödem (↑).

Metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında gözlenen en önemli morfolojik bulgu omurga eğriliğidir. Söz konusu omurga eğriliği en yüksek doz olan, 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı larvalarda bariz olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.1.8). Bu gruba dahil larvaların, 23.-25. evreler arasında oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde 50 µg/l metoksiklor uygulanan larvarın omurgalarında eğrilik tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.1.9).



Şekil 4.2.2.1.8. Kontrol ve 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvaları. a. Kontrol grubu 26. evre *Bufo viridis* larvası, b. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan 25. evre *Bufo viridis* larvasında omurga eğriliği (↑).



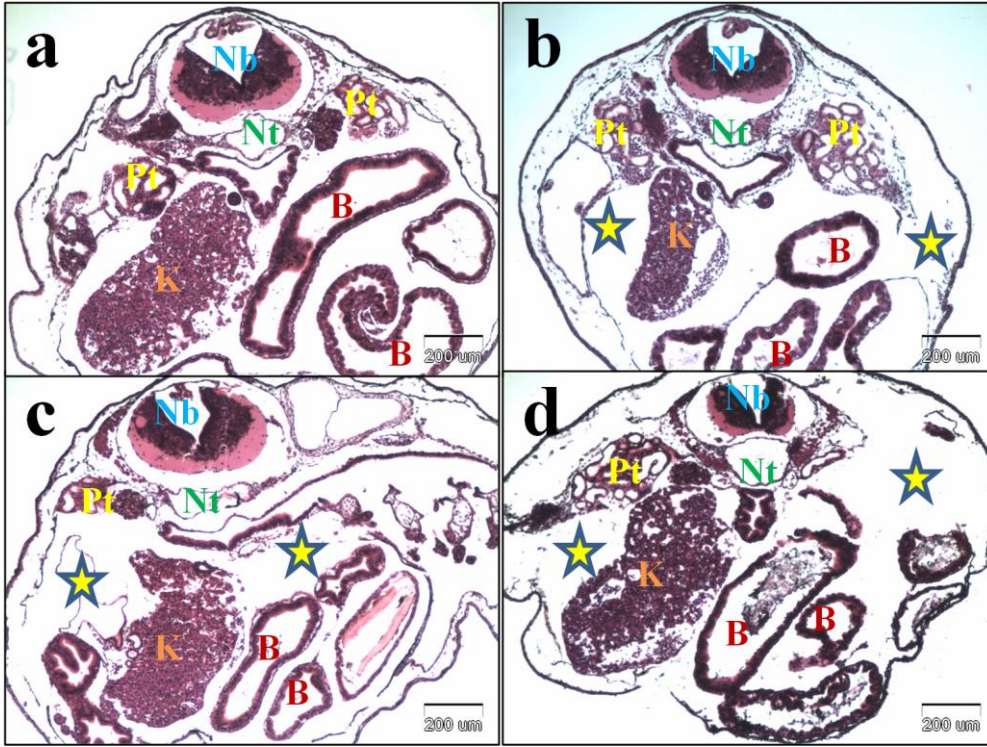
Şekil 4.2.2.1.9. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan 25. evre *Bufo viridis* larvasında omurga eğriliği (↑).

#### 4.2.2.2. Histopatolojik bulgular

Akut toksisite denemeleri sonunda (120. saat), pestisit uygulamasının yapılmadığı kontrol grubu larvalarda herhangi bir histolojik anomaliye rastlanmamıştır. Maneb ve metoksiklora maruz bırakılan *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarından hazırlanan histolojik kesitlerde, doza bağlı olarak artış gösteren visseral ödem oluşumu, operculum defektleri,

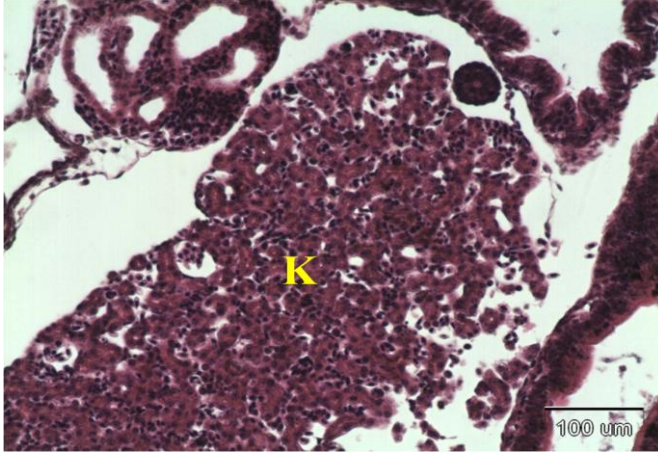
solungaçlarda lamellar birleşme, pronefrik tübül deformasyonları, karaciğerde nekroz, notokord defektleri ve somit formasyonunda bozulmalar gözlenmiştir.

On  $\mu\text{g/l}$  ve 50  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda düşük miktarda, 100 ve 1000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulamasının yapıldığı larvalarda ileri derecede visseral ödem oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.2.1).

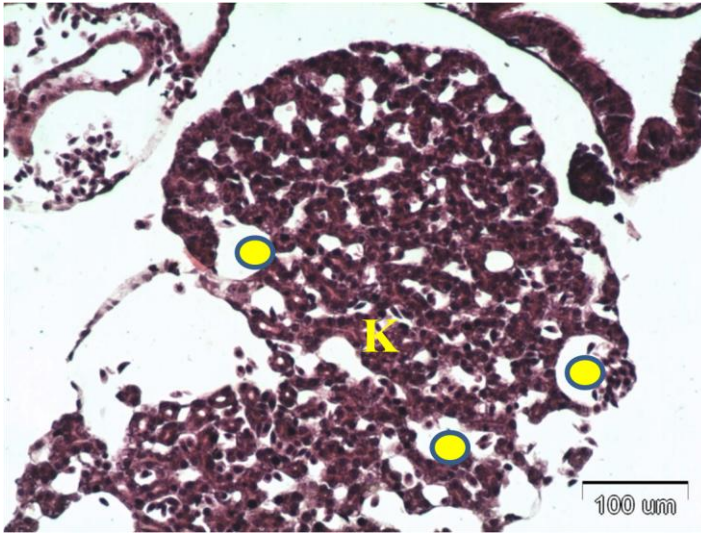


Şekil 4.2.2.2.1. Kontrol grubu ve maneb uygulamalarının yapıldığı *Bufo viridis* larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler. **a.** Kontrol grubu, **b.** 50  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulama grubu larvada visseral ödem (★), **c.** 100  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulama grubu larvada visseral ödem (★), **d.** 1000  $\mu\text{g/l}$  maneb uygulama grubu larvada visseral ödem (★), (H&E).

Kontrol grubu larvaların karaciğerinden geçen enine kesitlerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2.2.2). Ancak 1000  $\mu\text{g/l}$  manebe maruz bırakılan *Bufo viridis* larvaların karaciğerinden geçen enine kesitlerde ileri derecede nekroz gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.2.3).

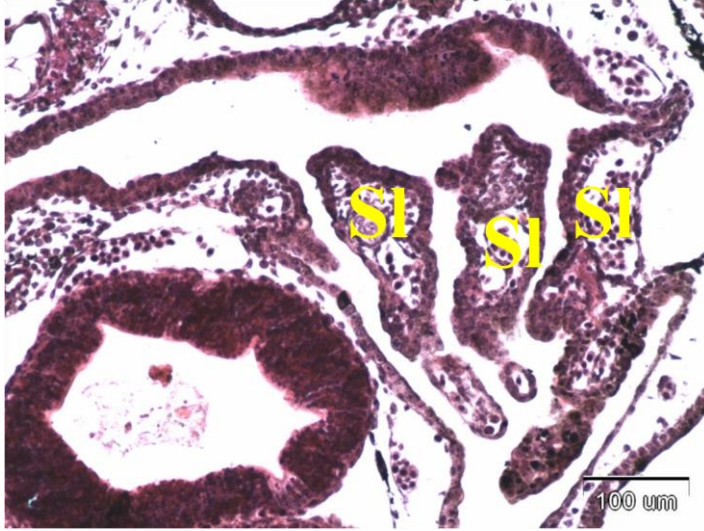


Şekil 4.2.2.2.2. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvası, karaciğerden geçen enine kesit, (H&E).

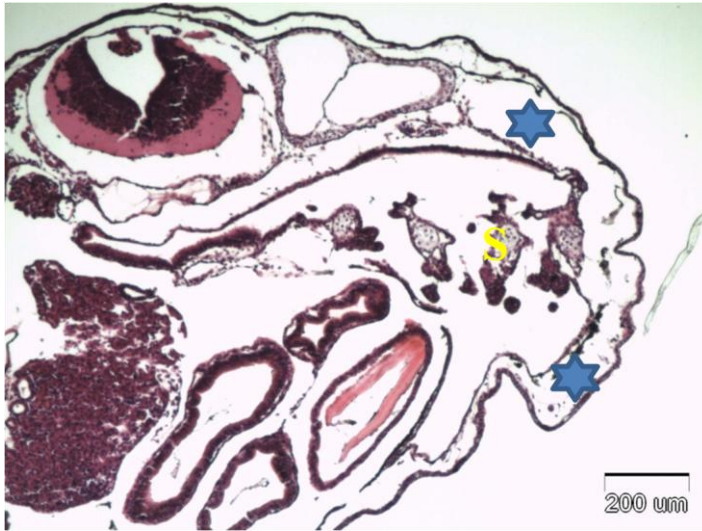


Şekil 4.2.2.2.3. 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, karaciğerden geçen enine kesitte nekroz (●), (H&E).

Kontrol grubu *Bufo viridis* larvalarının solungaçlarından geçen enine kesitlerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2.2.4). Ancak 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvaların operculumunda defektler gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.2.5).

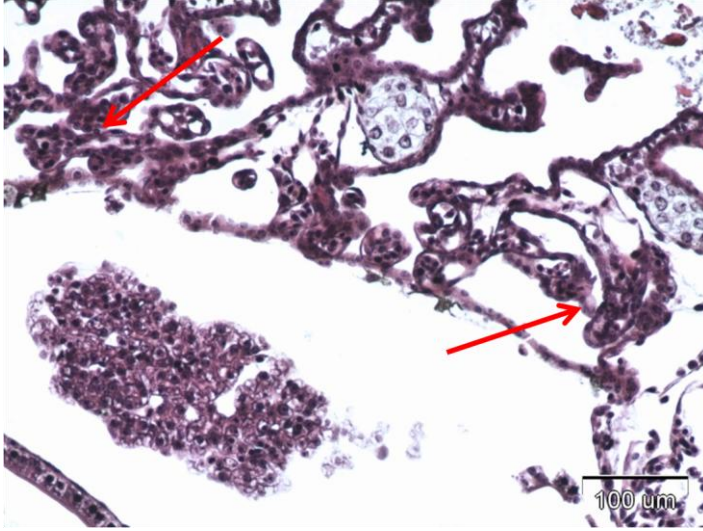


Şekil 4.2.2.2.4. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvası, solungaçlardan geçen enine kesit, (H&E).



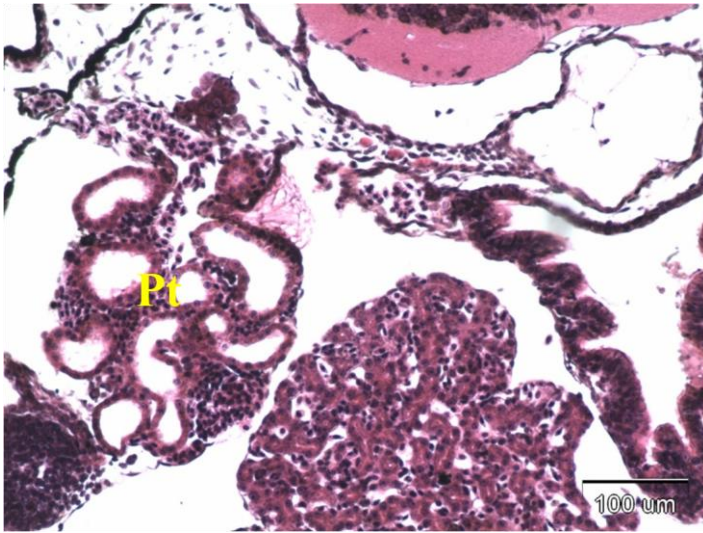
Şekil 4.2.2.2.5. 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, solungaçlardan geçen enine kesitte operculum defekti (★), (H&E).

Benzer şekilde 100 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların solungaçlarından geçen enine kesitlerde lamellar birleşmeler tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.2.6).

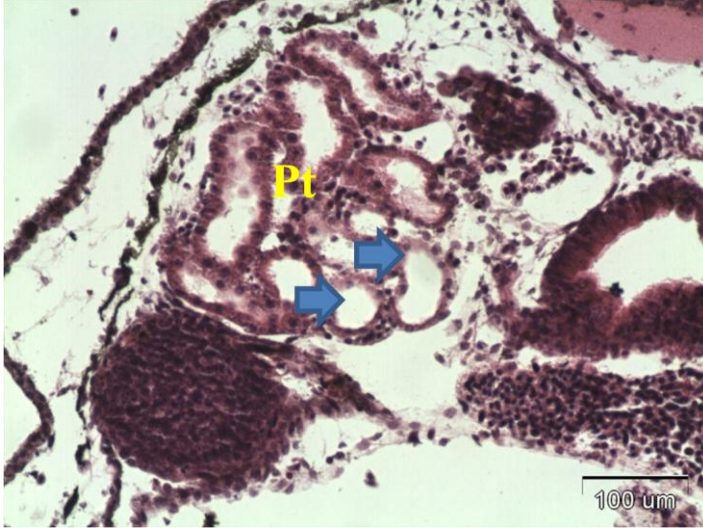


Şekil 4.2.2.2.6. 100 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, solungaçlardan geçen enine kesitte lamellar birleşmeler (→), (H&E).

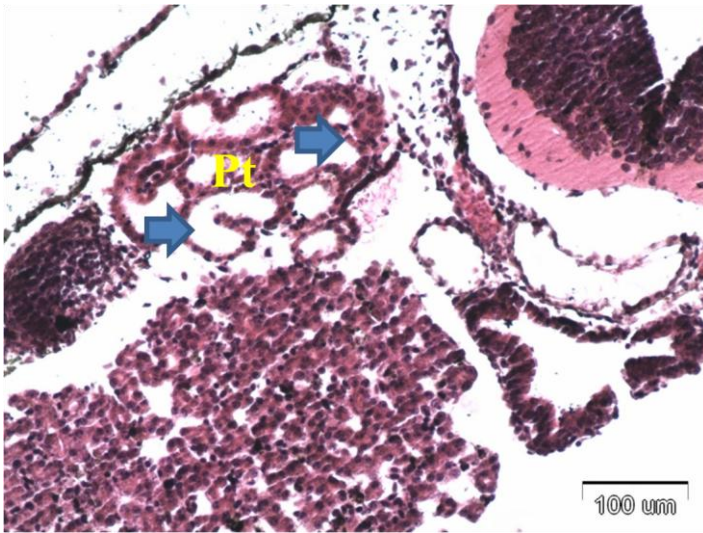
Kontrol grubu larvaların pronefrik tübüllerinden geçen enine kesitlerde önemli bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2.2.7). 100 µg/l ve 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı larvaların aynı bölgesinden geçen kesitlerde tübüler deformasyon gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.2.8 ve Şekil 4.2.2.2.9).



Şekil 4.2.2.2.7. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesit, (H&E).



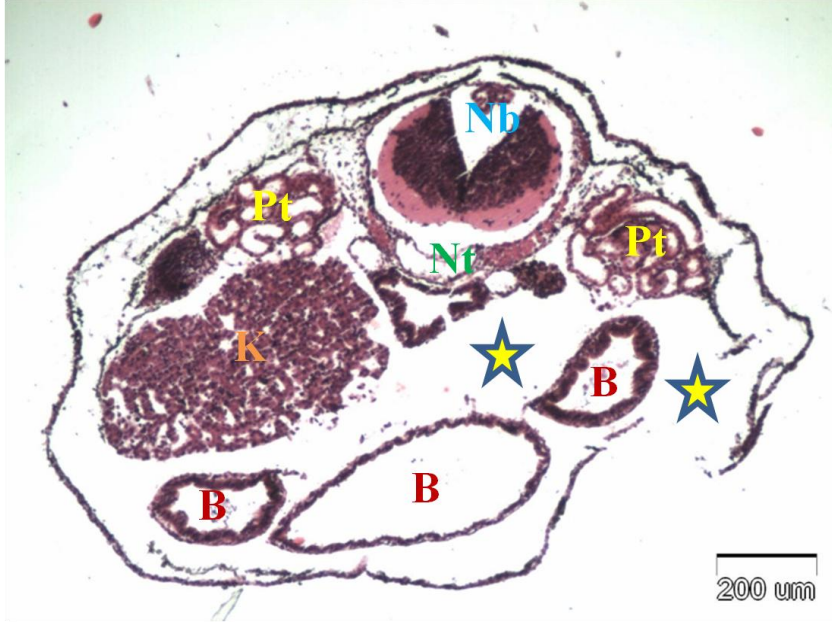
Şekil 4.2.2.2.8. 100 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo viridis* larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesitte, epitel hücresi deformasyonu (→), (H&E).



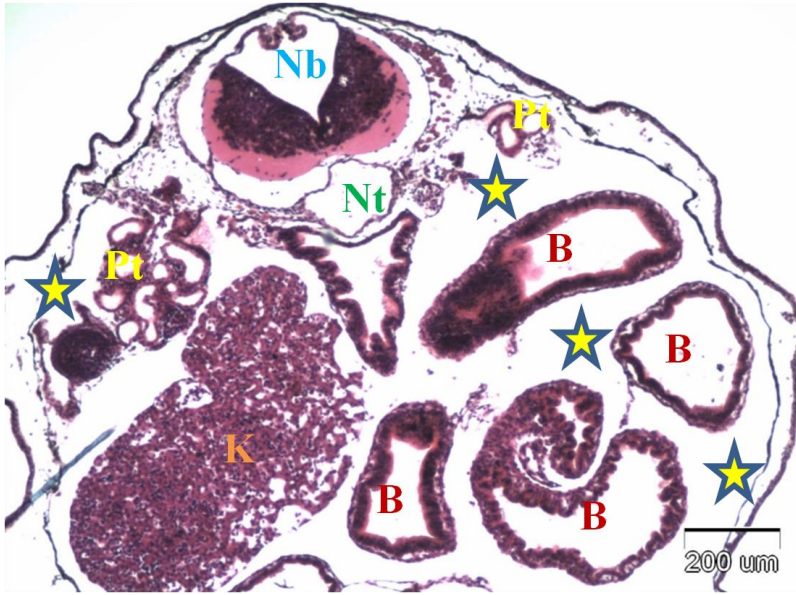
Şekil 4.2.2.2.9. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı *Bufo viridis* larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesitte, epitel hücresi deformasyonu (→), (H&E).

Elli µg/l ve 100 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı *Bufo viridis* larvalarında, doza bağlı artış gösteren visseral ödem tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.2.10 ve Şekil 4.2.2.2.11).



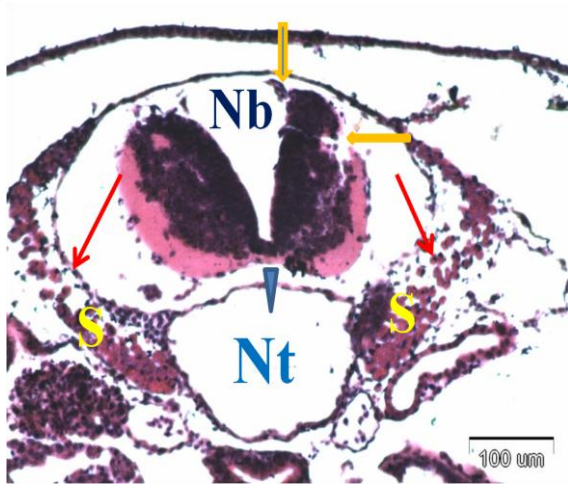


Şekil 4.2.2.2.10. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, iç organlardan geçen enine kesitte visseral ödem (★), (H&E).

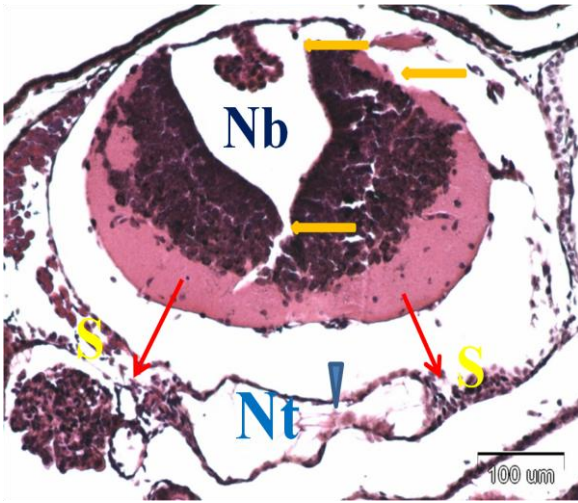


Şekil 4.2.2.2.11. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, iç organlardan geçen enine kesitte visseral ödem (★), (H&E).

Elli  $\mu\text{g/l}$  ve 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamalarının yapıldığı larvaların somit ve neural boru formasyonunda ileri derecede bozulmalar ve notokorda defektleri tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.2.12 ve Şekil 4.2.2.2.13).

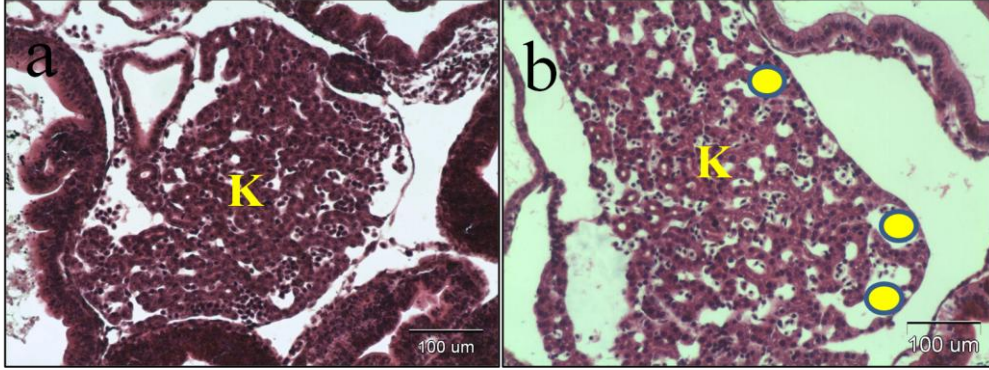


Şekil 4.2.2.2.12. 50  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, neural boruda deformasyon (—), notokorda defekti (▼) ve somit formasyonunda bozulmalar (↘), (H&E).



Şekil 4.2.2.2.13. 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvası, neural boruda deformasyon (—), notokorda defekti (▼) ve somit formasyonunda bozulmalar (↘), (H&E).

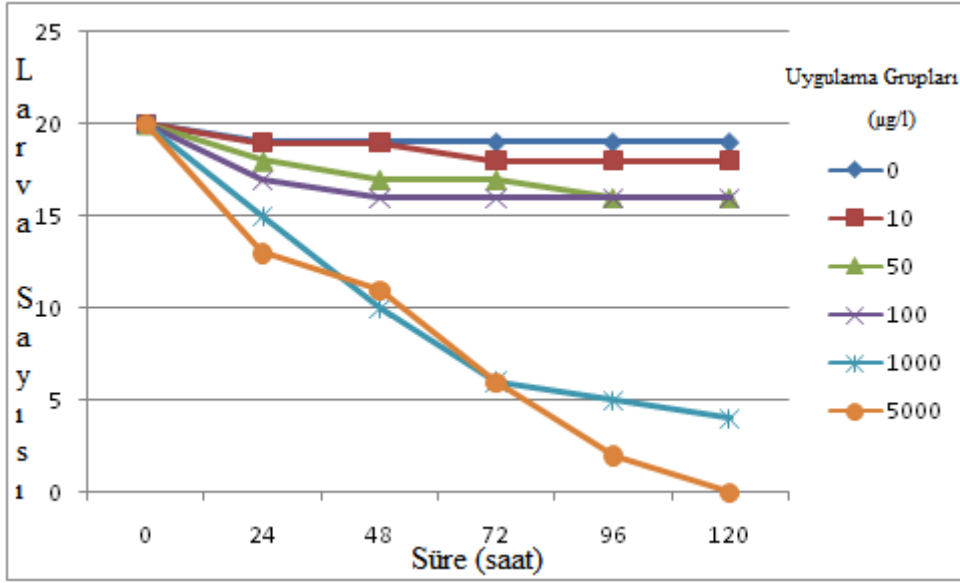
Kontrol grubu *Bufo viridis* larvaların karaciğerinden geçen enine kesitlerde önemli bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. Çalışmada, en yüksek doz olan 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarının aynı bölgeden geçen enine kesitlerinde karaciğer nekrozu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.2.14).



Şekil 4.2.2.2.14. Kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında karaciğerden geçen enine kesitler. a. Kontrol grubu, b. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvada karaciğer nekrozu (●), (H&E).

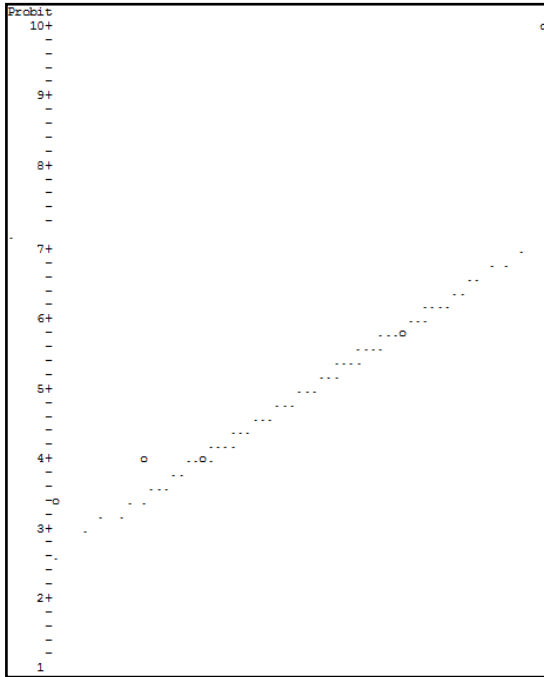
#### 4.2.2.3. İstatistiksel bulgular

*Bufo viridis* larvalarına 120 saat süreyle maneb uygulamasının yapıldığı akut toksisite denemelerinde; deney sonunda kontrol grubu larvalarda 1 adet doğal ölüm gözlenmiştir. 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruba dahil tüm larvaların 120. saatte öldüğü tespit edilmiştir. Akut toksisite denemeleri süresince, 24 saatlik periyotlarda uygulama dozlarına bağlı olarak hayatta kalan larvaların sayılarını gösteren grafik diğer sayfada sunulmuştur (Şekil 4.2.2.3.1).



Şekil 4.2.2.3.1. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı (n: 20 larva).

Çalışma sonundaki mortalite değerlerine göre, lineer transformasyonla verilen probit grafiği Şekil 4.2.2.3.2’de sunulmuştur.



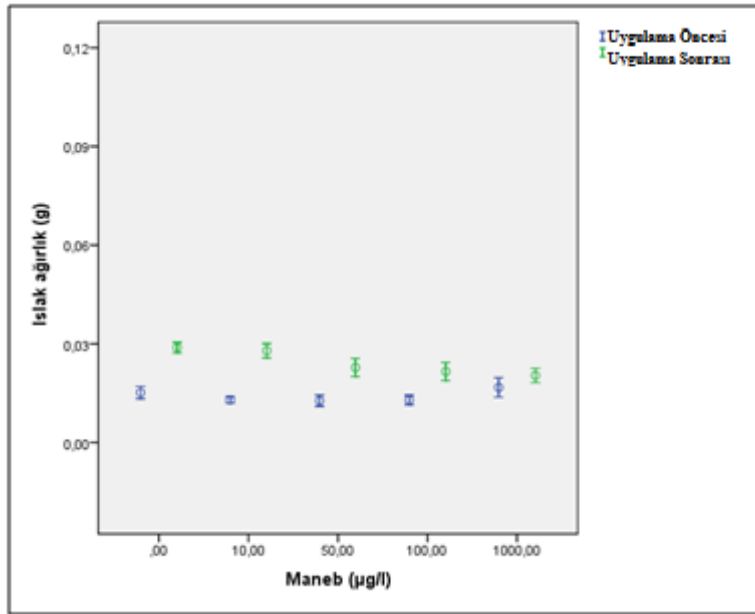
Şekil 4.2.2.3.2. *Bufo viridis* larvalarına 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından probit grafiği.

21. evre *Bufo viridis* larvalarına maneb pestisitinin 120 saat süreyle uygulanmasının ardından hesaplanan LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub> değerleri, Çizelge 4.2.2.3.1’de sunulmuştur.

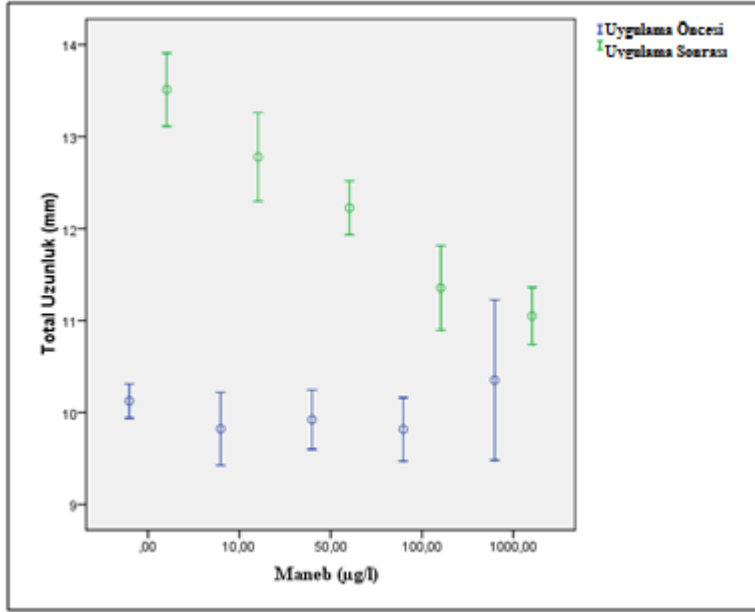
Çizelge 4.2.2.3.1. *Bufo viridis* larvalarında, maneb pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri (µg/l)

LC değerleri	Konsantrasyon (µg/l)	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
LC <sub>10</sub>	66,565	11,867	150,551
LC <sub>50</sub>	332,834	145,890	626,081
LC <sub>90</sub>	1664,212	857,422	5446,047

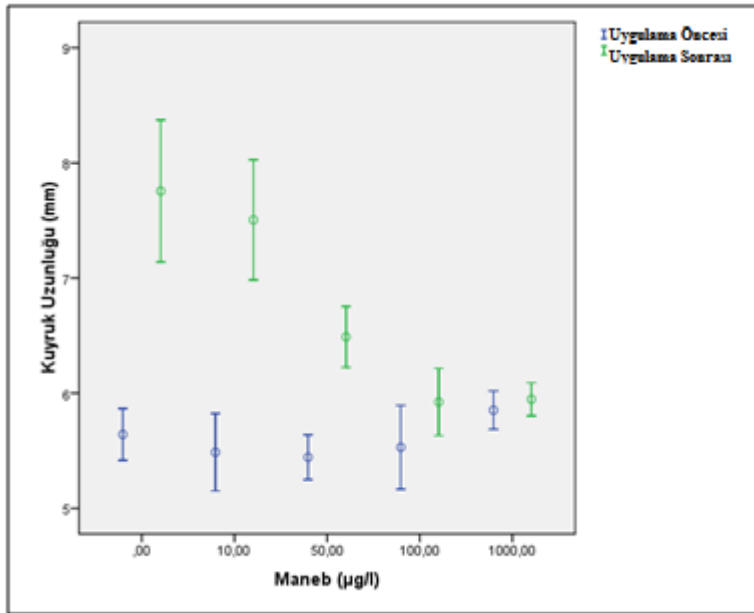
Toksisite denemeleri başında ve sonunda larvaların ıslak ağırlık (Şekil 4.2.2.3.3), total vücut uzunluğu (Şekil 4.2.2.3.4), kuyruk uzunluğu (Şekil 4.2.2.3.5) ve en (Şekil 4.2.2.3.6) gibi morfolojik karakterler için yapılan ölçümlere ait değişim grafikleri sırasıyla sunulmuştur.



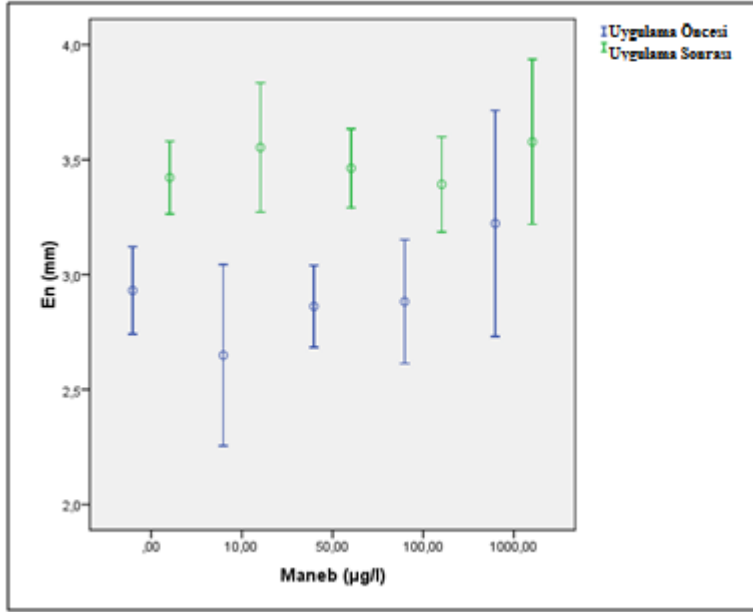
Şekil 4.2.2.3.3. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.2.3.4. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.2.3.5. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



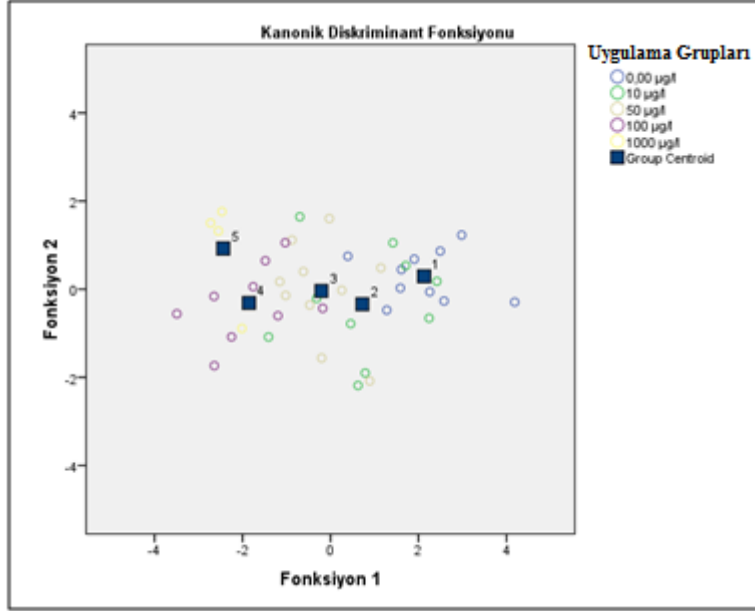
Şekil 4.2.2.3.6. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri.

*Bufo viridis* larvalarına maneb uygulamasının yapıldığı akut çalışma sonunda, uygulama gruplarındaki ölçümü yapılan söz konusu morfolojik karakterlerin, ortalama değerleri ve standart hataları, Çizelge 4.2.2.3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.2.3.2. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar

Uygulama Grupları (µg/l)	Özellik							
	Islak Ağırlık (g)		Tot. Uzunluk (mm)		En (mm)		Kuyruk Uz. (mm)	
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM
0	0,028890	0,00223	13,511	0,557	3,422	0,220	7,756	0,862
10	0,027940	0,00305	12,779	0,674	3,553	0,394	7,505	0,729
50	0,025290	0,00390	12,272	0,430	3,454	0,267	6,541	0,371
100	0,02194	0,00346	11,424	0,562	3,363	0,205	5,900	0,337
1000	0,020760	0,00146	11,082	0,183	3,618	0,2152	5,990	0,1229
5000	---	---	---	---	---	---	---	---

Uygulama sonunda pestisit maruziyetine bağlı olarak total vücut uzunluğu değişimlerinin, gruplar arasındaki farklılıklarının ortaya koyulması amacıyla kanonik diskriminant analizi yapılmıştır. Analize ait grafik aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2.2.3.7).



Şekil 4.2.2.3.7. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar (■1: Kontrol Grubu: 0,00 µg/l; ■2: 10 µg/l; ■3: 50 µg/l; ■4: 100 µg/l; ■5: 1000 µg/l maneb).

Ayırma analizinde oluşan iki fonksiyon, toplam varyansın %100'ünü açıklamış ve 1. fonksiyonun p değeri önemli çıkmıştır (Çizelge 4.2.2.3.3).

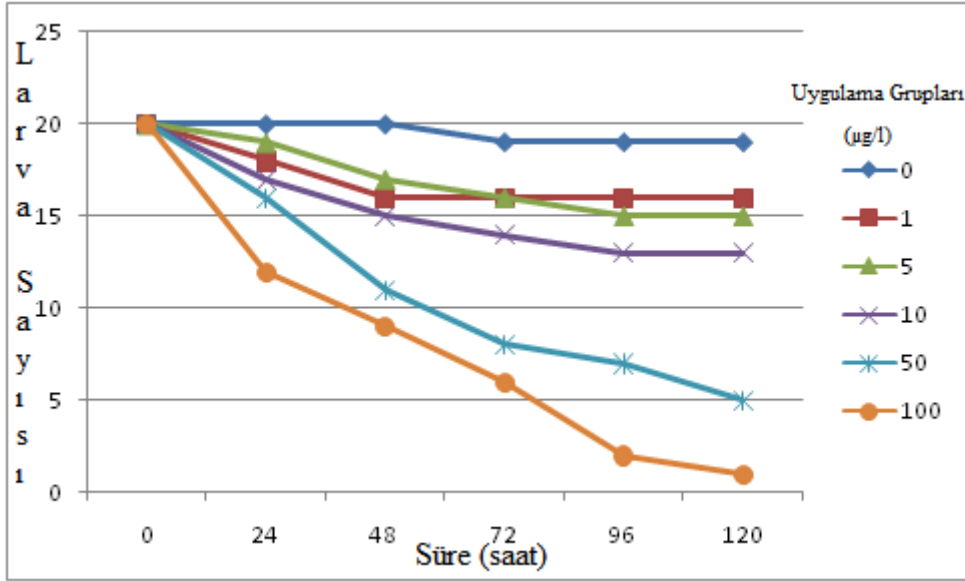
Çizelge 4.2.2.3.3. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler

Fonksiyon	Özdeğer	Varyans (%)	Total (%)	Kanonikal Korelasyon	Wilks Lambda	Chi-kare	df	p
1	2,468	98,1	98,1	0,689	0,320	57,284	8	0,000
2	0,090	1,9	100,0	0,290	0,872	3,312	3	0,592

*Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulamasının yapıldığı akut toksisite denemelerinde; deney sonunda kontrol grubu larvalarda 1 adet doğal ölüm

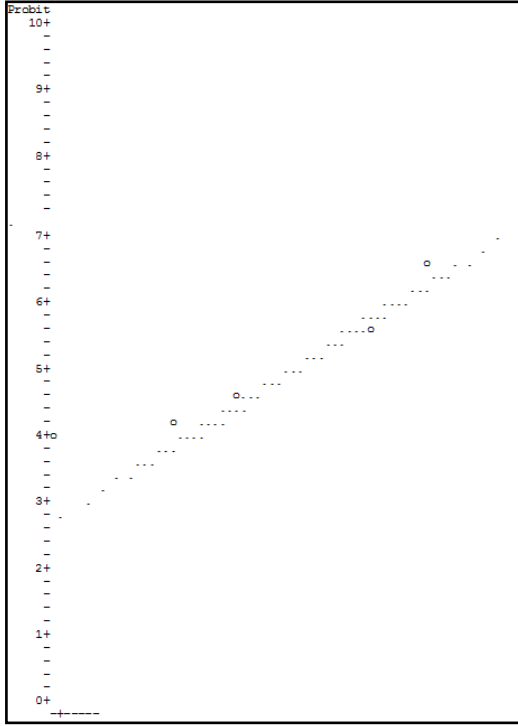


gözlenmiştir. Deneme sonunda, en fazla sayıda ölüm, en yüksek doz olarak uygulanan, 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamasının yapıldığı grupta tespit edilmiştir. Bu grupta 19 larvanın öldüğü tespit edilmiştir. 100  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan gruba dahil larvalarda, ileri derecede morfolojik anomali olduğu için ölçüm alınmamıştır. Toksikite denemeleri süresince, uygulama dozlarına bağlı olarak hayatta kalan larvaların sayılarını gösteren grafik aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2.2.3.8).



Şekil 4.2.2.3.8. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı (n: 20 larva).

Çalışma sonundaki mortalite değerlerine göre, lineer transformasyonla verilen probit grafiği Şekil 4.2.2.3.9’da sunulmuştur.



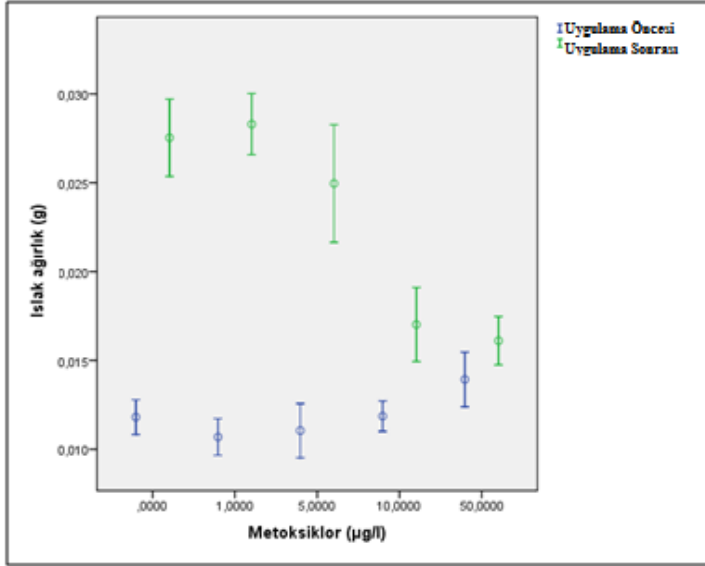
Şekil 4.2.2.3.9. *Bufo viridis* larvalarına 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından probit grafiği.

21. evre *Bufo viridis* larvalarına, metoksiklor pestisitinin 120 saat süreyle uygulanmasının ardından hesaplanan LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> ve LC<sub>90</sub> değerleri, Çizelge 4.2.2.3.4'de sunulmuştur.

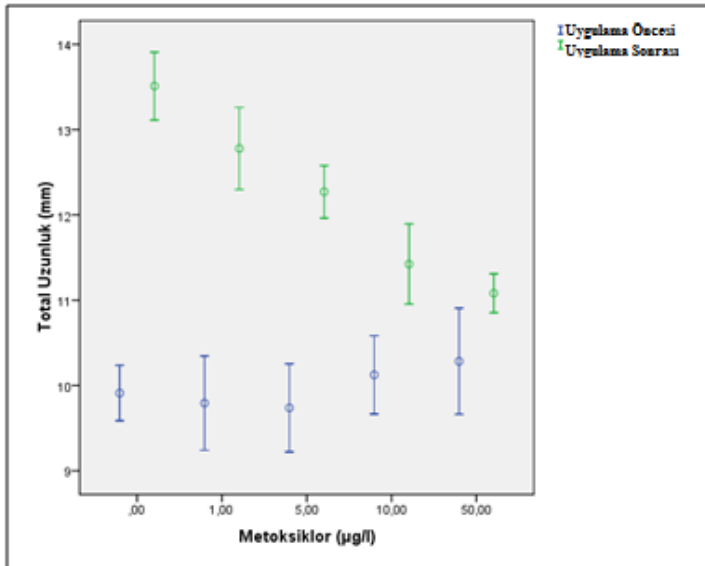
Çizelge 4.2.2.3.4. *Bufo viridis* larvalarında, metoksiklor pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri (µg/l)

LC değerleri	Konsantrasyon (µg/l)	%95 Güven Aralığı	
		Alt	Üst
LC <sub>10</sub>	4,187	0,604	9,232
LC <sub>50</sub>	20,313	9,204	34,400
LC <sub>90</sub>	98,535	55,149	325,961

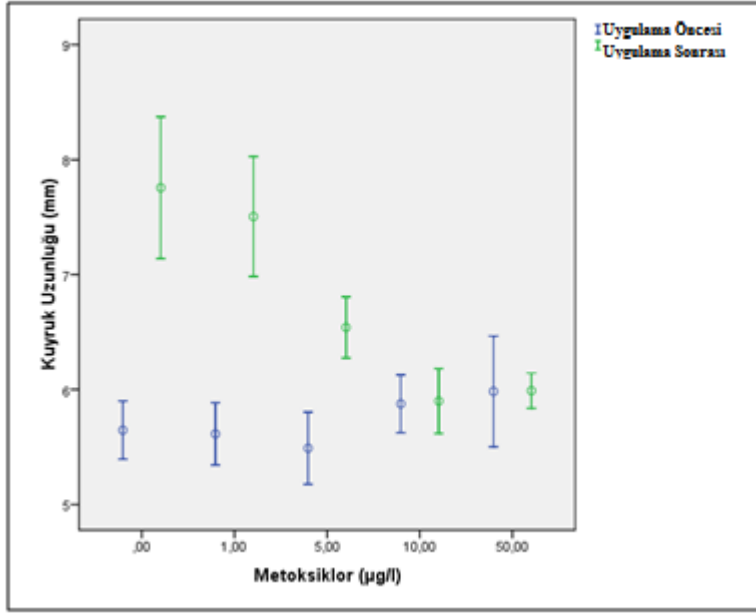
Toksosite denemeleri başında ve sonunda larvaların ıslak ağırlık (Şekil 4.2.2.3.10), total vücut uzunluğu (Şekil 4.2.2.3.11), kuyruk uzunluğu (Şekil 4.2.2.3.12) ve en (Şekil 4.2.2.3.13) gibi morfolojik karakterler için yapılan ölçümlere ait değişim grafikleri sırasıyla sunulmuştur.



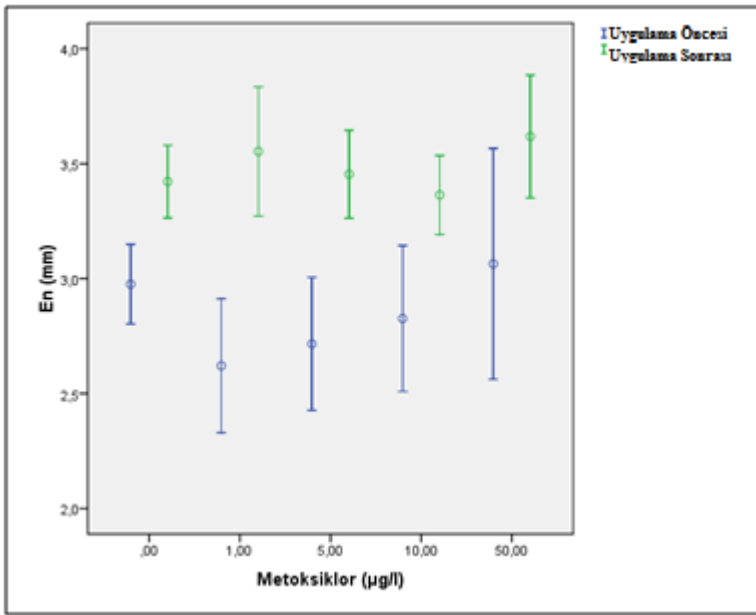
Şekil 4.2.2.3.10. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.2.3.11. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.2.3.12. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri.



Şekil 4.2.2.3.13. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri.

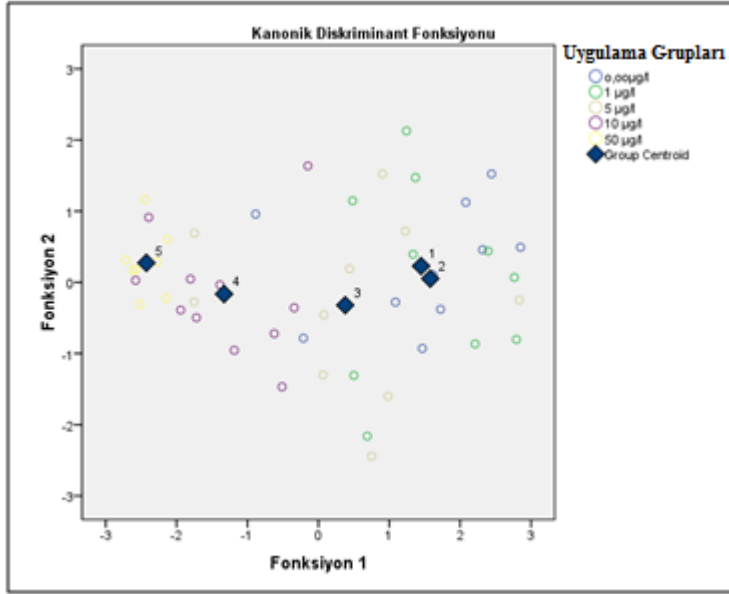
*Bufo viridis* larvalarına metoksiklor uygulamasının yapıldığı akut çalışma sonunda, uygulama gruplarındaki ölçümü yapılan söz konusu morfolojik karakterlerin, ortalama

değerleri ve standart hatalar, Çizelge 4.2.2.3.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2.2.3.5. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar

Uygulama Grupları (µg/l)	Özellik							
	Islak Ağırlık (g)		Tot. Uzunluk (mm)		En (mm)		Kuyruk Uz. (mm)	
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM
0	0,02742	0,00319	13,216	0,704	3,390	0,433	8,357	0,632
1	0,028330	0,00211	13,361	0,543	3,361	0,286	7,762	0,582
5	0,02496	0,00463	12,796	0,691	3,295	0,228	7,513	0,577
10	0,017020	0,00291	11,708	0,422	3,437	0,338	6,235	0,422
50	0,016110	0,00190	11,210	0,308	3,326	0,197	6,060	0,2616
100	---	---	---	---	---	---	---	---

Uygulama sonunda pestisit maruziyetine bağlı olarak total vücut uzunluğu değişimlerinin, gruplar arasındaki farklılıklarının ortaya koyulması amacıyla kanonik diskriminant analizi yapılmıştır. Analize ait grafik diğer sayfada sunulmuştur (Şekil 4.2.2.3.14).



Şekil 4.2.2.3.14. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar (◆1: Kontrol Grubu: 0,00 µg/l; ◆2: 1 µg/l; ◆3: 5 µg/l; ◆4: 10 µg/l; ◆5: 50 µg/l).

Ayırma analizinde oluşan iki fonksiyon, toplam varyansın %100'ünü açıklamış ve 1. fonksiyonun p değeri önemli çıkmıştır (Çizelge 4.2.2.3.6).

Çizelge 4.2.2.3.6. *Bufo viridis* larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler

Fonksiyon	Özdeğer	Varyans (%)	Total (%)	Kanonikal Korelasyon	Wilks Lambda	Chi-kare	df	p
1	2,854	98,9	98,9	0,521	0,431	62,468	8	0,000
2	0,083	1,1	100,0	0,280	0,987	4,187	3	0,613

### 4.3. Kronik Toksikite Denemelerine Ait Araştırma Bulguları

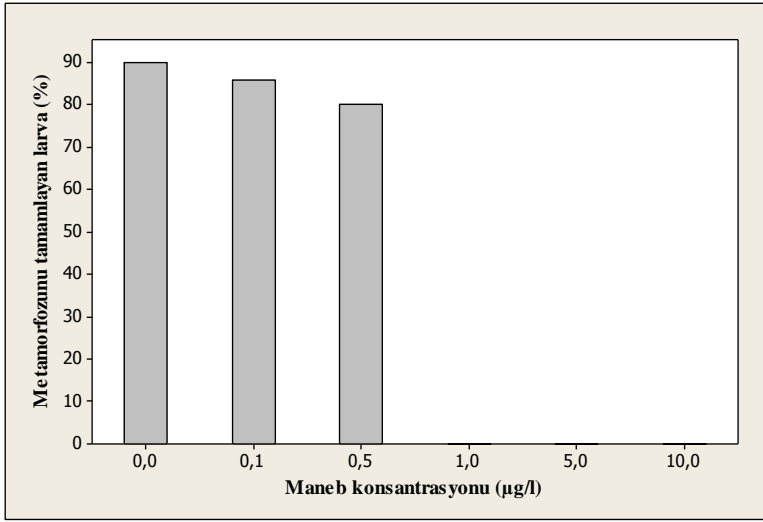
#### 4.3.1. *Bufo bufo* larvalarında kronik toksisite denemelerine ait araştırma bulguları

*Bufo bufo* larvalarında, maneb pestisitinin; 21. evreden itibaren, 35 gün süreyle kontrol grubu larvalarda metamorfozun sonlanmasına kadar uygulanması neticesinde örnekleme günlerine bağlı olarak, larvaların somatik yaşları ve gelişim evresi aralıkları Çizelge 4.3.1.1’de sunulmuştur. Her uygulama grubuna dahil 10 adet larva morfolojik açıdan incelenmiş olup bu larvaların, en ileri ve en geri gelişim evreleri aralık olarak belirtilmiştir. Kontrol grubu *Bufo bufo* larvalarının büyük çoğunluğunun (%88), 46. somatik yaşında metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Ancak maneb uygulamasına bağlı olarak özellikle 1, 5 ve 10 µg/l uygulama gruplarındaki larvaların metamorfozunu tamamlama süresinde gecikmeler tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.1.1. *Bufo bufo* larvalarına, maneb pestisitinin 35 gün süreyle kronik uygulanması neticesindeki somatik yaş / gelişim evresi (n:10)

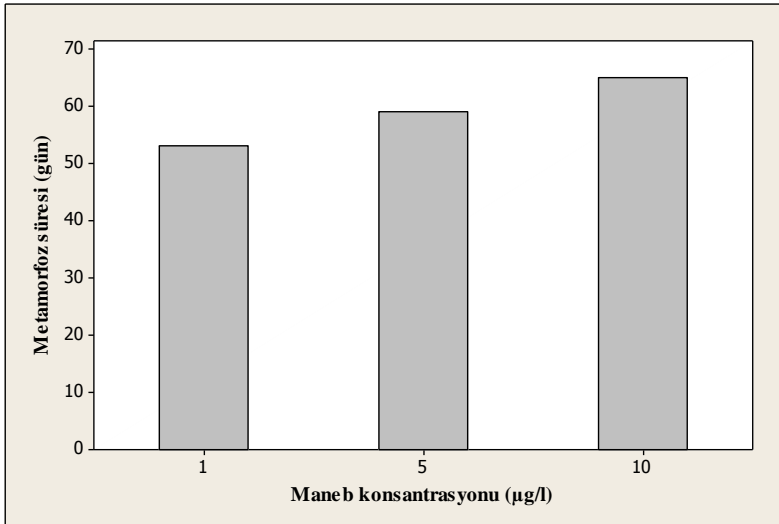
Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner,1960)				
0	18 28-29	25 34-36	32 35-37	39 39-40	46 44-46
0,1	18 27-30	25 34-35	32 34-36	39 36-38	46 42-46
0,5	18 27-29	25 31-34	32 32-34	39 36-39	46 42-46
1	18 24-28	25 26-34	32 29-36	39 33-39	46 39-44
5	18 24-28	25 25-34	32 29-36	39 32-39	46 35-40
10	18 24-27	25 25-34	32 28-36	39 33-39	46 37-40

46. somatik yaşında *Bufo bufo* larvalarının, kontrol ve uygulama gruplarındaki metamorfozunu tamamlayanların yüzdeleri Şekil 4.3.1.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.1. Kontrol ve maneb uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri.

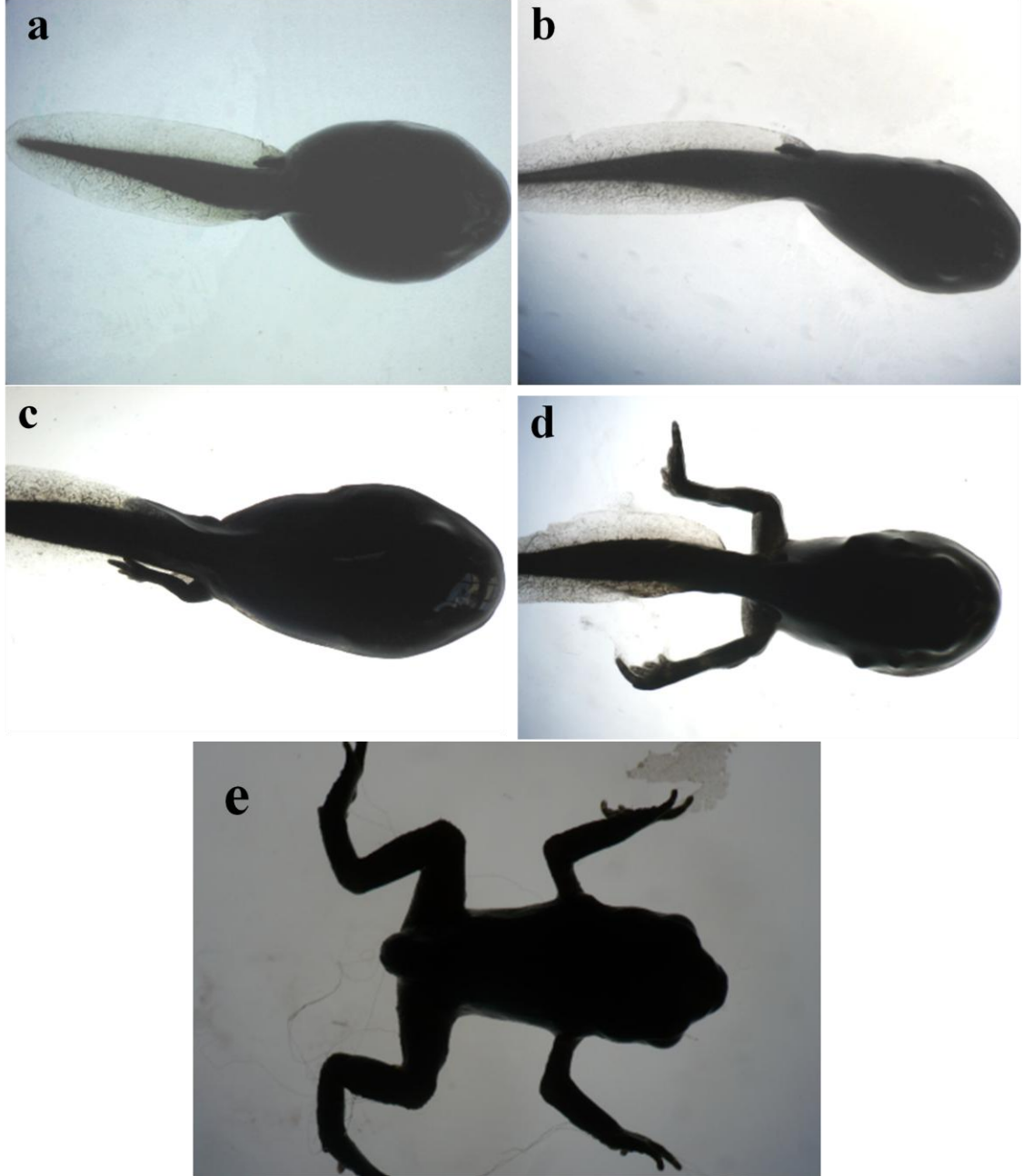
Bir, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların % 50’sinin metamorfozunu tamamladığı somatik yaşlar Şekil 4.3.1.2’de sunulmuştur.



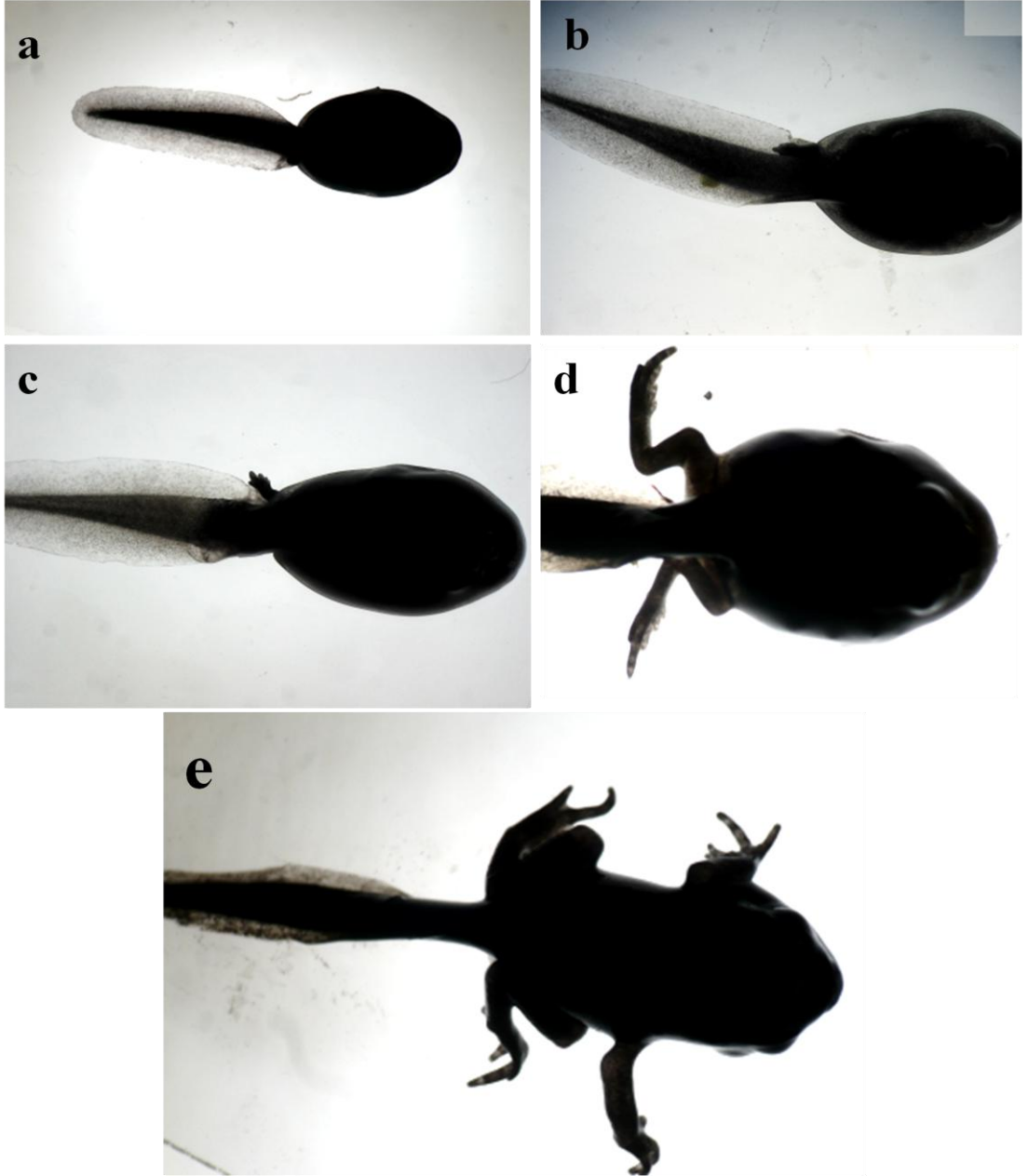
Şekil 4.3.1.2. 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvalarında, pestisit konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi.



*Bufo bufo* larvalarında, kontrol ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvaların 18, 25, 32, 39 ve 46. somatik yaşlarında en ileri gelişim evrelerinde olanlar Şekil 4.3.1.3 ve Şekil 4.3.1.4’de sunulmuştur.

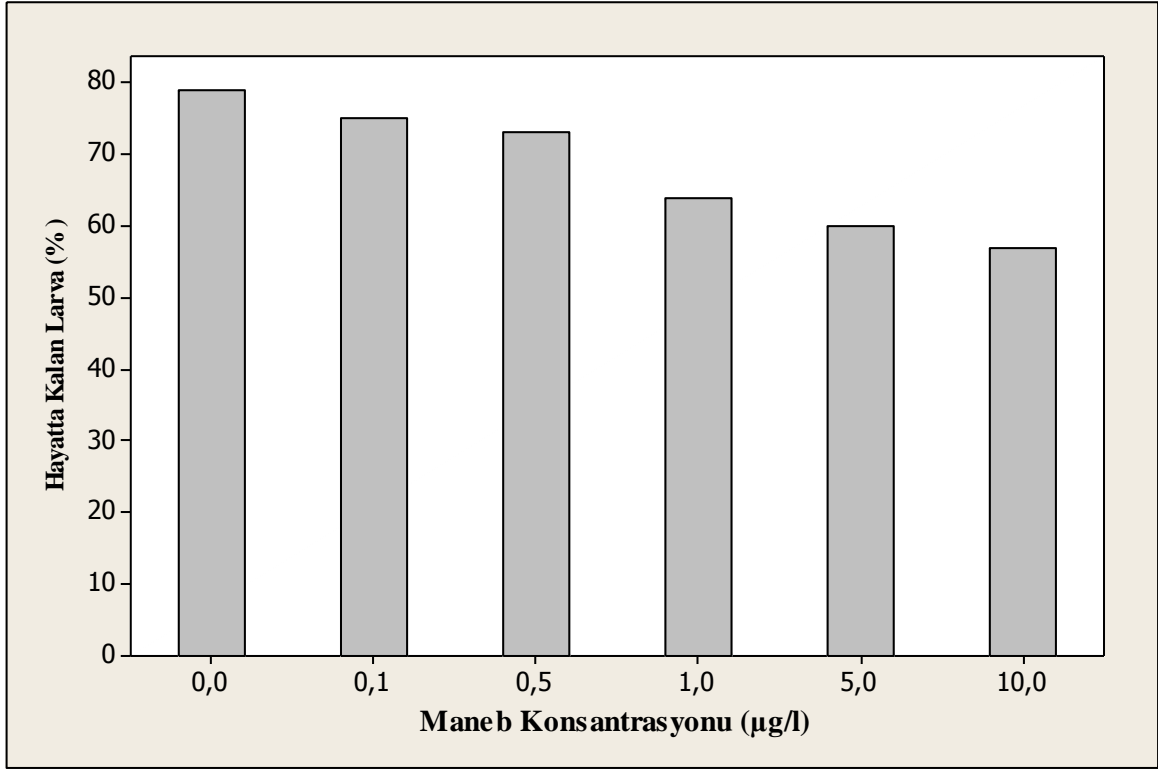


Şekil 4.3.1.3. Kontrol grubu *Bufo bufo* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 18. somatik yaş / 29. evre, b. 25. somatik yaş / 36. evre, c. 32. somatik yaş / 37. evre, d. 39. somatik yaş / 40. evre, e. 46. somatik yaş / 46. evre.



Şekil 4.3.1.4. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 18. somatik yaş / 27. evre, b. 25. somatik yaş / 34. evre, c. 32. somatik yaş / 36. evre, d. 39. somatik yaş / 39. evre, e. 46. somatik yaş / 40. evre.

46. somatik yaşındaki, kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil *Bufo bufo* larvalarının hayatta kalma yüzdeleri Şekil 4.3.1.5’de sunulmuştur.



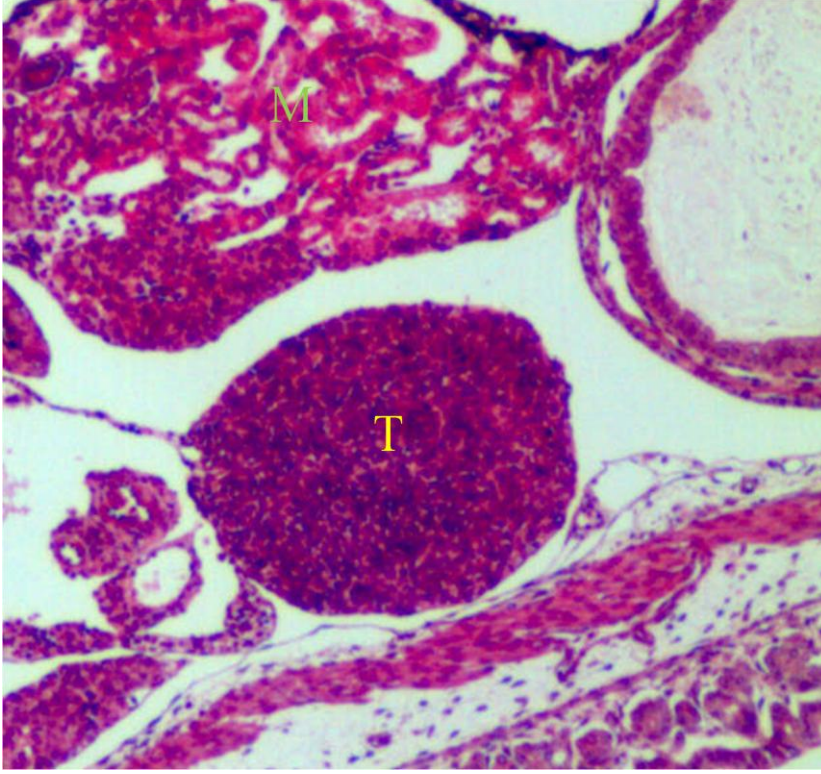
Şekil 4.3.1.5. 46. somatik yaşındaki *Bufo bufo* larvalarının maneb uygulamasına bağlı olarak hayatta kalan larva yüzdeleri (n: 60).

Kontrol ve maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda, pestisit maruziyetine bağlı olarak herhangi bir morfolojik anomali gözlenmemiştir.

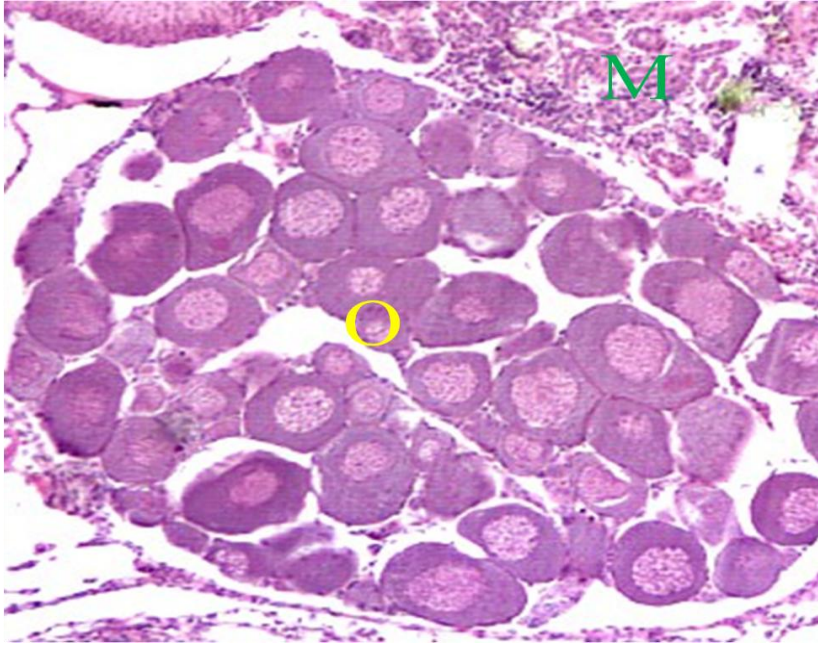
Histolojik kesitlerde, 38. evre kontrol grubu *Bufo bufo* larvalarında farklılaşmamış gonad taslağı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.1.6). Aynı gruba dahil larvaların, 46. evrelerinde mezonefroz böbrek, testis ve ovaryum ayırımının yapılabildiği gözlenmiştir (Şekil 4.3.1.7 ve Şekil 4.3.1.8). Uygulama grubu larvaların, mezonefroz böbrek ve gonadlarından geçen kesitlerde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır.



Şekil 4.3.1.6. Kontrol grubu 39. evre *Bufo bufo* larvasında pronefrik tübüller ve farklılaşmamış gonad taslağı, (H&E).

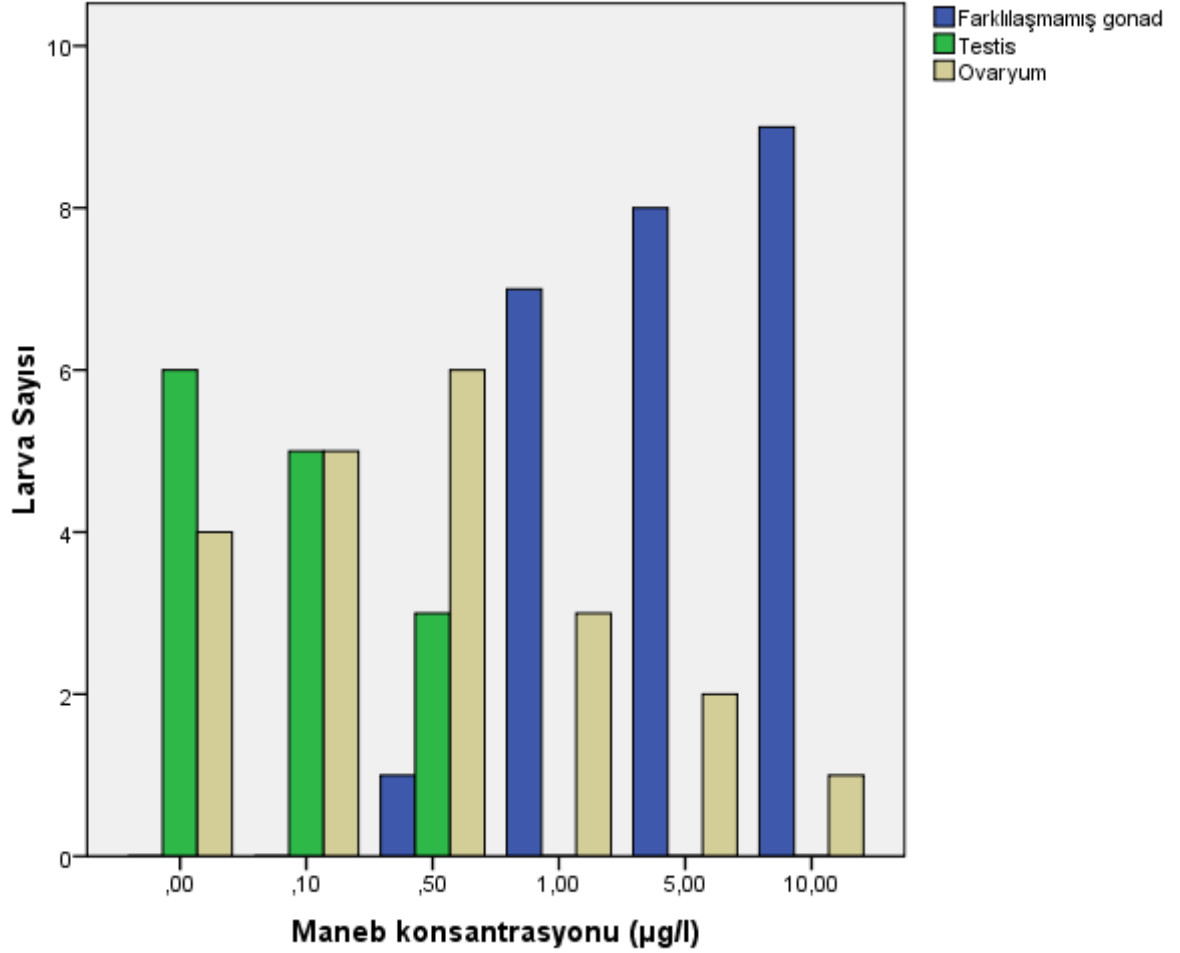


Şekil 4.3.1.7. Kontrol grubu 46. evre *Bufo bufo* larvasında mezonefroz böbrek ve testis, (PAS).



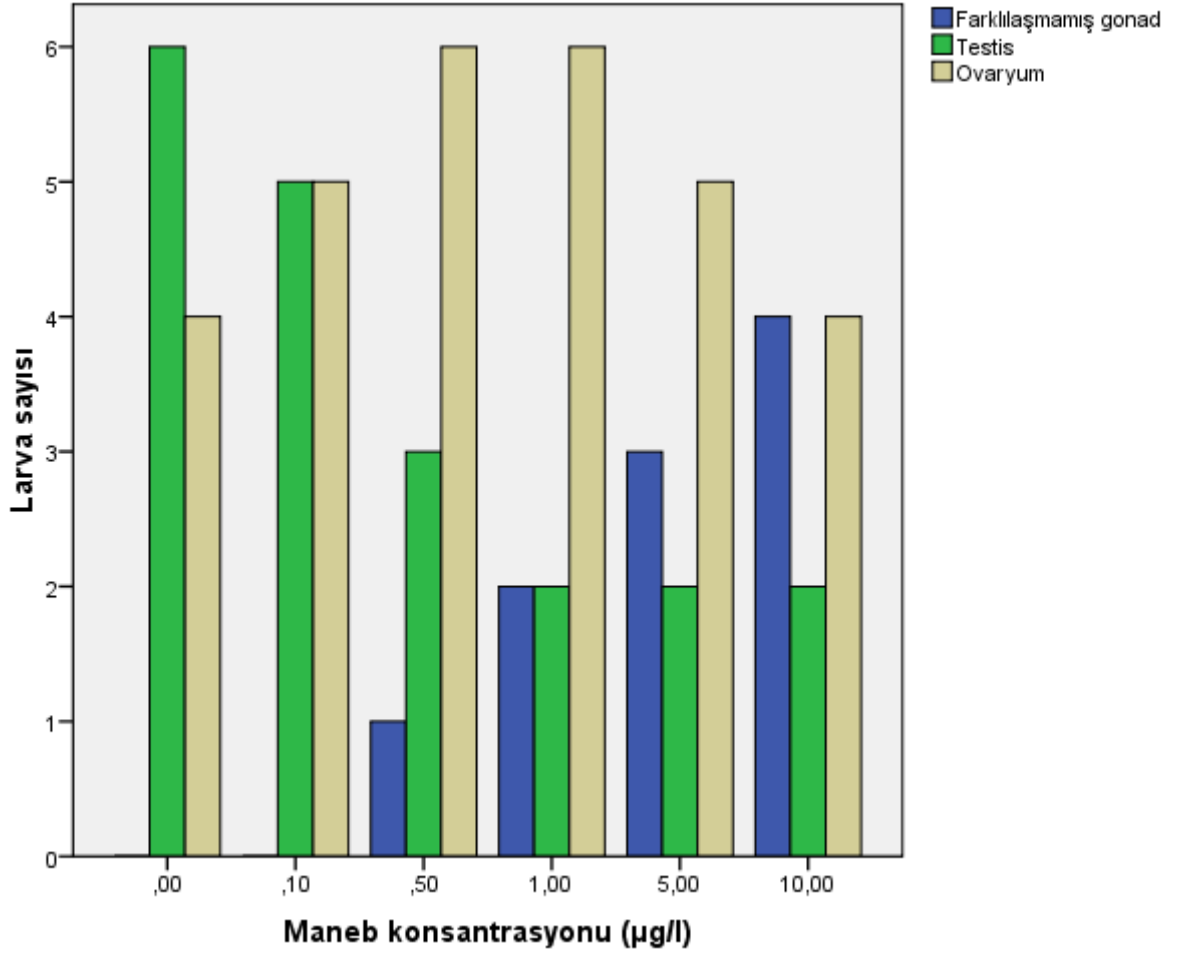
Şekil 4.3.1.8. Kontrol grubu 46. evre *Bufo bufo* larvasında mezonefroz böbrek ve ovaryum, (PAS).

46. somatik yaşındaki *Bufo bufo* larvalarında kontrol ve maneb uygulamasına bağlı olarak, farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimlerine ait gruplardaki larva sayıları Şekil 4.3.1.9'da sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.9. 46. somatik yaşındaki *Bufo bufo* larvalarında, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

Kontrol ve maneb uygulama gruplarına dahil metamorfozunu tamamlamış olan 46. evre *Bufo bufo* larvalarında, farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimi görülen larvaların sayıları Şekil 4.3.1.10'da sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.10. Metamorfozunu tamamlamış *Bufo bufo* larvalarının, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

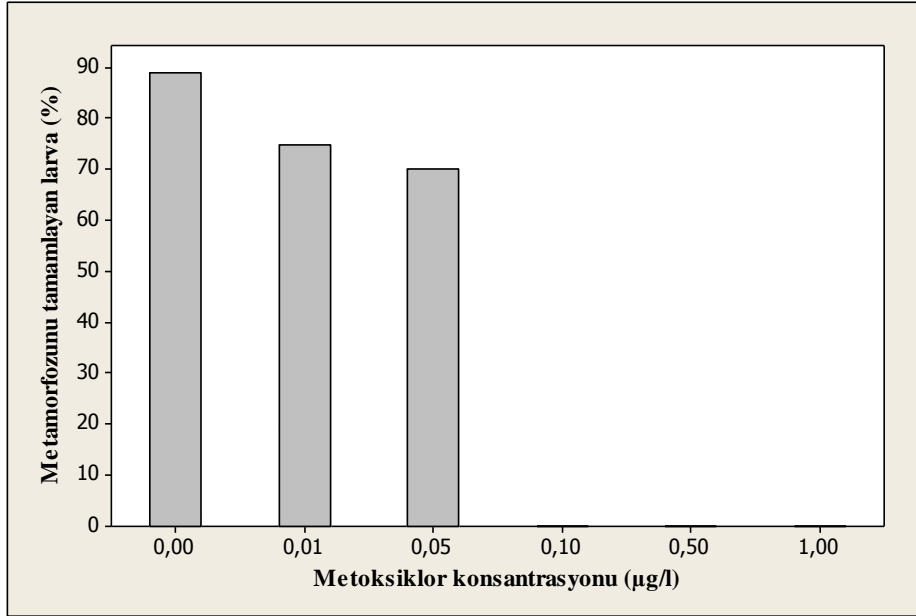
*Bufo bufo* larvalarında metoksiklor pestisitinin; 21. evreden itibaren, 35 gün süreyle kontrol grubunda metamorfozun sonlanmasına kadar uygulanması neticesinde örnekleme günlerine bağlı olarak, larvaların somatik yaşları ve gelişim evresi aralıkları Çizelge 4.3.1.2’de sunulmuştur. Her uygulama grubuna dahil 10 adet larva morfolojik açıdan incelenmiş olup, bu larvaların en ileri ve en geri gelişim evreleri aralık olarak belirtilmiştir. Kontrol grubu *Bufo bufo* larvalarının büyük çoğunluğunun (%88), 46. somatik yaşında metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Ancak metoksiklor uygulamasına bağlı olarak özellikle 0,1, 0,5 ve 1 µg/l uygulama gruplarındaki larvaların metamorfozunu tamamlama sürelerinde gecikmeler tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.1.2. *Bufo bufo* larvalarına, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki somatik yaş/gelişim evresi (n: 10)

Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner, 1960)				
0	18	25	32	39	46
	28-29	34-36	35-37	39-40	44-46
0,01	18	25	32	39	46
	26-28	31-33	32-36	35-39	41-46
0,05	18	25	32	39	46
	27-28	29-34	31-35	31-37	42-46
0,1	18	25	32	39	46
	23-26	26-31	29-36	32-39	40-43
0,5	18	25	32	39	46
	24-28	25-31	28-36	33-38	34-40
1	18	25	32	39	46
	23-27	26-30	29-37	32-39	34-42

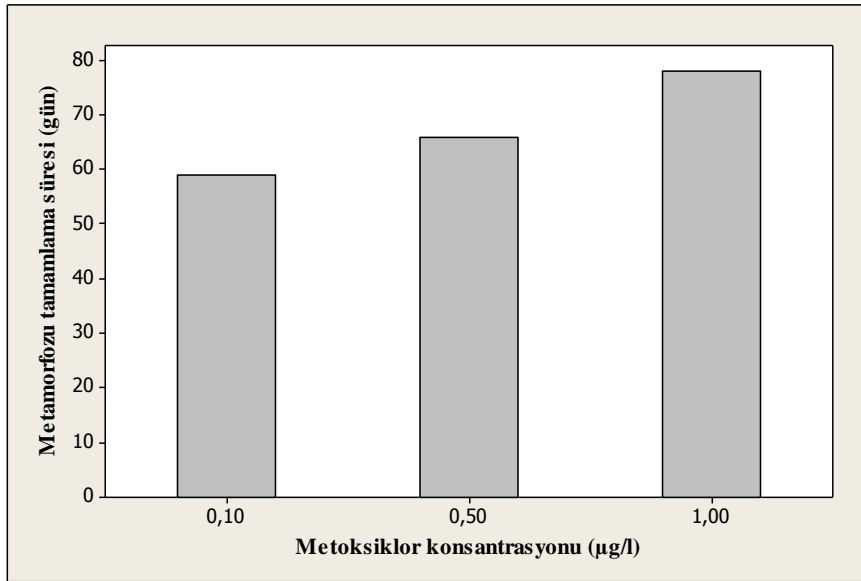
46. somatik yaşındaki, kontrol ve uygulama grubu *Bufo bufo* larvalarının, metamorfozunu tamamlayanlarının yüzdeleri Şekil 4.3.1.11’de sunulmuştur.





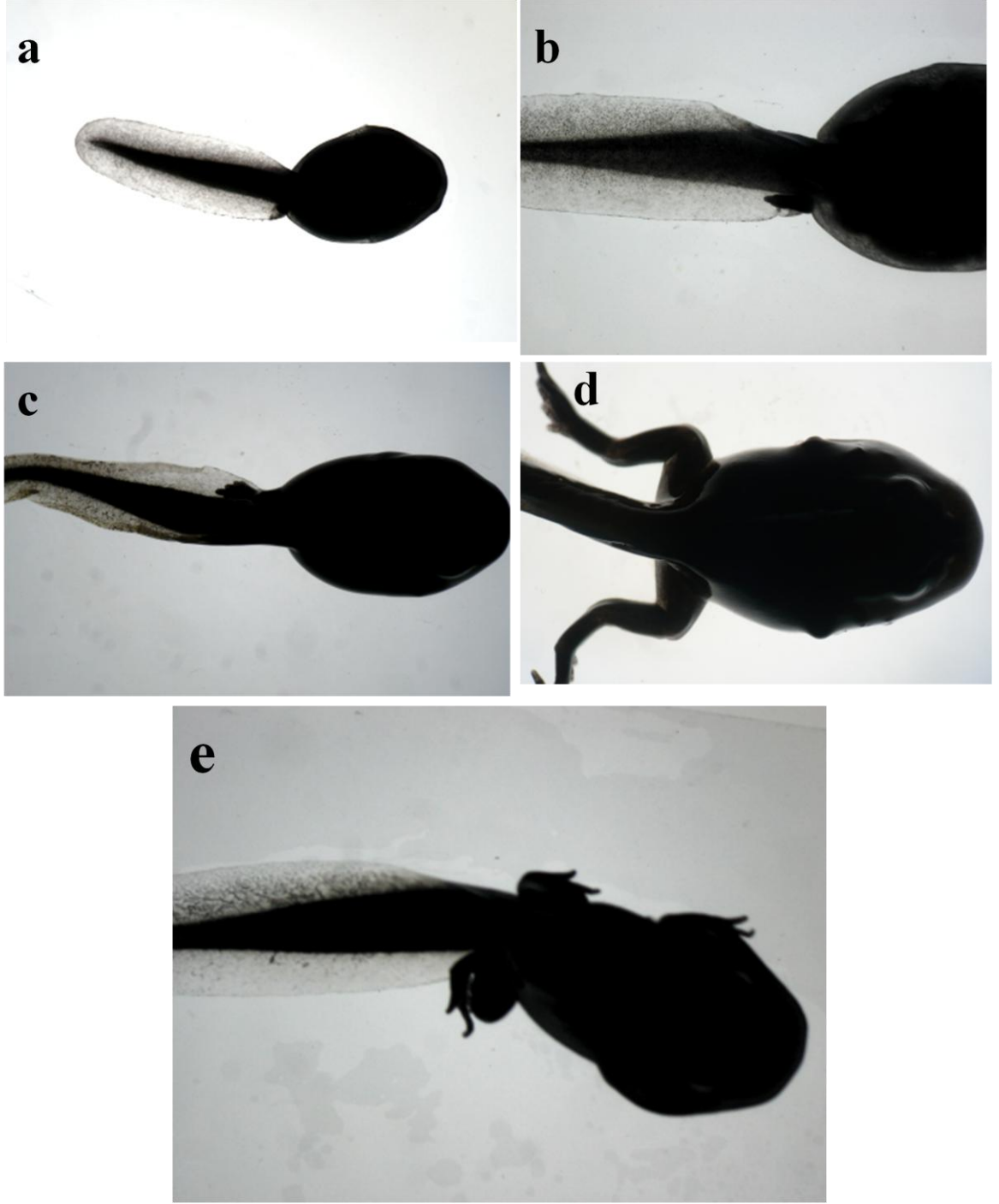
Şekil 4.3.1.11. Kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri.

0,1, 0,5 ve 1  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan larvaların % 50'sinin metamorfozunu tamamladığı somatik yaşlar Şekil 4.3.1.12'de sunulmuştur.



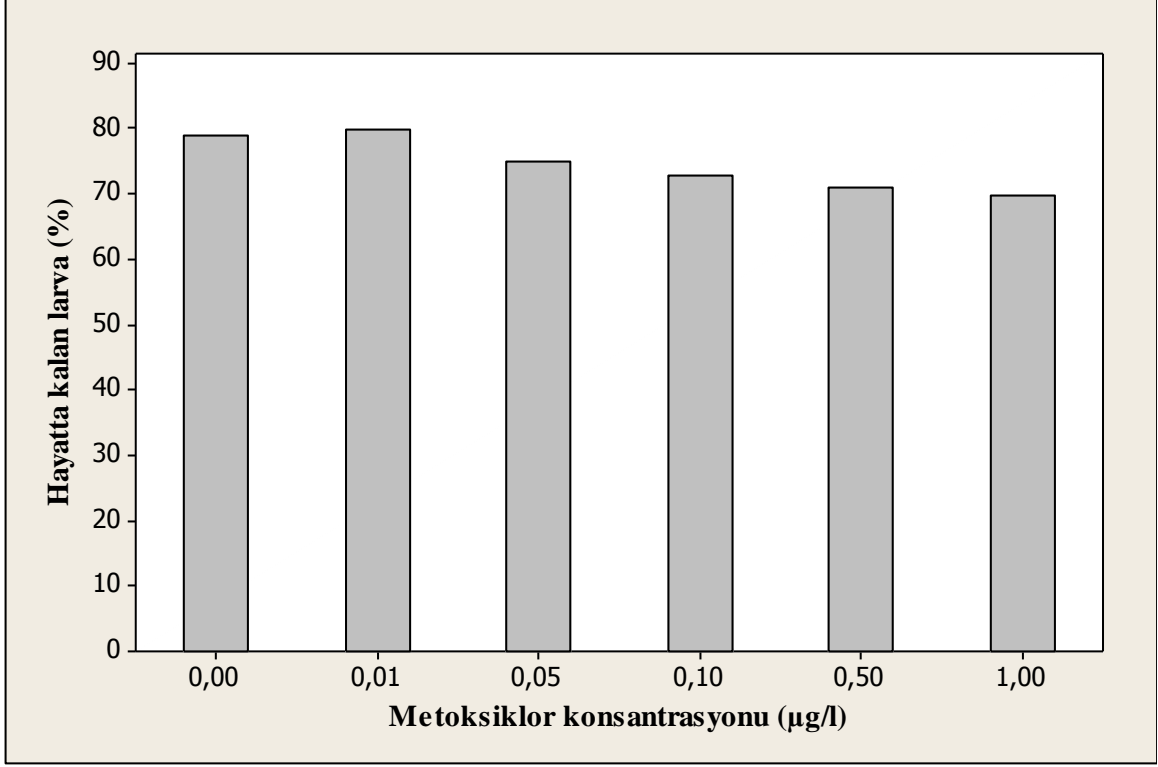
Şekil 4.3.1.12. 0,1, 0,5 ve 1  $\mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvalarında, somatik yaş, metamorfoz süresi ilişkisi.

*Bufo bufo* larvalarının, 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların 18, 25, 32, 39 ve 46. somatik yaşlarında en ileri gelişim evrelerinde olanlar Şekil 4.3.1.13'de sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.13. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 18. somatik yaş / 27. evre, b. 25. somatik yaş / 30. evre, c. 32. somatik yaş / 37. evre, d. 39. somatik yaş / 39. evre, e. 46. somatik yaş / 42. evre.

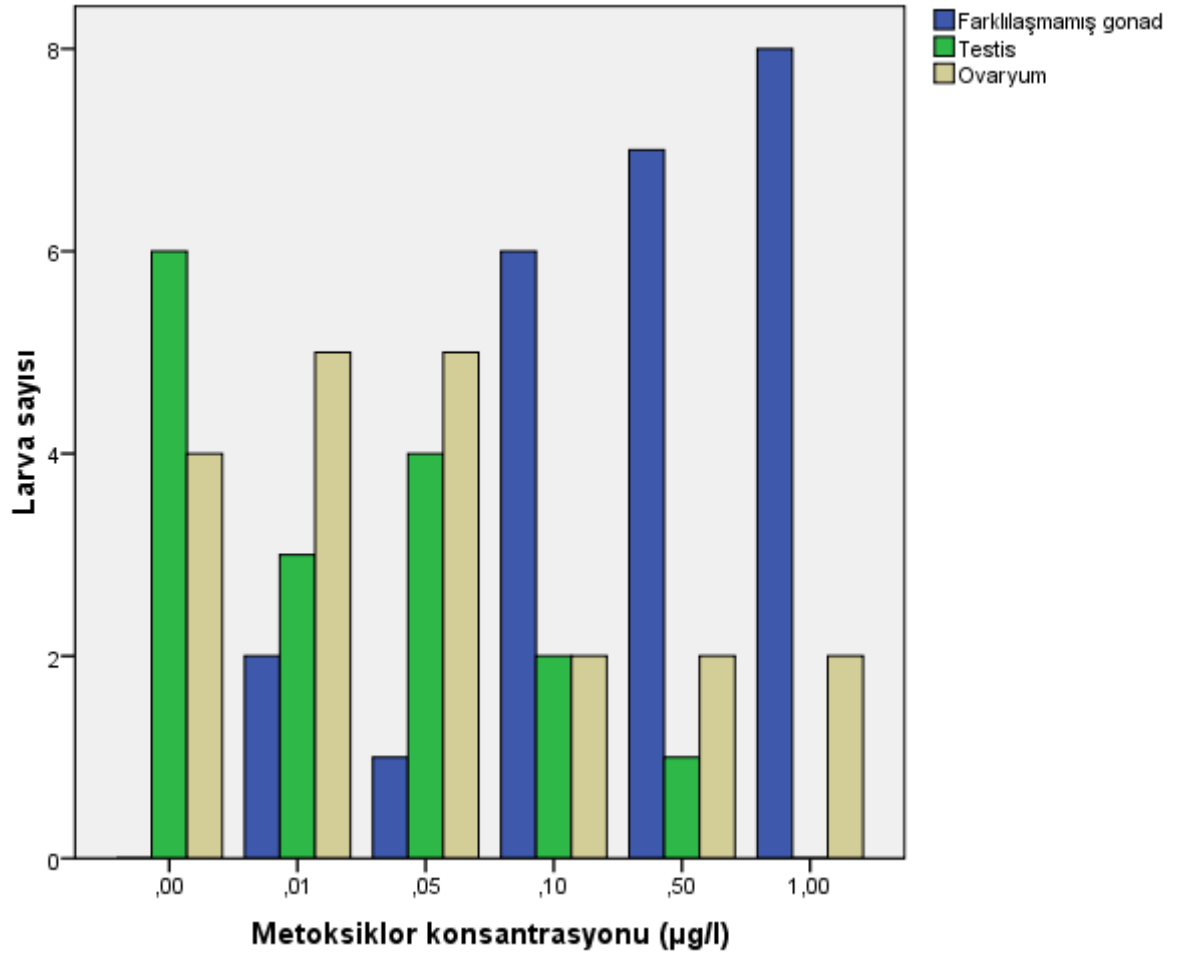
*Bufo bufo* larvalarının, 46. somatik yaşındaki, kontrol ve metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvaların hayatta kalma yüzdeleri Şekil 4.3.1.14’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.14. *Bufo bufo* larvalarının 46. somatik yaşında metoksiklor uygulamasına bağlı olarak hayatta kalan larva yüzdeleri (n: 60).

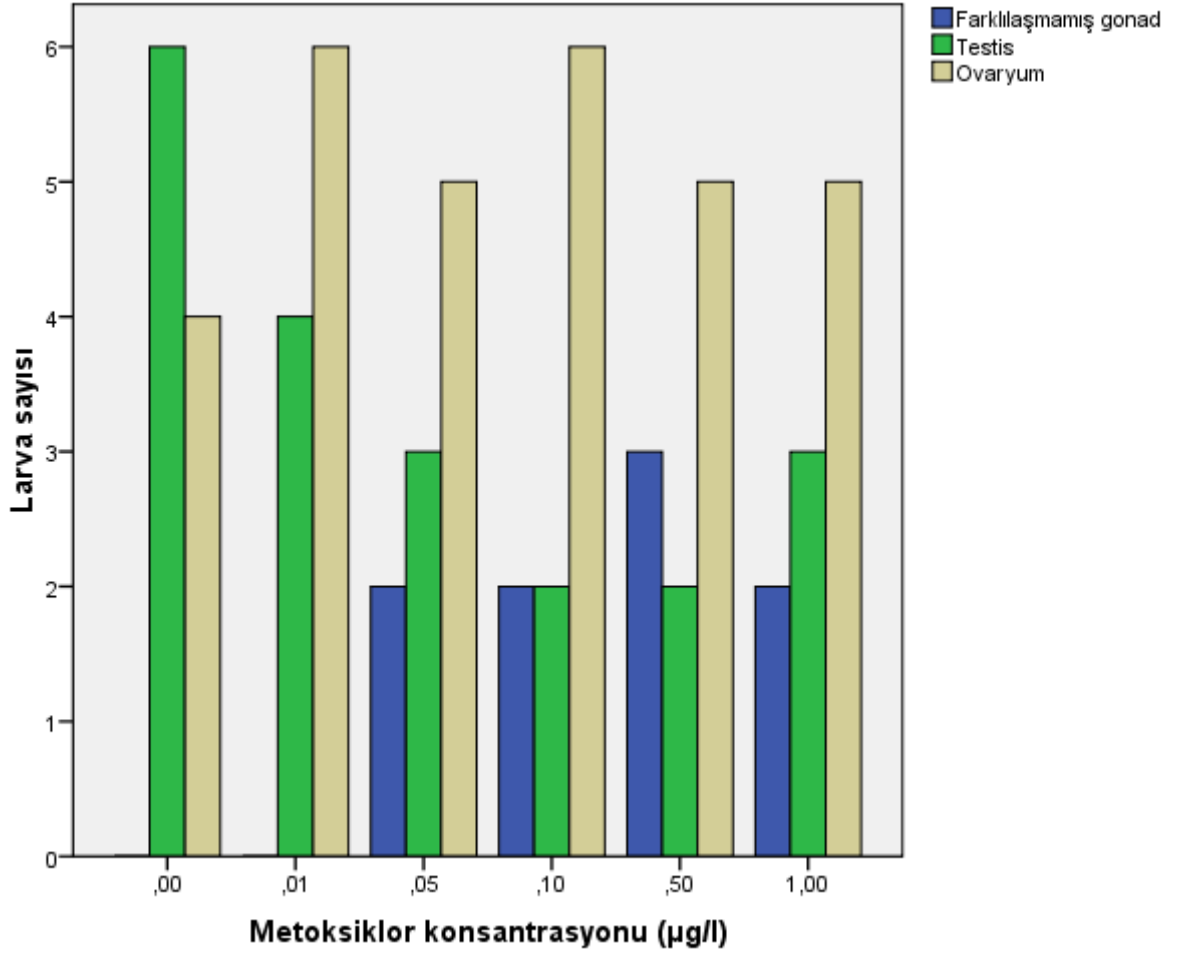
Kontrol ve metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda, pestisit maruziyetine bağlı olarak herhangi bir morfolojik ve histopatolojik anomali gözlenmemiştir.

46. somatik yaşındaki *Bufo bufo* larvalarında kontrol ve metoksiklor uygulamasına bağlı olarak, farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimlerine ait gruplardaki larva sayıları Şekil 4.3.1.15’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.15. 46. somatik yaşındaki *Bufo bufo* larvalarında, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

Kontrol ve maneb uygulama gruplarına dahil metamorfozunu tamamlamış olan 46. evre *Bufo bufo* larvalarında farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimi görülen larvaların sayıları Şekil 4.3.1.16’da sunulmuştur.



Şekil 4.3.1.16. Metamorfozunu tamamlamış *Bufo bufo* larvalarının, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

#### 4.3.2. *Bufo viridis* larvalarında kronik toksisite denemelerine ait araştırma bulguları

*Bufo viridis* larvalarında, maneb pestisitinin; 21. evreden itibaren, 74 gün süreyle kontrol grubunda metamorfozun sonlanmasına kadar uygulanması neticesinde örnekleme günlerine bağlı olarak, larvaların 16.-48. somatik yaşları arasındaki gelişim evresi aralıkları Çizelge 4.3.2.1’de, 58.-83. somatik yaşları arasındaki gelişim evresi aralıkları ise Çizelge 4.3.2.2’de sunulmuştur. Her uygulama grubuna dahil 10’ar larva morfolojik açıdan incelenmiş olup bu larvaların, en ileri ve en geri gelişim evreleri aralık olarak belirtilmiştir. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvalarının büyük çoğunluğunun (%80), 83. somatik yaşında

metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Ancak tüm uygulama gruplarındaki larvaların metamorfozunu tamamlama sürelerinde, maneb uygulamasına bağlı olarak gecikmeler tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.2.1. *Bufo viridis* larvalarında, maneb pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 16.-48. somatik yaş / gelişim evresi (n: 10)

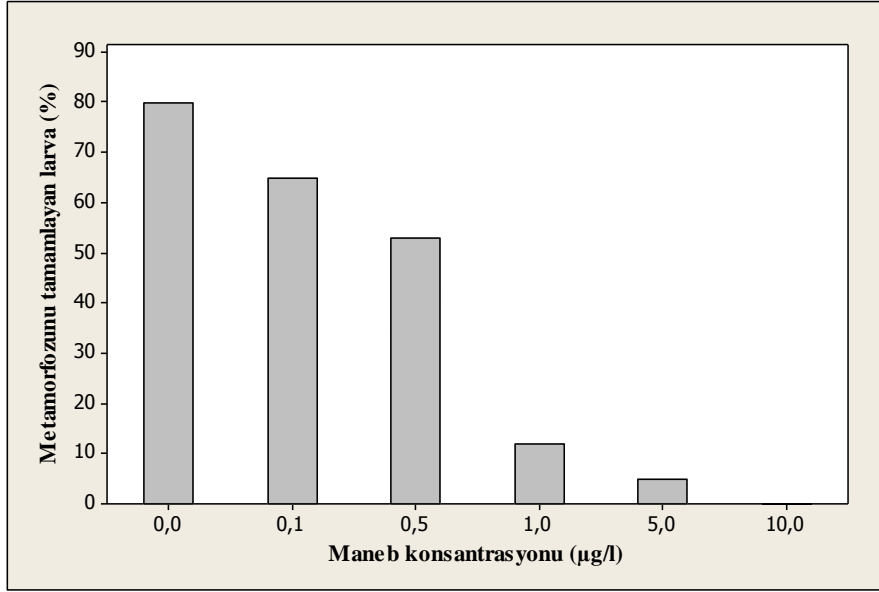
Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner, 1960)				
0	16	24	30	41	48
	25-26	26-28	29-30	30-31	31-33
0,1	16	24	30	41	48
	25-26	26-29	26-32	28-33	30-34
0,5	16	24	30	41	48
	24-26	24-27	25-29	28-29	28-31
1	16	24	30	41	48
	22-26	23-29	23-30	25-31	26-31
5	16	24	30	41	48
	22-25	23-27	24-30	27-32	29-33
10	16	24	30	41	48
	23-26	23-27	24-29	25-30	27-31

Çizelge 4.3.2.2. *Bufo viridis* larvalarında, maneb pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 58.-83. somatik yaş / gelişim evresi (n: 10)

Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner, 1960)				
0	58	64	72	77	83
	35-39	38-41	39-42	39-43	43-46
0,1	58	64	72	77	83
	32-38	35-40	36-41	36-42	42-46
0,5	58	64	72	77	83
	30-36	33-38	35-40	35-41	38-46
1	58	64	72	77	83
	28-34	30-36	32-40	33-43	40-46
5	58	64	72	77	83
	30-35	30-37	32-37	34-42	35-46
10	58	64	72	77	83
	29-33	31-37	33-39	35-40	36-41

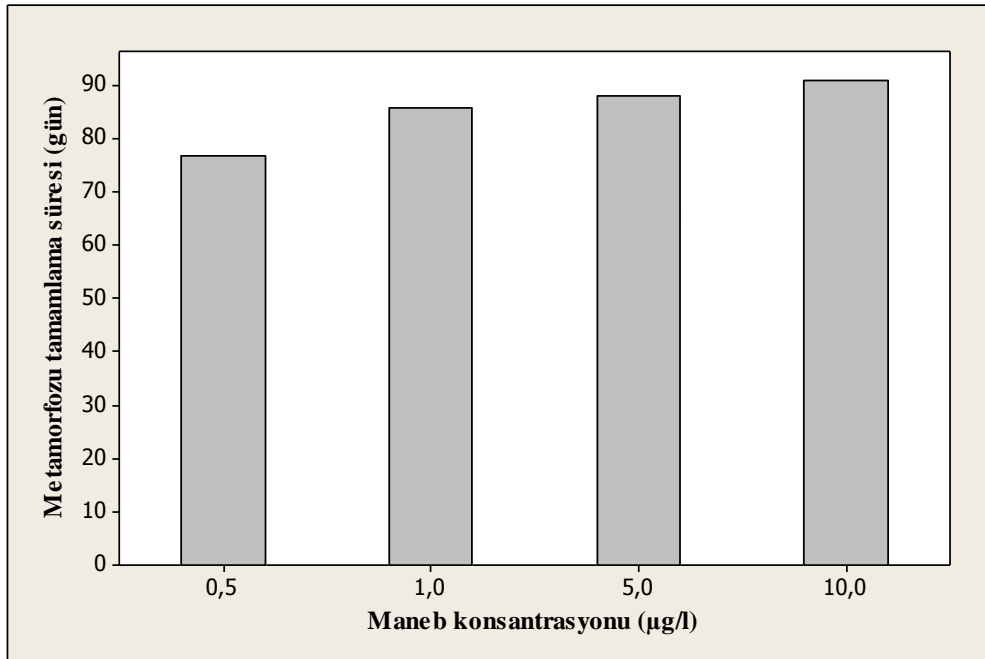
*Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında, kontrol ve uygulama grubu larvaların metamorfozunu tamamlayanlarının yüzdeleri Şekil 4.3.2.1’de sunulmuştur.





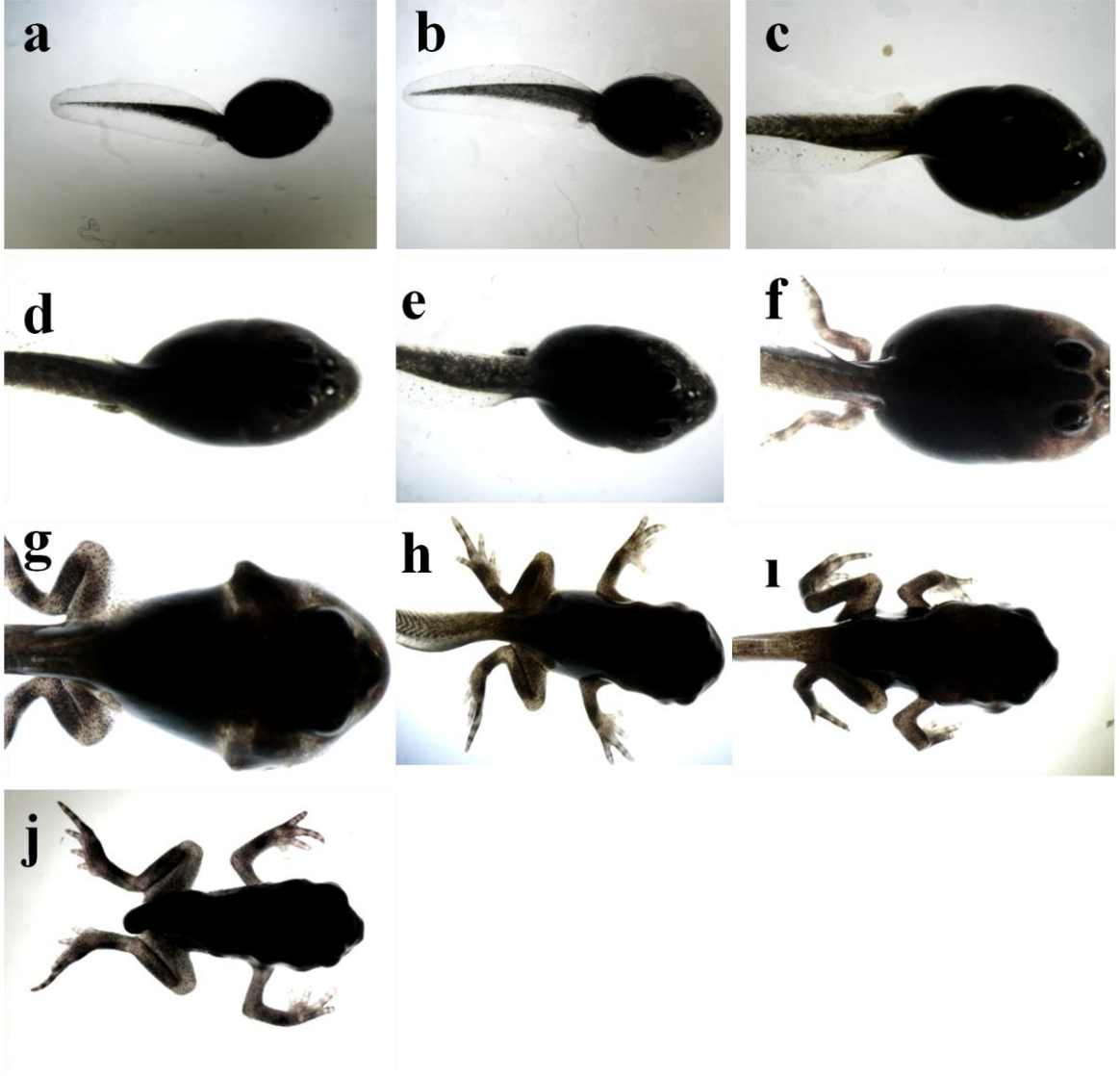
Şekil 4.3.2.1. 83. somatik yaşındaki kontrol ve maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri.

0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların % 50'sinin metamorfozunu tamamladığı somatik yaşlar Şekil 4.3.2.2'de sunulmuştur.

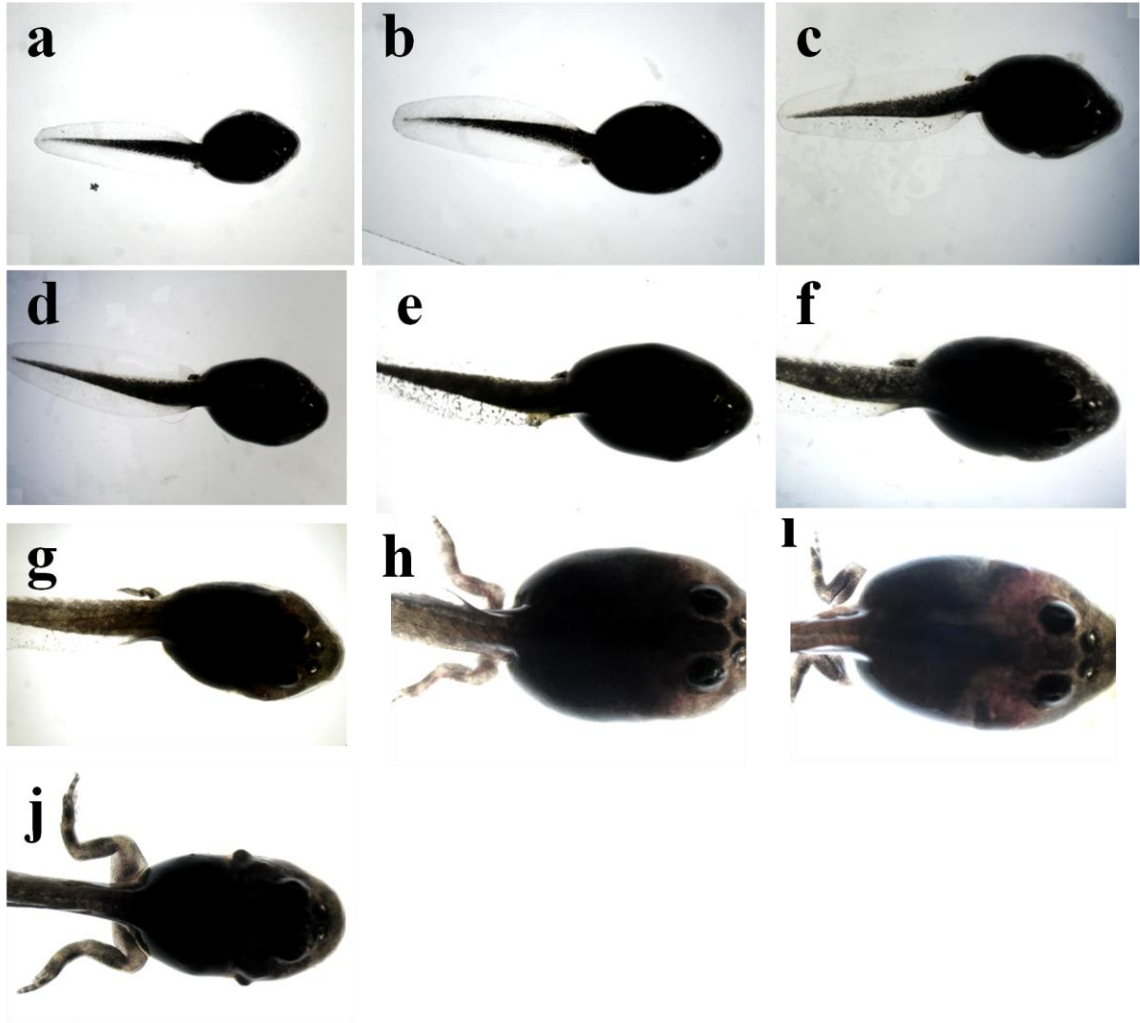


Şekil 4.3.2.2. 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında, uygulama konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi.

*Bufo viridis* larvalarında, kontrol ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvaların 16, 24, 30, 41, 48, 58, 64, 72, 77 ve 83. somatik yaşlarındaki en ileri gelişim evresinde olanlar Şekil 4.3.2.3 ve Şekil 4.3.2.4’de sunulmuştur.

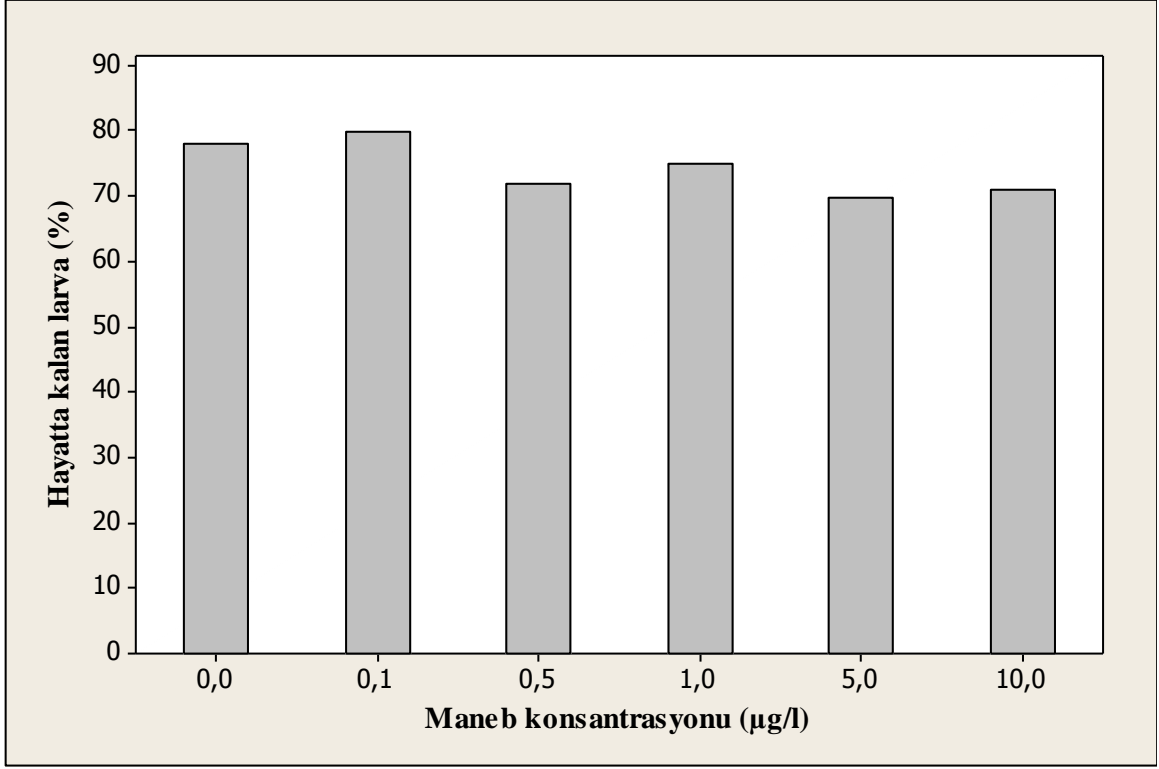


Şekil 4.3.2.3. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 16. somatik yaş / 26. evre, b. 24. somatik yaş / 28. evre, c. 30. somatik yaş / 30. evre, d. 41. somatik yaş / 31. evre, e. 48. somatik yaş / 33. evre, f. 58. somatik yaş / 39. evre, g. 64. somatik yaş / 41. evre, h. 72. somatik yaş / 42. evre, ı. 77. somatik yaş / 43. evre, j. 83. somatik yaş / 46. evre.



Şekil 4.3.2.4. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 16. somatik yaş / 26. evre, b. 24. somatik yaş / 27. evre, c. 30. somatik yaş / 29. evre, d. 41. somatik yaş / 30. evre, e. 48. somatik yaş / 31. evre, f. 58. somatik yaş / 33. evre, g. 64. somatik yaş / 37. evre, h. 72. somatik yaş / 39. evre, ı. 77. somatik yaş / 40. evre, j. 83. somatik yaş / 41. evre.

*Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında, kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvaların hayatta kalma yüzdeleri Şekil 4.3.2.5’de sunulmuştur.



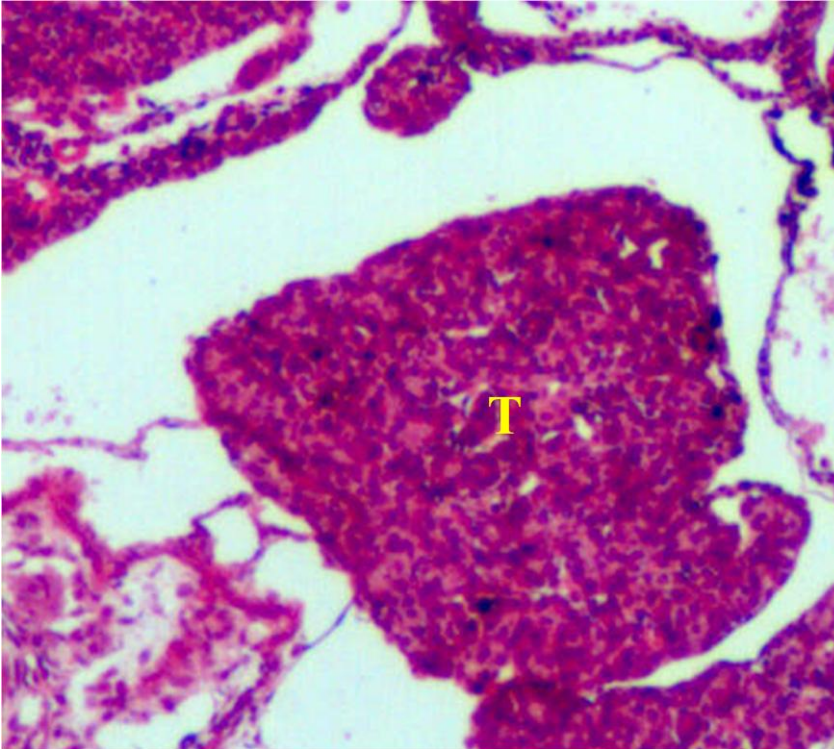
Şekil 4.3.2.5. *Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında maneb uygulamasına bağlı olarak hayatta kalma yüzdeleri (n: 60).

Kontrol ve maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda, pestisit maruziyetine bağlı olarak herhangi bir morfolojik anomali gözlenmemiştir.

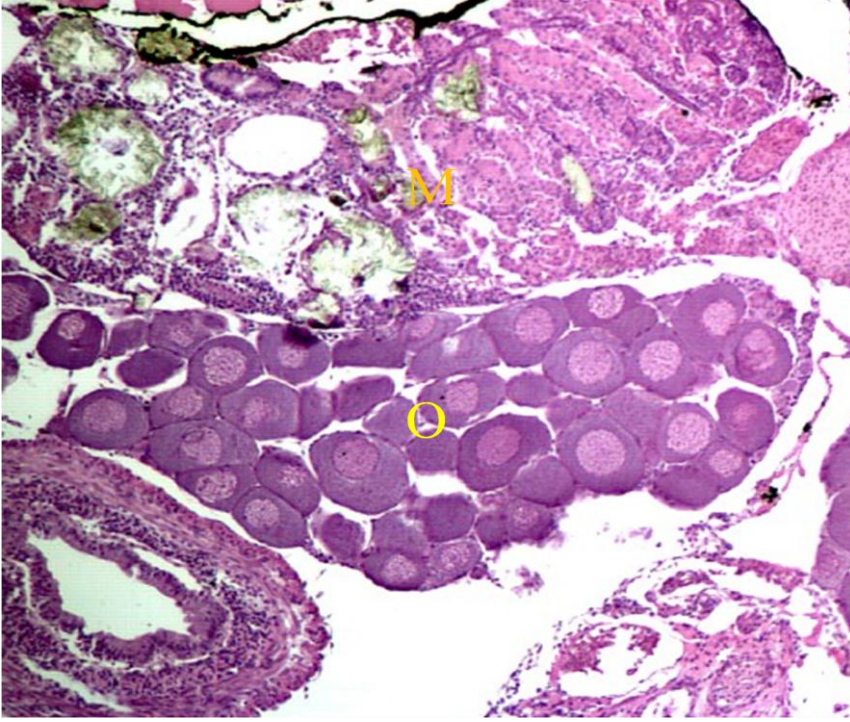
Histolojik kesitlerde, 39. evre kontrol grubu *Bufo viridis* larvalarında farklılaşmamış gonad taslağı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.2.6). Aynı gruba dahil larvaların 46. evrelerinde mezonefroz böbrek, testis ve ovaryum ayrımının yapılabildiği gözlenmiştir (Şekil 4.3.2.7 ve Şekil 4.3.2.8). Uygulama grubu larvaların, mezonefroz böbrek ve gonadlarından geçen kesitlerde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır.



Şekil 4.3.2.6. Kontrol grubu 39. evre *Bufo viridis* larvasında pronefrik tübüller ve farklılaşmamış gonad taslağı, (H&E).

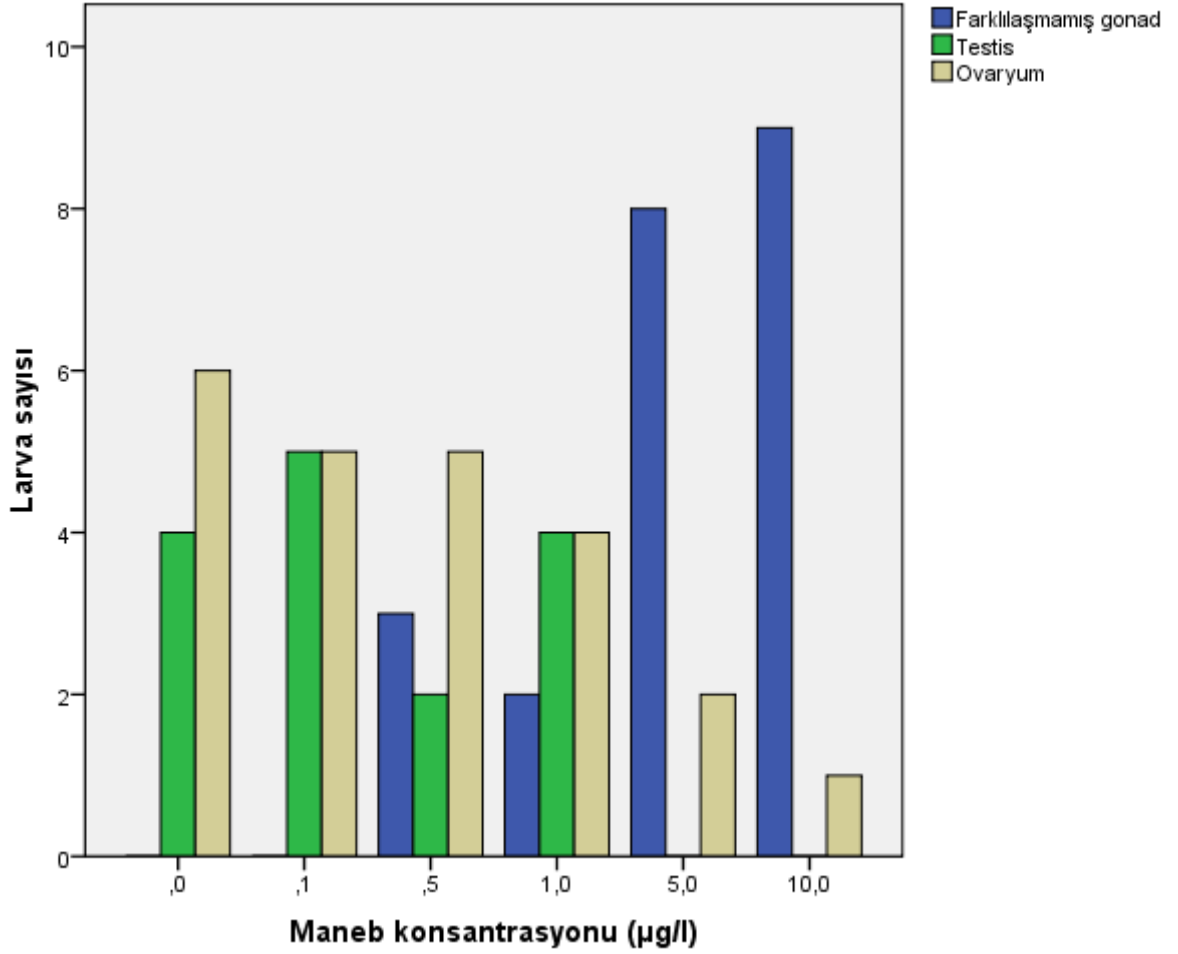


Şekil 4.3.2.7. Kontrol grubu 46. evre *Bufo viridis* larvasında testis, (PAS).



Şekil 4.3.2.8. Kontrol grubu 46. evre *Bufo viridis* larvasında mezonefroz böbrek ve ovaryum, (PAS).

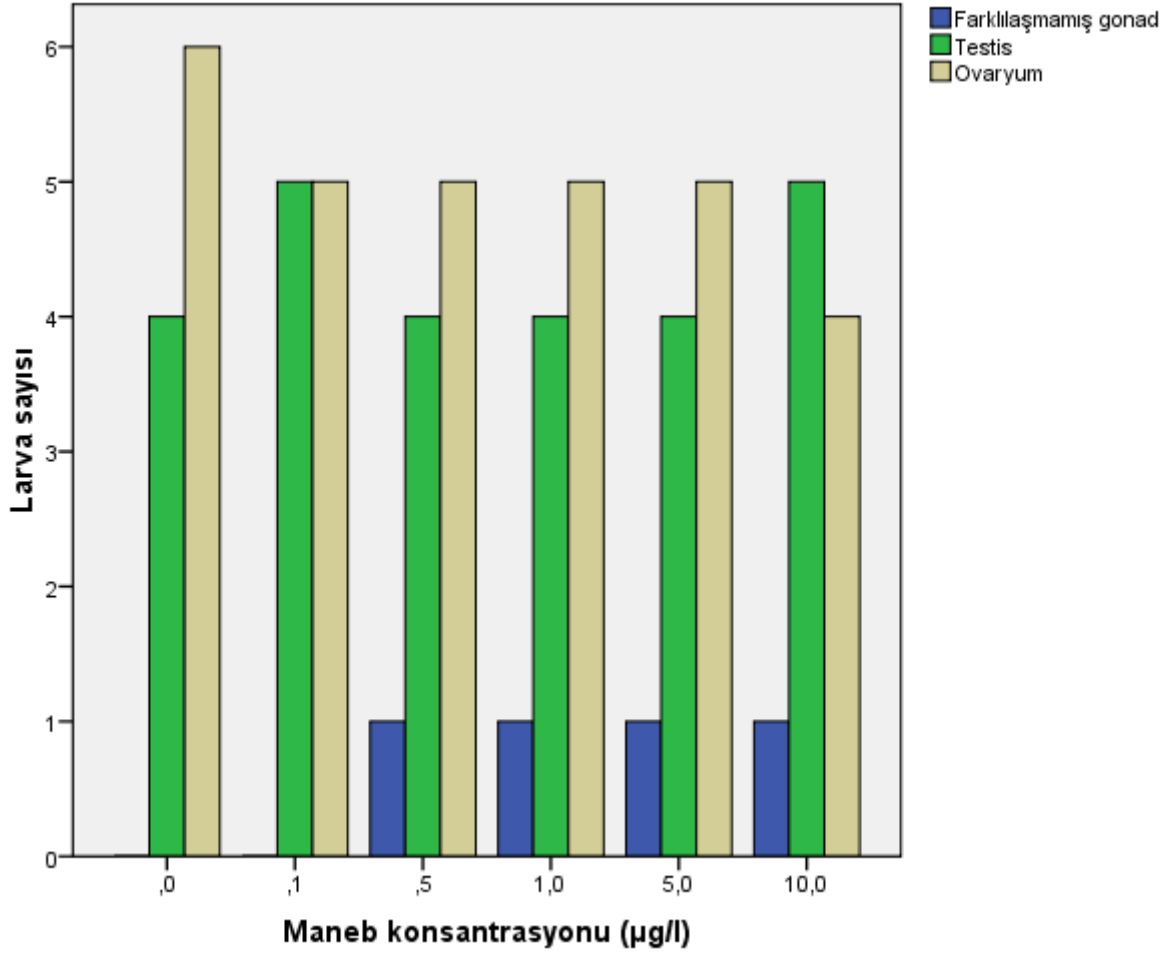
83. somatik yaşındaki *Bufo viridis* larvalarında, kontrol ve maneb uygulamasına bağlı olarak; farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimlerine ait gruplardaki larva sayıları Şekil 4.3.2.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.3.2.9. 83. somatik yaşındaki *Bufo viridis* larvalarında, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

Kontrol ve maneb uygulama gruplarına dahil metamorfozunu tamamlamış olan 46. evre *Bufo viridis* larvalarında farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimi görülen larvaların sayıları Şekil 4.3.2.10'da sunulmuştur.





Şekil 4.3.2.10. Metamorfozunu tamamlamış *Bufo viridis* larvalarının, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

*Bufo viridis* larvalarında, metoksiklor pestisitinin; 21. evreden itibaren, 74 gün süreyle kontrol grubunda metamorfozun sonlanmasına kadar uygulanması neticesinde örnekleme günlerine bağlı olarak, larvaların 16.-48. somatik yaşları arasındaki gelişim evresi aralıkları Çizelge 4.3.2.3’de, 58.-83. somatik yaşları arasındaki gelişim evresi aralıkları ise Çizelge 4.3.2.4’de sunulmuştur. Her uygulama grubuna dahil 10’ar larva morfolojik açıdan incelenmiş olup bu larvaların, en ileri ve en geri gelişim evreleri aralık olarak belirtilmiştir. Kontrol grubu *Bufo viridis* larvalarının büyük çoğunluğunun (%80), 83. somatik yaşında metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Ancak metoksiklor uygulamasına bağlı olarak tüm uygulama gruplarındaki larvaların metamorfozunu

tamamlama sürelerinde gecikmeler tespit edilmiştir.

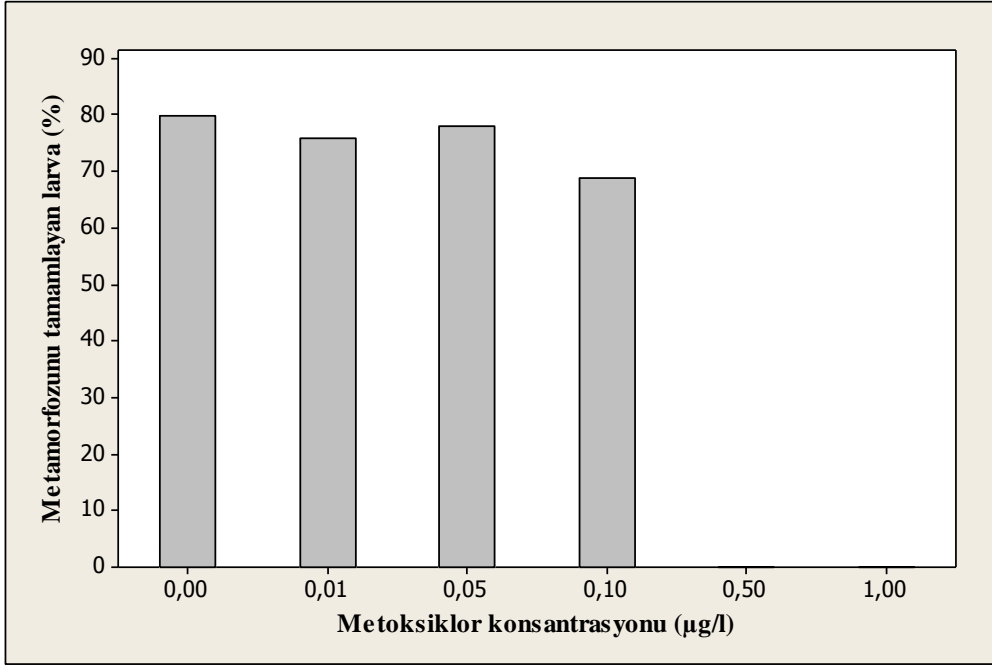
Çizelge 4.3.2.3. *Bufo viridis* larvalarında, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 16.-48. somatik yaş / gelişim evresi (n: 10)

Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner, 1960)				
0	16 25-26	24 26-28	30 29-30	41 30-31	48 31-33
0,01	16 24-25	24 25-28	30 28-32	41 29-32	48 29-33
0,05	16 23-26	24 24-29	30 27-30	41 29-30	48 31-32
0,1	16 23-26	24 23-28	30 24-30	41 28-31	48 29-32
0,5	16 23-24	24 24-27	30 26-30	41 28-30	48 28-31
1	16 23-26	24 23-27	30 24-29	41 26-30	48 28-31

Çizelge 4.3.2.4. *Bufo viridis* larvalarında, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 58.-83. somatik yaş / gelişim evresi (n: 10)

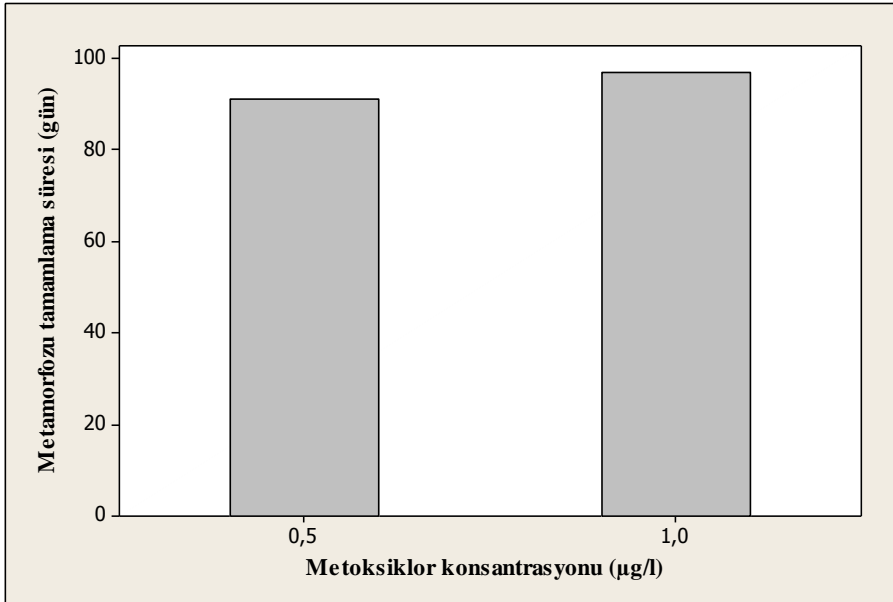
Uygulama Dozları (µg/l)	Somatik Yaş (gün) / Gelişim Evresi (Gosner, 1960)				
0	58	64	72	77	83
	35-39	38-41	39-42	39-43	43-46
0,01	58	64	72	77	83
	31-36	34-38	36-40	38-42	41-46
0,05	58	64	72	77	83
	33-35	36-38	36-39	38-43	41-46
0,1	58	64	72	77	83
	30-32	32-35	32-37	35-40	35-46
0,5	58	64	72	77	83
	28-34	30-36	30-38	32-40	34-41
1	58	64	72	77	83
	28-32	30-34	31-36	33-37	35-39

*Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında, kontrol ve uygulama grubu larvaların metamorfozunu tamamlayanlarının yüzdeleri Şekil 4.3.2.11’de sunulmuştur.



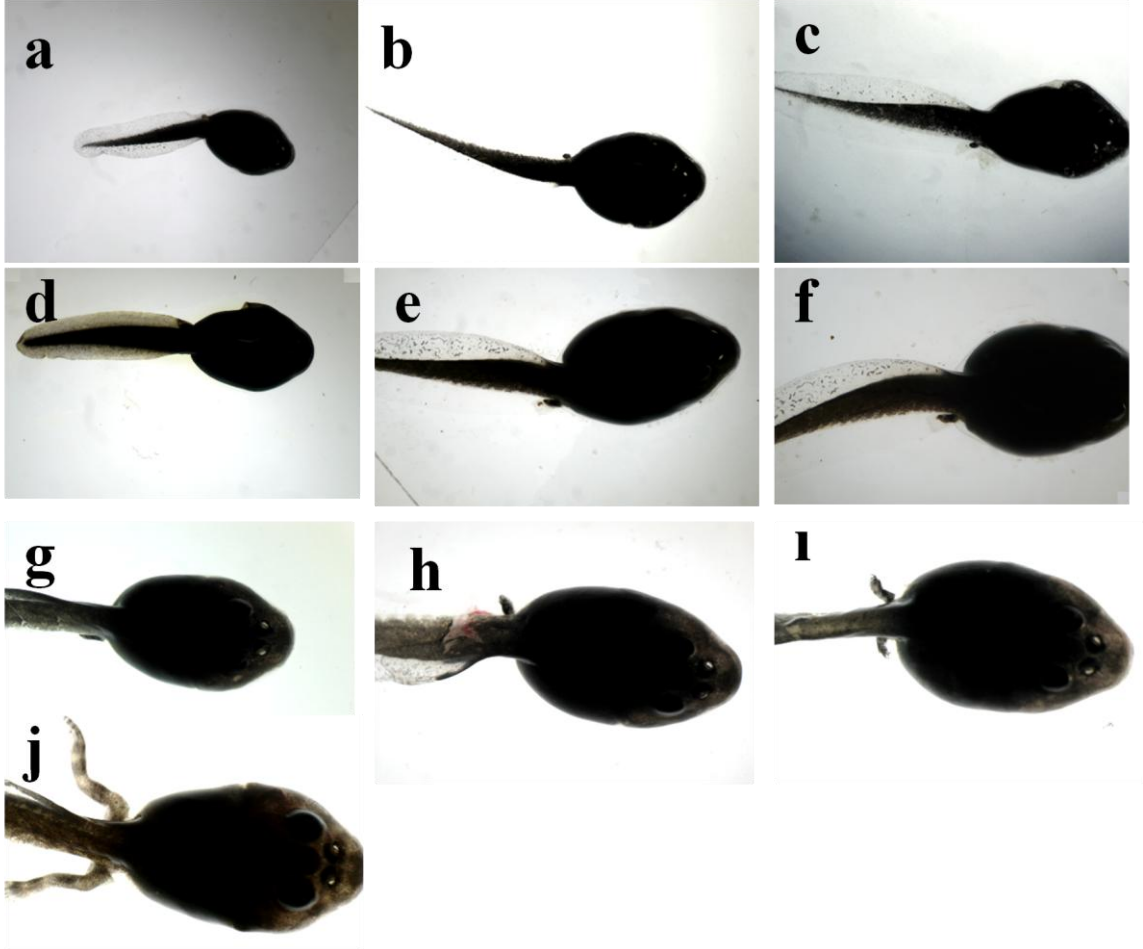
Şekil 4.3.2.11. 83. somatik yaşındaki kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri.

0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların % 50'sinin metamorfozunu tamamladığı somatik yaşlar Şekil 4.3.2.12'de sunulmuştur.



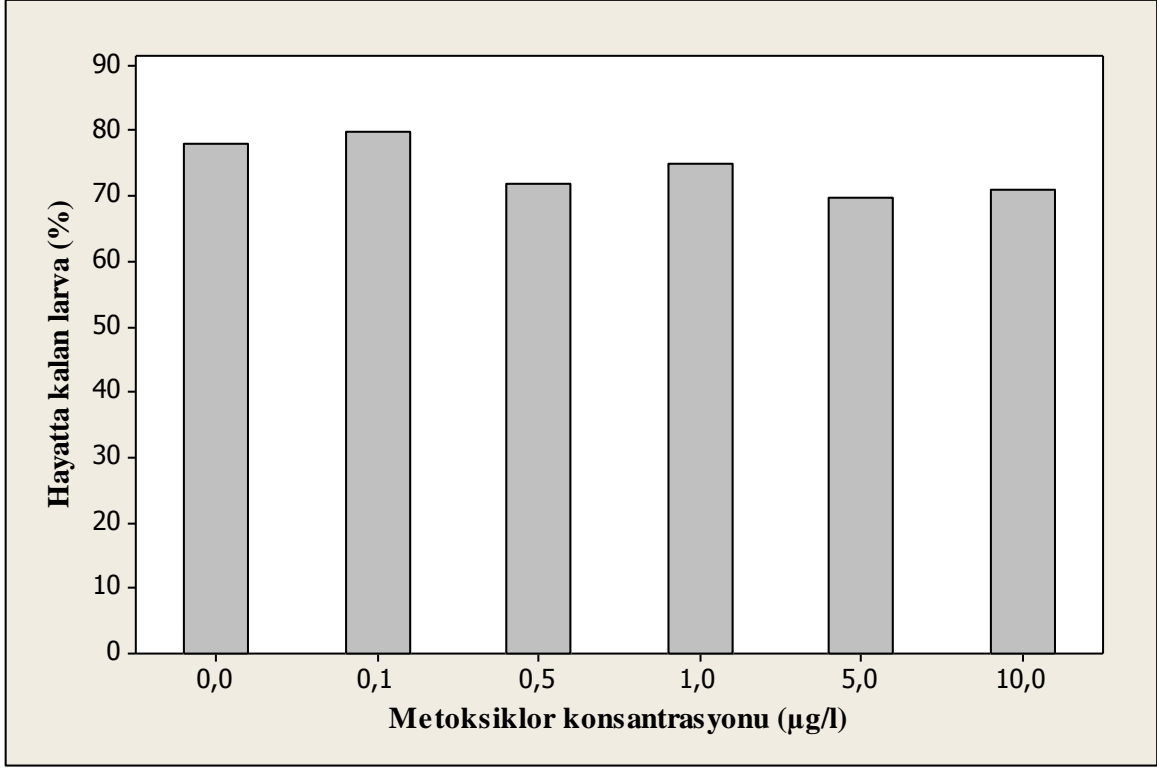
Şekil 4.3.2.12. 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvalarında, uygulama konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi.

*Bufo viridis* larvalarında, 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların 16, 24, 30, 41, 48, 58, 64, 72, 77 ve 83. somatik yaşlarındaki en ileri gelişim evresinde olanlar Şekil 4.3.2.13’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.2.13. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo viridis* larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları. a. 16. somatik yaş / 26. evre, b. 24. somatik yaş / 27. evre, c. 30. somatik yaş / 29. evre, d. 41. somatik yaş / 30. evre, e. 48. somatik yaş / 31. evre, f. 58. somatik yaş / 32. evre, g. 64. somatik yaş / 34. evre, h. 72. somatik yaş / 36. evre, i. 77. somatik yaş / 37. evre, j. 83. somatik yaş / 39. evre.

*Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında, kontrol ve metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvaların hayatta kalma yüzdeleri Şekil 4.3.2.14’de sunulmuştur.

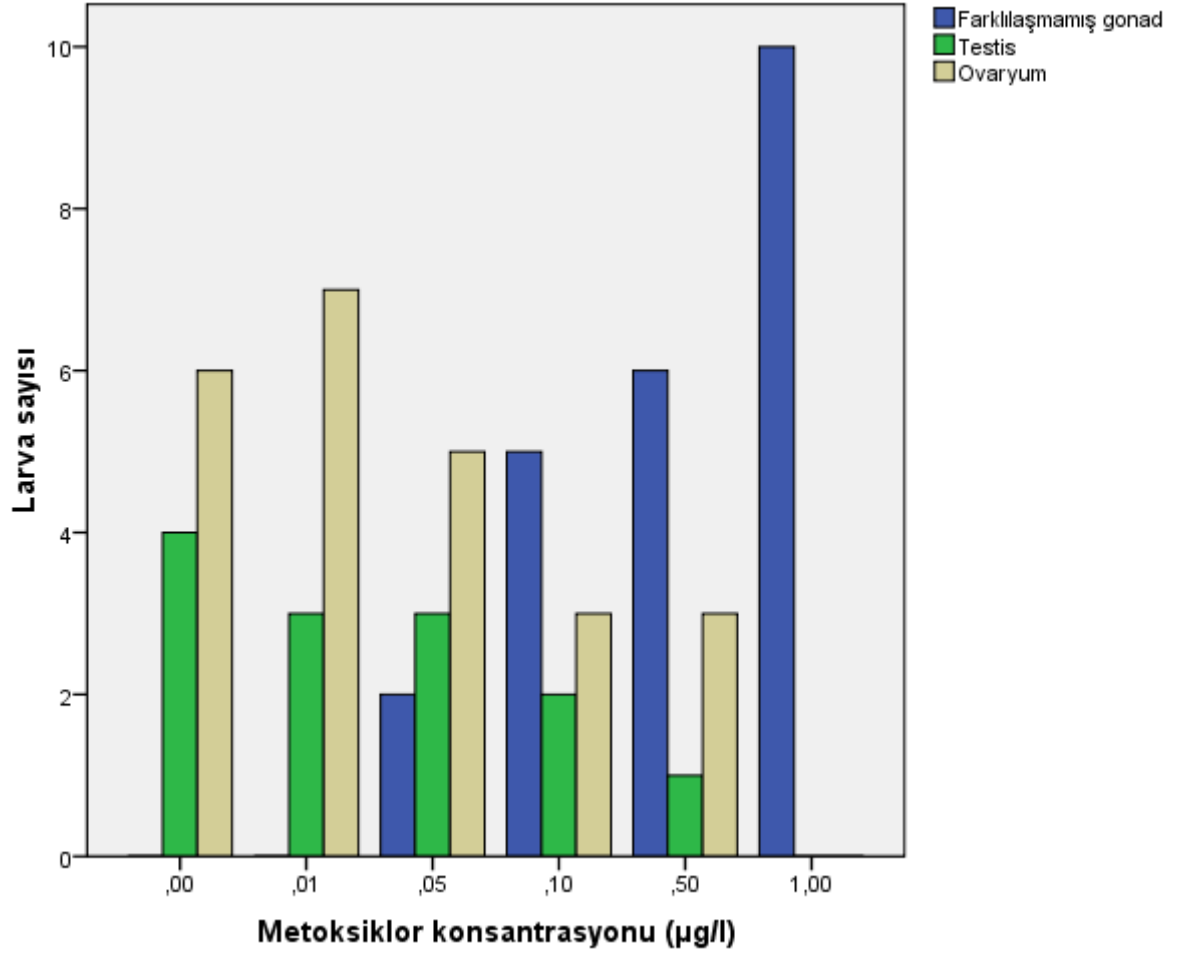


Şekil 4.3.2.14. *Bufo viridis* larvalarının 83. somatik yaşında metoksiklor uygulamasına bağlı olarak hayatta kalma yüzdeleri (n: 60).

Kontrol ve metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda, pestisit maruziyetine bağlı olarak herhangi bir morfolojik anomali gözlenmemiştir.

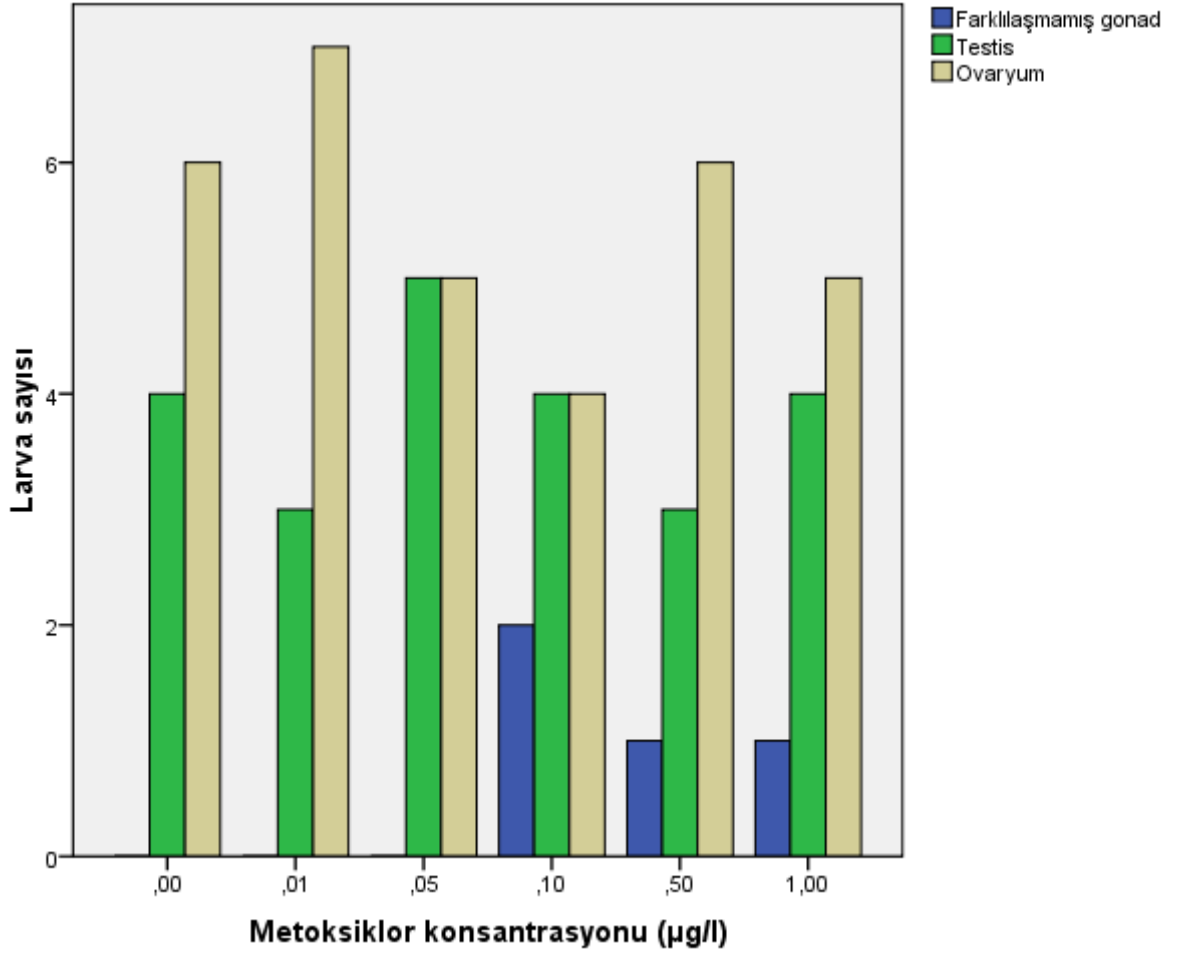
Kontrol ve metoksiklor uygulama grubu larvaların mezonefroz böbrek ve gonadlarından geçen kesitlerde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır.

83. somatik yaşındaki *Bufo viridis* larvalarında kontrol ve metoksiklor uygulamasına bağlı olarak, farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimlerine ait gruplardaki larva sayıları Şekil 4.3.2.15’de sunulmuştur.



Şekil 4.3.2.15. 83. somatik yaşındaki *Bufo viridis* larvalarında, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

Kontrol ve maneb uygulama gruplarına dahil metamorfozunu tamamlamış olan 46. evre *Bufo viridis* larvalarında; farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişimi görülen larvaların sayıları Şekil 4.3.2.16’da sunulmuştur.



Şekil 4.3.2.16. Metamorfozunu tamamlamış *Bufo viridis* larvalarının, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları (n: 10).

#### 4.4. Tartışma

##### 4.4.1. Larvaların elde edilmesine ait tartışma

Yılmaz (1984), Trakya’da dağılış gösteren *Bufo bufo* örnekleri için üreme mevsiminin, Mart ortasından Nisan ayı sonuna kadar sürdüğünü, *Bufo viridis* örnekleri için ise Mart ayının ortasında başladığını bildirmiş ancak her iki tür için üreme zamanının mevsim şartlarına göre çok değişiklik gösterebildiğini belirtmiştir. Çalışmamızda, amplexus halindeki *Bufo bufo* örnekleri 19.02.2010 tarihinde, *Bufo viridis* örnekleri ise 15.02.2010 tarihinde toplanmıştır. Trakya bölgesi ile Çanakkale ili arasındaki mevsimsel



sıcaklık ortalaması farkları dikkate alındığında, söz konusu türler için Çanakkale’de üreme mevsiminin erken başlaması beklenen bir sonuçtur. Örneklerin toplandığı tarihlerdeki hava sıcaklığı ve su sıcaklığının birbirine yakın değerlerde olması amfibiler için üreme mevsiminin başlamasında, mevsimsel koşulların son derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, doğadan toplanan *Bufo viridis* örneklerinde, laboratuvar koşulları altındaki amplexus süresi en fazla 2 gün sürmüştür, ardından döllenmiş yumurtalar elde edilmiştir. *Bufo bufo* örneklerinden ise 8 gün süren amplexus davranışının ardından döllenmiş yumurtalar elde edilmiştir. Özeti ve Yılmaz (1994), *Bufo bufo* örneklerinde amplexus süresinin, *Bufo viridis* örneklerine göre daha uzun sürebildiğini hatta mevsimsel koşullara göre bu sürenin haftalarca devam edebileceğini belirtmişlerdir.

Özeti ve Yılmaz (1994), *Bufo bufo* örneklerine ait yumurta çaplarının 1,50 – 2,00 mm, *Bufo viridis* örneklerine ait yumurta çaplarının ise 1,00 – 1,50 mm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda *Bufo bufo* örneklerine ait yumurtaların çapları; 2,15 – 2,28 mm, *Bufo viridis* örneklerinin ise 1,88 – 2,01 mm arasında ölçülmüştür. Önceki çalışmada da belirtildiği üzere *Bufo bufo* yumurtalarının, *Bufo viridis* yumurtalarından çap olarak büyük olması durumu, çalışmamızdaki bulgularla uyumludur.

#### **4.4.2. Akut toksisite denemelerine ait tartışma**

##### **4.4.2.1. *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında akut toksisite denemelerine ait morfolojik tartışma**

Akut toksisite denemelerinde; 120 saat süreyle, 10-5000 µg/l doz aralığında maneb uygulamasına bağlı olarak *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında gözlenen morfolojik bulgular birbiriyle benzerlik göstermektedir. Maneb uygulamasının yapıldığı, *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında gözlenen en önemli morfolojik bulgu visseral ödemdir. Bu türlerde visseral ödemin bariz gözlemlendiği uygulama dozları 100 ve 1000 µg/l’dir. Omurgalı hayvanlarda, özellikle karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında meydana gelen bozulmalar sonucunda oluşan visseral ödemin, pestisitlerin artan uygulama dozlarında daha bariz görülmesi oldukça önemlidir. On ve 50 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda dahi düşük miktarda da olsa kuyruk deformasyonu tespit edilmiştir. Artan uygulama dozlarında ise özellikle *Bufo bufo* larvalarındaki kuyruk deformasyonları ileri

derecede gözlenmiştir. Pestisit maruziyetine bağlı olarak larvaların kuyruklarında görülen ileri derecedeki deformasyonların, canlı üzerindeki etkileri son derece önemlidir. Besin bulmak ve av olmamak için aktif yer değiştirmek zorunda olan larvalarda, kuyruk deformasyonlarına bağlı olarak meydana gelecek olan yüzme mesafesinin kısalması ve hareket kabiliyetinin kısıtlanması gibi değişiklikler, larvanın hayatta kalabilmesi üzerinde son derece etkili olduğu düşünülmektedir. Bancroft ve Prahlad (1973), *Xenopus laevis* larvalarında maneb maruziyeti sonucu, morfolojik olarak kuyruk deformasyonları ve notokord eğriliği gözlendiğini belirtmiştir. Çalışmamızda da önceki çalışmayla benzer şekilde, özellikle artan uygulama dozlarında daha bariz gözlenen kuyruk deformasyonları saptanmıştır. Ancak her iki türe ait larvalarda, pestisit maruziyetine bağlı olarak gözlenen herhangi bir notokord eğriliği saptanmamıştır. Uygulamalar sonunda hayatta kalan larvaların en ileri ve en geri gelişim evresi aralıkları dikkate alındığında; 100 ve 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvaların gelişiminde, maneb maruziyetine bağlı olarak gecikmeler gözlenmiştir. Farklı hayvan türleri üzerinde yapılan çalışmalarda maneb maruziyetinin organizma üzerinde büyüme ve gelişimi baskılayıcı etkileri olduğu belirtilmektedir (Beck, 1990; Nemec ve ark., 1993). Çalışmamızda tespit edilen pestisit maruziyetine bağlı olarak büyüme ve gelişimde gözlenen gecikmeler literatürle uyumludur.

Akut olarak, 120 saat süreyle 1-100 µg/l doz aralığında metoksiklor uygulaması yapılan *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında visseral ödem ve kuyruk deformasyonları dışında gözlenen en önemli morfolojik bulgu, omurga eğriliğidir. Özellikle 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvalarda, ileri derecede omurga eğriliği tespit edilmiştir. Erken larval gelişim evrelerinde metoksiklora maruz bırakılan *Xenopus laevis* örneklerinde gözlenen morfolojik bulguların omurga eğriliği ve iç organlar boşluğunda şişkinlik olduğu bildirilmiştir (Bevan ve ark., 2003). Çalışmamızda da metoksiklor maruziyetine bağlı olarak gözlenen, söz konusu morfolojik değişiklikler önceki çalışmayla uyumludur. Gelişimin erken evrelerinde oluşan ve pek çok omurgalı hayvanın ergin bireylerinde rastlanmayan notokorda ve somit formasyonunda, metoksiklor uygulamasına bağlı olarak meydana gelen deformasyonlar, omurga eğriliğinin meydana gelmesinde son derece etkilidir. Metoksiklorun, büyüme ve gelişimi baskıladığını bildiren pek çok çalışma mevcuttur (You ve ark., 2002; Golub ve ark., 2003; Fort ve ark., 2004b).

Elli ve 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruplara dahil *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarının gelişiminde gecikmeler görülmesi önceki çalışmalarla uyumludur.

#### **4.4.2.2. *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında akut toksisite denemelerine ait histopatolojik tartışma**

Maneb ve metoksiklor pestisitlerinin 120 saat süreyle akut uygulanması sonucu *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında benzer histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişiklikler; solungaçlarda lamellar birleşme, visseral ödem oluşumu, karaciğer nekrozu, pronefrik tübül deformasyonu, notokord defektleri ve somit formasyonunda bozulmalardır.

Çevresel kirleticilere maruz kalan sucul canlıların, solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişiklikler oldukça önemlidir. Kirletici maruziyetine bağlı olarak sucul organizmaların, solungaç lamellerinde meydana gelen birleşmelerin en önemli nedenlerinin solungaçlara daha sağlam bir yapı kazandırmak ve pestisitlerin vücut içerisine girişini engellemek olduğu belirtilmiştir (Mallat, 1985). Çalışmamızda maneb ve metoksiklor pestisitlerine maruz bırakılan larvaların solungaçlarında gözlenen lamellar birleşmelerin, benzer nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kirleticiye maruz kalan organizmalarda, histopatolojik değişikliklerin ilk gözlendiği organlar karaciğer ve böbreklerdir. Sucul organizmalarda ise ortamla doğrudan temasta olan solungaçlar en yüksek oranda tahribat görülen organlardır. Detoksifikasyonda görevli bu organlarda meydana gelen histopatolojik değişiklikler, organizmanın yaşamını doğrudan etkilemektedir. Bu organların fonksiyonlarında meydana gelebilecek değişiklikler organizmada homeostazinin sağlanmasında ve devam ettirilmesinde son derece önemlidir. Çalışmamızda larvaların karaciğerinden geçen kesitlerinde nekroz, pronefrik tübüllerinden geçen kesitlerde ise epitel hücre deformasyonlarının tespit edilmesi, söz konusu pestisitlerin bu organlar üzerinde oldukça etkili olduklarını göstermektedir. Albino fareler ve *Xenopus laevis* örnekleri üzerinde maneb ve metoksiklor pestisitlerinin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda benzer histopatolojik bulgular bildirilmiştir (Özbay ve ark., 1991; Fort ve ark., 2004b).

Tüm omurgalıların embriyonik dönemlerinde mevcut olan ve kaslar için bağlantı bölgesini oluşturan notokorda, gelişimin ilerleyen aşamalarında yerini omurgaya

birabmaktadır. Omurgalıların bilateral simetri kazanmasında oldukça önemli olan notokordanın yapısında meydana gelebilecek bozulmalar, organizma üzerinde doğrudan etkilidir. Çalışmamızda toksik etkileri araştırılan maneb ve metoksiklor pestisitlerinin notokorda ve somit formasyonu üzerine olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir. Maneb ve metoksiklor pestisitleri arasından özellikle metoksiklorun her iki türe ait larvaların notokorda ve somit formasyonu üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Söz konusu bulgular, 120 saat süreyle, 50 ve 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvalarda oldukça bariz gözlenmiştir. Benzer şekilde, Fort ve ark. (2004b), yapmış oldukları çalışmalarında metoksiklorun, *Xenopus laevis* örneklerinde notokord lezyonlarına neden olduğu bildirmişlerdir.

#### **4.4.2.3. *Bufo bufo* larvalarında akut toksisite denemelerine ait istatistiksel tartışma**

*Bufo bufo* larvalarına 120 saat maneb pestisitinin uygulanmasının ardından ölçümleri yapılan ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerleri, ANOVA testi kullanılarak, uygulama grupları arasındaki farklar belirlenmiştir.

Uygulama sonunda; kontrol grubu larvalarda ortalama ıslak ağırlık değerleri;  $0,04641 \pm 0,00605$  g ölçülürken, 100 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta ortalama  $0,03273 \pm 0,00563$  g ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta  $0,02801 \pm 0,00217$  g ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ortalama total uzunluk değerleri; kontrol grubu larvalarda  $15,625 \pm 1,331$  mm, 100 µg/l maneb grubunda  $13,161 \pm 1,200$  mm, 1000 µg/l maneb grubu larvalarda ise  $12,463 \pm 0,929$  mm olarak ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri; kontrol grubu larvalarda  $8,885 \pm 1,011$  mm, 100 µg/l maneb grubunda  $6,957 \pm 0,566$  mm, 1000 µg/l maneb grubu larvalarda ise  $7,016 \pm 0,870$  mm olarak ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ).

Islak ağırlık, total uzunluk ve kuyruk uzunluğu ölçümlerinde, 100 ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalarda fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). En ölçümlerine ait değerlerde herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır.

Uygulama sonuna ait total uzunluk değerleri, gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla Kanonik diskriminant analizi kullanılarak test edilmiştir. Analiz

sonucunda 100 ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalara ait ölçümler, diğer gruplardan farklı çıkmıştır ( $p<0,05$ ). İstatistiksel bulgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada uygulanan dozlardan 100 ve 1000 µg/l maneb uygulamasının larval gelişimi baskılayıcı olduğu sonucuna varılmıştır.

*Bufo bufo* larvalarına 120 saat metoksiklor pestisitinin uygulanmasının ardından ölçümleri yapılan ıslak ağırlık (g), total uzunluk (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerleri, ANOVA testi kullanılarak, uygulama grupları arasındaki farklar belirlenmiştir.

Uygulama sonunda, kontrol grubu larvalarda ortalama ıslak ağırlık değerleri;  $0,04414 \pm 0,00570$  g ölçülürken, 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan grupta ortalama  $0,02795 \pm 0,00298$  g olarak ölçülmüştür ( $p<0,05$ ). Ortalama total uzunluk değerleri; kontrol grubu larvalarda  $15,140 \pm 1,247$  mm, 5 µg/l metoksiklor grubunda  $13,665 \pm 1,208$  mm, 10 µg/l metoksiklor grubu larvalarda  $12,645 \pm 0,716$  mm ve 50 µg/l metoksiklor grubunda ise  $12,641 \pm 0,771$  mm olarak ölçülmüştür ( $p<0,05$ ). Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri; kontrol grubu larvalarda  $9,034 \pm 0,796$  mm, 5 µg/l metoksiklor grubunda  $7,776 \pm 0,496$  mm, 10 µg/l metoksiklor grubu larvalarda  $7,099 \pm 0,430$  mm ve 50 µg/l metoksiklor grubu larvalarda ise  $7,175 \pm 0,616$  mm olarak ölçülmüştür ( $p<0,05$ ).

Islak ağırlık ölçümlerinde sadece 50 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı grupta fark tespit edilirken, total uzunluk, kuyruk uzunluğu ölçümlerinde ise 5, 10 ve 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruplarda da fark tespit edilmiştir. En ölçümlerine ait değerlerde, herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır.

Uygulama sonuna ait total uzunluk değerleri, gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla Kanonik diskriminant analizi kullanılarak test edilmiştir. Analiz sonucunda 5, 10 ve 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruplara dahil larvalara ait ölçümler, diğer gruplardan farklı çıkmıştır ( $p<0,05$ ). İstatistiksel bulgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada uygulanan dozlardan 5, 10 ve 50 µg/l metoksiklor uygulamasının larval gelişimi baskılayıcı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Akut uygulamalar sonucunda *Bufo bufo* larvaları için maneb pestisitinin  $LC_{50}$  değeri  $1966,345$  µg/l (%95 güven aralığı, alt:  $818,468$  µg/l, üst:  $3313,641$  µg/l) metoksiklor pestisitinin  $LC_{50}$  değeri  $22,104$  µg/l (%95 güven aralığı, alt:  $12,035$  µg/l, üst:  $36,256$  µg/l) olarak hesaplanmıştır. Tespit edilen her iki değer de söz konusu pestisitler için *Bufo*

*bufo* türünde ilk kez hesaplanmış değerler olmasının literature katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

#### **4.4.2.4. *Bufo viridis* larvalarında akut toksisite denemelerine ait istatistiksel tartışma**

*Bufo viridis* larvalarına 120 saat maneb pestisitinin uygulanmasının ardından ölçümleri yapılan ıslak ağırlık (g), total uzunluk (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerleri, ANOVA testi kullanılarak, uygulama grupları arasındaki farklar belirlenmiştir.

Uygulama sonunda, kontrol grubu larvalarda ortalama ıslak ağırlık değerleri;  $0,02889 \pm 0,00223$  g ölçülürken, 100 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta ortalama  $0,02194 \pm 0,00346$  g ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta  $0,02076 \pm 0,00146$  g ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ortalama total uzunluk değerleri; kontrol grubu larvalarda  $13,511 \pm 0,557$  mm, 50 µg/l maneb grubunda  $12,272 \pm 0,430$  mm, 100 µg/l maneb grubu larvalarda ise  $11,424 \pm 0,562$  mm ve 1000 µg/l uygulama grubu larvalarda ise  $11,082 \pm 0,183$  mm olarak ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri; kontrol grubu larvalarda  $7,756 \pm 0,862$  mm, 50 µg/l maneb grubunda  $6,541 \pm 0,371$  mm, 100 µg/l maneb grubu larvalarda  $5,900 \pm 0,337$  mm ve 1000 µg/l uygulama grubu larvalarda ise  $5,990 \pm 0,1229$  mm olarak ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ).

Islak ağırlık ölçümlerine göre 100 ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplarda fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Total uzunluk ve kuyruk uzunluğu ölçümlerinde, 50, 100 ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalarda fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). En ölçümlerine ait değerlerde önemli bir istatistiksel fark saptanmamıştır.

Uygulama sonuna ait total uzunluk değerleri, gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla Kanonik diskriminant analizi kullanılarak test edilmiştir. Analiz sonucunda 50, 100 ve 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalara ait ölçümler, diğer gruplardan farklı çıkmıştır. İstatistiksel bulgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada uygulanan dozlardan 50, 100 ve 1000 µg/l maneb uygulamasının larval gelişimi baskılayıcı olduğu sonucuna varılmaktadır.

*Bufo viridis* larvalarına 120 saat metoksiklor pestisitinin uygulanmasının ardından ölçümleri yapılan ıslak ağırlık (g), total uzunluk (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerleri, ANOVA testi kullanılarak, uygulama grupları arasındaki farklar belirlenmiştir.

Uygulama sonunda kontrol grubu larvalarda ortalama ıslak ağırlık değerleri;  $0,02742 \pm 0,00319$  g ölçülürken,  $10 \mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan grupta ortalama  $0,01720 \pm 0,00291$  g ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan grupta ortalama  $0,01611 \pm 0,0019$  gr olarak ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ortalama total uzunluk değerleri; kontrol grubu larvalarda  $13,216 \pm 0,704$  mm,  $10 \mu\text{g/l}$  metoksiklor grubunda  $11,708 \pm 0,422$  mm ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor grubu larvalarda  $11,210 \pm 0,308$  mm ( $p < 0,05$ ). Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri; kontrol grubu larvalarda  $8,357 \pm 0,632$  mm,  $10 \mu\text{g/l}$  metoksiklor grubunda  $6,235 \pm 0,422$  mm ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor grubu larvalarda  $6,06 \pm 0,2616$  mm ölçülmüştür ( $p < 0,05$ ).

Islak ağırlık, total uzunluk ve kuyruk uzunluğu ölçümlerine göre,  $10$  ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplarda fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). En ölçümlerine ait değerlerde istatistiksel bakımdan anlamlı fark saptanmamıştır.

Uygulama sonuna ait total uzunluk değerleri, gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla Kanonik diskriminant analizi kullanılarak test edilmiştir. Analiz sonucunda  $10$  ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulaması yapılan gruplara dahil larvalara ait ölçümler, diğer gruplardan farklı çıkmıştır. İstatistiksel bulgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada uygulanan dozlardan  $10$  ve  $50 \mu\text{g/l}$  metoksiklor uygulamasının larval gelişimi baskılayıcı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Akut uygulamalar sonucunda *Bufo viridis* larvaları için maneb pestisitinin  $LC_{50}$  değeri  $332,834 \mu\text{g/l}$  (%95 güven aralığı, alt:  $145,890 \mu\text{g/l}$ , üst:  $626,081 \mu\text{g/l}$ ), metoksiklor pestisitinin  $LC_{50}$  değeri  $20,313 \mu\text{g/l}$  (%95 güven aralığı, alt:  $9,204 \mu\text{g/l}$ , üst:  $34,400 \mu\text{g/l}$ ) olarak hesaplanmıştır. Tespit edilen her iki değer de söz konusu pestisitler için *Bufo viridis* türünde ilk kez hesaplanmış değerler olmasının literature katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

*Bufo bufo* ve *Bufo viridis* örneklerine ait larvalarda maneb ve metoksiklor pestisitlerinin akut uygulaması neticesinde elde edilen istatistiksel bulgular birlikte değerlendirildiğinde, söz konusu pestisitler için *Bufo bufo* larvalarının, *Bufo viridis* larvalarına göre daha az hassas olduğu sonucuna varılabilir.

**4.4.3. Kronik toksisite denemelerine ait tartışma****4.4.3.1. *Bufo bufo* larvalarında kronik toksisite denemelerine ait tartışma**

Maneb pestisitinin *Bufo bufo* larvaları üzerindeki kronik etkileri; somatik yaş (gün) / gelişim evresi, larvaların metamorfozu tamamlama süreleri, pestisit maruziyetine bağlı olarak farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişiminin gözleendiği gelişim evrelerine ait bulgular birlikte değerlendirilerek tartışılmıştır.

Kontrol grubuna dahil *Bufo bufo* larvalarının %88'inin metamorfozu tamamlama süresi 46 gün olarak tespit edilmiştir. 46. somatik yaşındaki kontrol grubuna dahil *Bufo bufo* larvalarının 44.-46. gelişim evreleri aralığında oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde 46. somatik yaşındaki 0,1 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların %85'inin ve 0,5 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların ise %83'ünün metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,1 ve 0,5 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların gelişim evresi aralıkları değerlendirildiğinde, söz konusu uygulama grupları arasındaki fark önemsiz çıkmış, dolayısıyla bu uygulama gruplarında maneb maruziyetine bağlı olarak larvaların metamorfozlarını tamamlama sürelerinde bir gecikme saptanmamıştır. Ancak, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların, 46. somatik yaşında henüz metamorfozlarını tamamlayamadıkları tespit edilmiştir. Özellikle, 5 ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda en ileri gelişim evresinin 40. evre olduğu belirlenmiştir. Söz konusu uygulama gruplarına dahil larvaların büyüme ve gelişimlerinde özellikle 32. somatik yaştan itibaren gecikmeler olduğu belirlenmiş ve fark önemli çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların %50'sinin metamorfozunu tamamlama süresi 65 gün olarak belirlenmiştir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde subletal konsantrasyonda maneb uygulamasının, *Bufo bufo* larvalarının büyüme ve gelişimi üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

39. somatik yaşındaki kontrol ve maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda farklılaşmamış gonad taslağının bulunduğu herhangi bir testis veya ovaryum gelişiminin gözlenmediği tespit edilmiştir. 46. somatik yaşındaki kontrol grubu, 0,1 ve 0,5 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalarda gonad gelişimi gözlenmiştir. Ancak aynı somatik yaştaki 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda sadece farklılaşmamış gonad taslağı ve ovaryum gelişiminin mevcut olduğu belirlenmiştir. Falconi ve ark. (2004), Bufonidlerde gonad gelişiminin asimetrik modelde



olduğunu rapor etmişlerdir. Buna göre larval gelişiminin erken evrelerinde mevcut olan farklılaşmamış gonad taslağının, gelişimin ilerleyen evrelerinde öncelikle ovaryuma, ardından erkek birey gelişimi gözlenecekse testislere farklılaşma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *Bufo bufo* türü için 41. evreden itibaren testis ve ovaryum ayrımının yapılabildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvaların, 46. somatik yaşında, kontrol grubu larvalara oranla daha erken gelişim evrelerinde olmaları söz konusu durumu açıklamaktadır. Metamorfozunu tamamlamış olan 46. evredeki kontrol ve maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda en fazla sayıda ovaryum gelişimi 6 adet ovaryumla 0,5 ve 1 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplarda tespit edilmiştir. 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda farklılaşmamış gonad taslaklarının bulunması, pestisitinin gonad gelişimi üzerinde etkili olduğu sonucu doğurmaktadır.

Metoksiklor pestisitinin *Bufo bufo* larvaları üzerindeki kronik etkileri benzer bulgular göz önünde bulundurularak tartışılmıştır. Kontrol grubuna dahil *Bufo bufo* larvalarının %88'inin metamorfozu tamamlama süresi 46 gün olarak tespit edilmiştir. 46. somatik yaşındaki kontrol grubuna dahil *Bufo bufo* larvalarının 44.-46. gelişim evresi aralığında oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde, 46. somatik yaşındaki 0,01 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların %74'ünün ve 0,05 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların ise %70'inin metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01 ve 0,05 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların gelişim evresi aralıkları değerlendirildiğinde, söz konusu uygulama grupları arasındaki fark önemsiz çıkmış, dolayısıyla bu uygulama gruplarında metoksiklor maruziyetine bağlı olarak larvaların metamorfozlarını tamamlama sürelerinde bir gecikme saptanmamıştır. Ancak 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların, 46. somatik yaşında henüz metamorfozlarını tamamlamadıkları tespit edilmiştir. Özellikle 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda en ileri gelişim evresinin 42. evre olduğu belirlenmiştir. Söz konusu uygulama gruplarına dahil larvaların büyüme ve gelişimlerinde özellikle 18. somatik yaştan itibaren gecikmeler olduğu belirlenmiş ve fark önemli çıkmıştır ( $p<0,05$ ). 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların %50'sinin metamorfozunu tamamlama süresi 78 gün olarak belirlenmiştir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde kronik olarak metoksiklor uygulamasının, *Bufo bufo*

larvalarının büyüme ve gelişimi üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde Fort ve ark. (2004b), *Xenopus laevis* örneğine ait larvalarda, 0,001-0,1 mg/l doz aralığında, 30 gün süreyle metoksiklor uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada da metoksiklor uygulamasının, kuyruk rezorbsiyonunu inhibe edici etki gösterdiğini bildirilmiştir.

Metoksiklorun üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur (Gray ve ark., 1989; Cupp ve Skinner, 2001; Gangadharan ve ark., 2001; Boorgest ve ark., 2002; Johnson ve ark., 2002; You ve ark., 2002; Fort ve ark., 2004a). Bu çalışmaların çoğunda metoksiklorun özellikle testis gelişimi ve fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmekle birlikte, bazı çalışmalarda pestisit gonadlar üzerinde herhangi bir etkisinin gözlenmediği rapor edilmiştir. Çalışmamızda 46. somatik yaşındaki kontrol grubu ve metoksiklor uygulama gruplarına dahil larvalarda gonad gelişimi gözlenmiştir. Ancak pestisit uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda; farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin gözlendiği birey sayıları kontrol grubuna göre farklılık göstermektedir ( $p < 0,05$ ). 46. somatik yaşta en fazla sayıda farklılaşmamış gonad taslağı 8 larva ile, 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı grupta tespit edilmiştir. Bu yaşta en fazla sayıda ovaryum gelişimine 5 adet larva ile, 0,01 ve 0,05 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplarda tespit edilmiştir. Bu durum *Bufo bufo* türünde gonad gelişiminin asimetric model göstermesinden kaynaklanmaktadır. Metamorfozunu tamamlamış olan 46. evredeki kontrol ve metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda en fazla sayıda ovaryum gelişimi 6 adet ovaryumla 0,01 ve 0,1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplarda tespit edilmiştir. 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda farklılaşmamış gonad taslaklarının bulunması, pestisit gonad gelişimi üzerinde etkili olduğu sonucunu doğurmaktadır. Fort ve ark. (2004a), *Xenopus tropicalis* örneklerine ait juvenil bireylere 100 µg/l metoksiklor uygulamasının; eşey oranını dişiye doğru yönlendirdiğini, her iki gonadın yapısında da anomalilere neden olduğunu ve metoksiklorun muhtemel endokrin bozucu etkisi olduğu bildirmişlerdir. Çalışmamızda gonad taslaklarında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamış olmasının uygulama dozlarından kaynaklandığı düşünülmektedir, elde edilen diğer bulgular önceki çalışmayla uyum göstermektedir.

**4.4.3.2. *Bufo viridis* larvalarında kronik toksisite denemelerine ait tartışma**

Maneb pestisitinin *Bufo viridis* larvaları üzerindeki kronik etkileri; somatik yaş (gün) / gelişim evresi, larvaların metamorfozu tamamlama süreleri, pestisit maruziyetine bağlı olarak farklılaşmamış gonad taslağı, testis ve ovaryum gelişiminin gözleendiği gelişim evrelerine ait bulgular birlikte değerlendirilerek tartışılmıştır.

Kontrol grubuna dahil *Bufo viridis* larvalarının %80'inin metamorfozu tamamlama süresi 83 gün olarak tespit edilmiştir. 83. somatik yaşındaki kontrol grubuna dahil *Bufo viridis* larvalarının 43.-46. gelişim evresi aralığında oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde 83. somatik yaşındaki 0,1 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların %65'nin ve 0,5 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların ise %55'inin metamorfozlarını tamamladıkları tespit edilmiştir. 1 ve 5 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların dahil olduğu gruplarda sırasıyla %13 ve %5 oranda metamorfozunu tamamlayan larva bulunması oldukça önemlidir. Kontrol ve 0,1 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların gelişim evresi aralıkları değerlendirildiğinde, söz konusu gruplar arasındaki fark önemsiz çıkmıştır. Bununla birlikte, 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan larvaların, gelişim evresi aralıkları diğer gruplarla karşılaştırıldığında fark önemli çıkmıştır ( $p<0,05$ ). Özellikle 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda en ileri gelişim evresinin 41. evre olduğu belirlenmiştir. Söz konusu uygulama gruplarına dahil larvaların büyüme ve gelişimlerinde özellikle 30. somatik yaştan itibaren gecikmeler olduğu belirlenmiş ve fark önemli çıkmıştır ( $p<0,05$ ). 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvaların %50'sinin metamorfozunu tamamlama süresi 92 gün olarak belirlenmiştir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde subletal konsantrasyonda maneb uygulamasının, *Bufo viridis* larvalarının büyüme ve gelişimi üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

58. somatik yaşındaki kontrol ve 0,1 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda ilk kez farklılaşmamış gonad taslağı gözlenmiştir. 72. somatik yaşındaki kontrol grubu, 0,1, 0,5 ve 1 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvalarda gonad gelişimi gözlenmiştir. Bununla birlikte aynı somatik yaştaki 5 µg/l maneb uygulaması yapılan grupta henüz gonad gelişimi gözlenmezken, 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruba dahil 1 larvada ovaryum gelişiminin olduğu tespit edilmiştir. Sadece 1 larvada ovaryum gelişiminin gözlenmiş olması istatistiksel açıdan bir önem arz etmediği için söz konusu bulgu üzerinde tartışılmamıştır. 83. somatik yaşındaki kontrol ve 0,1 µg/l

maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda gonad farklılaşmasının gerçekleştiği gözlenmiş ve eşey oranının 1:1'e yakın olduğu tespit edilmiştir. Ancak 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvaların, aynı somatik yaşlarında farklılaşmamış gonad taslaklarının gözlenmesi, maneb pestisitinin gonad gelişimi üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu sonucunu doğurmaktadır. Fakat 83. somatik yaşındaki 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan gruplara dahil larvaların henüz erken gelişim evrelerinde olmaları da oldukça önemlidir. Testis ve ovaryum gelişimi gözlenen metamorfozunu tamamlamış olan 46. evredeki kontrol ve maneb uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvaların sayısı dikkate alındığında gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı gruplarda halen farklılaşmamış gonad taslağının bulunması, pestisitinin gonad gelişimi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Metoksiklor pestisitinin *Bufo viridis* larvaları üzerindeki kronik etkileri benzer bulgular göz önünde bulundurularak tartışılmıştır. 83. somatik yaşındaki kontrol grubuna dahil *Bufo viridis* larvalarının 43.-46. gelişim evresi aralığında oldukları tespit edilmiştir. Aynı somatik yaştaki, 0,01 ve 0,05 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan larvaların 41.-46. gelişim evresi aralığında oldukları tespit edilmiş, kontrol ve uygulama grupları arasındaki fark önemsiz çıkmıştır. Ancak 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvaların gelişim evresi aralıkları, diğer gruplarla karşılaştırıldığında fark önemli çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). 83. somatik yaşındaki larvaların dahil olduğu gruplarda, metamorfozunu tamamlayan bireylerin yüzdeleri karşılaştırıldığında sadece 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplarda önemli bir fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Bu gruplara dahil larvalarda henüz metamorfozunu tamamlamış bireye rastlanmamış olması, metoksiklor pestisitinin larval gelişimi baskılayıcı etki gösterdiği sonucunu doğurmaktadır. Özellikle 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruba dahil larvaların %50'sinin, 97. somatik yaşlarında metamorfozunu tamamlamış olmaları, metoksiklorun larval gelişim üzerindeki geciktirici etkilerini pekiştirmektedir.

Çalışmamızda 83. somatik yaşındaki kontrol grubu ve 0,01 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvalarda ovaryum ve testis farklılaşmasının olduğu gözlenmiştir. Bu gruplara dahil larvalarda farklılaşmamış gonad taslağı gözlenmemiştir. Özellikle 0,01 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan gruba dahil 10

larvanın 7'sinde ovaryum gelişiminin gözlenmiş olması oldukça önemlidir. Aynı somatik yaştaki *Bufo viridis* larvalarında, sadece 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruba dahil larvalarda ovaryum ya da testis farklılaşması tespit edilmemiş olup, incelenen tüm larvalarda farklılaşmamış gonad taslağının mevcut olduğu belirlenmiştir. 46. evredeki, kontrol ve metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplara dahil larvalar gonad gelişimleri bakımından incelenmiştir. Bu gruplar içerisinde en fazla sayıda ovaryum gelişimi, 7 adet larvayla 0,01 metoksiklor uygulamasının yapıldığı grupta tespit edilmiştir. 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı gruplara dahil larvalarda farklılaşmamış gonad taslaklarının bulunması, pestisit'in gonad gelişimi üzerinde etkili olduğu sonucunu doğurmaktadır. Farklılaşmamış gonad, ovaryum ve testis gelişimi gözlenen birey sayıları dikkate alındığında 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulamalarının yapıldığı gruplar, diğer uygulama gruplarından farklı çıkmıştır ( $p<0,05$ ). Metoksiklorun muhtemel endokrin bozucu etkisi gözlemlenmiştir.

## **BÖLÜM 5**

### **SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

*Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarına, maneb ve metoksiklor pestisitlerinin akut toksisite denemeleri neticesinde, her iki pestisitinin de larvalar üzerinde olumsuz morfolojik, histopatolojik ve gelişimsel etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu olumsuz etkiler, özellikle yüksek uygulama dozlarında oldukça bariz gözlenmiş olup, bu etkilerin mortalite oranlarına da yansdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda ele alınan türlere ait larvaların, maneb ve metoksiklor pestisitleri karşısındaki toksik dirençleri kıyaslandığında *Bufo bufo* örneklerine ait larvaların, bu pestisitler karşısındaki toksik toleransının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Subletal dozlarda uygulaması yapılan maneb ve metoksiklor pestisitlerinin, *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvaları üzerindeki kronik etkilerinin araştırıldığı toksisite denemelerinde ise, akut denemelerdeki sonuçları destekler nitelikte, bu pestisitlerin larval büyüme gelişim üzerinde baskılayıcı etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Pestisit maruziyetine bağlı olarak larvaların metamorfozu tamamlama sürelerinde görülen gecikmeler, genellikle sığ ve mevsimsel su birikintilerini üreme amacıyla kullanan amfibi türleri açısından oldukça önemlidir. Mevsim geçişiyle birlikte, sıcaklık artışına bağlı olarak sığ su birikintilerinin kuruması veya çekilmesi henüz metamorfozu tamamlayamamış olan larvaların toplu halde zarar görmesine ya da ölümüne neden olabilmektedir. Çalışmamızda ele alınan türlere ait larvaların metamorfozu tamamlama süreleri kıyaslandığında *Bufo bufo* örneklerine ait larvaların, *Bufo viridis* larvalarına oranla daha kısa sürede metamorfozu tamamladıkları tespit edilmiştir. Amfibilerde, metamorfozu tamamlama süresinin kısa oluşu, türün çoğalma başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Ancak yapılan arazi çalışmalarındaki deneyimler göz önünde bulundurulursa, söz konusu iki tür arasında *Bufo viridis* örneklerine doğada rastlanma sıklığının daha fazla olması ilginçtir. Bu durum, *Bufo bufo* örneklerinin kısmen daha az yumurta bırakması ve yumurta açılma performansının daha düşük olması gerekçeleriyle açıklanabilir.

Çalışmada kullanılan pestisitlerin her ikisinin de, gerek *Bufo bufo* gerekse de *Bufo viridis* larvalarında gonad gelişimi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Pestisit maruziyeti sonucunda larval gelişim baskılanmış, bunun sonucunda metamorfozu tamamlamış larvalarda dahi farklılaşmamış gonad taslakları gözlenmiştir. Gonad

farklılaşması görülen larvalarda, ovaryum ya da testis gelişimi göstermesi beklenen birey sayısı oranı olan 1:1, pestisit uygulamalarının yapıldığı gruplarda genellikle farklı çıkmıştır. Söz konusu bulgular maneb ve metoksiklor pestisitlerinin, *Bufo bufo* ve *Bufo viridis* larvalarında endokrin sistem üzerinde de etkili olduğunu düşündürmektedir.

Tarımsal faaliyetler sırasında ve sonrasında, zararlı ot ve hastalık etmeni organizmaların olumsuz etkilerinden korunabilmek için pestisit kullanımı vazgeçilmez bir gerekliliktir. Ancak bilinçsiz ve kontrolsüz pestisit kullanımı, çoğu zaman hedef organizmanın zamanla direnç kazanmasına ayrıca hedef olmayan organizmaların zarar görmesi ya da ölümüne neden olmaktadır. Pestisitlerin, yer altı ve yer üstü sulara kolaylıkla kontamine olabildikleri dikkate alınır, bu kimyasalların özellikle üreme dönemlerini su içerisinde geçiren amfibiler için oldukça ciddi bir tehdit oldukları sonucuna ulaşılmaktadır. Mevcut biyolojik çeşitliliğin korunması ve sonraki nesillere aktarılabilmesi için, sadece ruhsatlı pestisitlerin kullanımına özen gösterilmesi, uygulama dozlarında aşırıya kaçılmaması ve konuyla ilgili halkın bilinçlendirilmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahmad M., Hasan R. ve Ahmad M., 2005. Effects of Prolonged Administration of Large Doses of ACTH on *Bufo melanostictus* Tadpoles. *Pakistan Journal of Physiology*. 1: 1-2.
- Allner B., Gönna S., Griebeler E.M., Nikutowski N., Weltin A. ve Allner P.S., 2009. Reproductive Functions of Wild Fish as Bioindicators of Reproductive Toxicants in the Aquatic Environment. *Environmental Science and Pollution Research*. 17 (2): 505-518.
- Amstislavksy S.Y., Kızılova E.A. ve Eroschenko V.P., 2003. Preimplantation Mouse Embryo Development as a Target of the Pesticide Methoxychlor. *Reproductive Toxicology*. 17: 79-86.
- Arya N., 2005. Pesticides and Human Health. *Canadian Journal of Public Health-Revue Canadienne de Sante Publique*. 96: 89-92.
- Bancroft R. ve Prahlad K.V., 1973. Effect of Ethylenebis (dithiocarbamic acid) Disodium Salt (nabam) and Ethylenebis (dithiocarbamate) Manganese (maneb) on *Xenopus laevis* development. *Teratology*. 7 (2): 143-150.
- Bandiera S.M., 2006. Reproductive and Endocrine Effects of p-nonylphenol and Methoxychlor: A review. *Immunology*. 6 (1): 15-26.
- Beck S.L., 1990. Prenatal and Postnatal Assessment of Maneb Exposed CD-1 Mice. *Reproductive Toxicology*. 4 (4): 283-290.
- Beebee T.J.C. ve Griffiths R.A., 2005. The Amphibian Decline Crisis: A Watershed for Conservation Biology? *Biological Conservation*. 125: 271–285.
- Bernabo I., Brunelli E., Berg C., Bonacci A. ve Tripepi S., 2008. Endosulfan Acute Toxicity in *Bufo bufo* gills. Ultrastructural Changes and Nitric Oxide Synthase Localization. *Aquatic Toxicology*. 86: 447-456.



- Bevan C.L., Porter D.M., Prasad A., Howard M.J. ve Henderson L.P., 2003. Environmental Estrogens Alter Early Development in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspective*. 111: 488-496.
- Borgeest C., Symonds D., Mayer L.P., Hoyer P.B. ve Flaws J.A., 2002. Methoxychlor May Cause Ovarian Follicular Atresia and Proliferation of the Ovarian Epithelium in the Mouse. *Toxicological Sciences*. 68: 473-478.
- Brown D.D. ve Cai L., 2007. Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*. 306: 20–33.
- Brunelli E., Bernabo I., Berg C., Enkel K.L., Bonacci A. ve Tripepi S., 2009. Environmentally Relevant Concentrations of Endosulfan Impair Development, Metamorphosis and Behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*. 91: 135-142.
- Bulger W.H., Feil V.J. ve Kupfer D., 1985. Role of Hepatic Monooxygenases in Generating Estrogenic Metabolites from Methoxychlor and from Its Identified Contaminants. *Molecular Pharmacology*. 27: 115–124.
- Bulut S., Erdoğan S.F., Konuk M. ve Cemek M., 2010. The Organochlorine Pesticide Residues in the Drinking Waters of Afyonkarahisar, Turkey. *Ekoloji*. 19: 24-31.
- Chapin R.E., Harris M.W., Davis B.J., Ward S.M., Wilson R.E., Mauney M.A., Lockhart A.C., Smialowicz R.J, Moser V.C., Burka L.T. ve Collins B.J., 1997. The Effects of Perinatal/Juvenile Methoxychlor Exposure on Adult Rat Nervous, Immune, and Reproductive System Function. *Fundamental and Applied Toxicology*. 40: 138–157.
- Chernoff N., Kavlock R.J., Rogers E.H., Carver B.D. ve Murray S., 1979. Perinatal Toxicity of Maneb, Ethylene Thiourea and Ethylenebisisothiocyanate sulfide in Rodents. *Journal of Toxicological Environmental Health*. 5 (5): 821-834.
- Choi D., Hwang S., Lee E., Yoon S., Yoon B. K. ve Bae D., 2004. Expression of Mitochondria-dependent Apoptosis Genes (p53, Bax and Bcl-2) in Rat Granulosa Cells During Follicular Development. *Journal of Soc. Gynecological Investigation*. 11: 311–317.

- Colborn T., 1993. Developmental Effects of Endocrine-disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives*. 101 (5): 378-384.
- Collins J.P. ve Storfer A., 2003. Amphibian Declines: Sorting the Hypotheses. *Diversity and Distributions*. 9: 89-98.
- Cupp A.S. ve Skinner M.K., 2001. Actions of the Endocrine Disruptor Methoxychlor and its Estrogenic Metabolite on In Vitro Embryonic Rat Seminiferous Cord Formation and Perinatal Testis Growth. *Reproductive Toxicology*. 15: 317-326.
- Çalışkan M. ve Yerli S.V., 2000. Organochlorine Pesticide Residues in Aquatic Organisms from Köyceğiz Lagoon System, Turkey. *Water, Air and Soil Pollution*. 121: 1-9.
- Deveci E., 2006. Histopathological Effects of Organometallic Maneb on Testis in Rats: A Light and Electron Microscopic Study. *Toxicology Industrial Health*. 22 (9): 395-398.
- Edwards I.R., Ferry D.G. ve Temples W.A., 1991. *Fungicides and Related Compounds*. In: *Hand Book of Pesticide Toxicology*. Eds. By Hayes W.I. ve Laws E.R. Academic Press News. 1-82.
- Ekmekçi G., Yerli S.V., Özmen M. ve Ayaş Z., 2000. Sarıyar Baraj Gölü ve Gölü Besleyen Akarsularda Kirliliğin Balıklara Etkileri. TÜBİTAK Proje No: TARP-1846, Ankara.
- Erkmen B., 2004. Meriç Deltası'nda Bazı Çevre Kirleticilerin Çeşitli Ortam ve Organizmalarda Birikimi ve Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) Balıklarındaki Toksik Etkilerinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Yönden Araştırılması. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Türkiye.
- Facemire C.F., Gross T.S. ve Guillette L.J., 1995. Environmental Health Issues. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 103 (4), 402-411.
- Falconi R., Dalpiaz D. ve Zaccanti F., 2004. Ultrastructural Aspects of Gonadal Morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia, Anura): Sex Differentiation. *Journal of Experimental Zoology*. 301: 378-388.

- Fort D.J., Thomas J.H., Rogers R.L., Noll A., Spaulding C.D., Guiney P.D. ve Weeks J.A., 2004a. Evaluation of the Developmental and Reproductive Toxicity of Methoxychlor using an Anuran (*Xenopus tropicalis*) Chronic Exposure Model. *Toxicological Sciences*. 81: 443-453.
- Fort D.J., Guiney P.D., Weeks J.A., Thomas J.H., Rogers R.L., Noll A.M. ve Spaulding C.D., 2004b. Effect of Methoxychlor on Various Life Stages of *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*. 81: 454-466.
- Fridgen C.M., 2009. Laboratory Controlled Normal and Atrazine Exposed Development of Northern Leopard Frog, *Rana pipiens* Tadpoles. Master of Science (Yüksek Lisans Tezi). Trent University, Canada.
- Gangadharan B., Murugan M.A. ve Mathur P.P., 2001. Effect of Methoxychlor on the Antioxidant System of Goat Epididymal Sperm in Vitro. *Asian Journal of Andrology*. 3: 285-288.
- Goldman L.R., 1997. New Approaches for Assessing the Etiology and Risks of Developmental Abnormalities from Chemical Exposure. *Reproductive Toxicology*. 11: 443-51.
- Golub M.S., Hogrefe C.E., Germann S.L., Lasley B.L., Natarajan K. ve Tarantal A.F., 2003. Effects of Exogenous Estrogenic Agents on Pubertal Growth and Reproductive System Maturation in Female Rhesus Monkeys. *Toxicological Sciences*. 74: 103-113.
- Gosner K.L., 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*. 16: 183-190.
- Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C., 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. Fifth edition. Williams and Wilkins, Baltimore. 1-96.
- Gray L.E., Ostby J. ve Ferrell J., 1989. A Dose-response Analysis of Methoxychlor Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*. 12: 92-108.

- Guillette L.J., Gross T.S., Masson G.R., Matter J.M., Percival H.F. ve Woodward A.R., 1994. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*. 102: 680-688.
- Gupta R.K., Aberdeen G., Babus J.K., Albrecht E.D. ve Flaws J.A., 2007. Methoxychlor and Its Metabolites Inhibit Growth and Induce Atresia of Baboon Antral Follicles. *Toxicologic Pathology*. 35: 649-656.
- Gupta R.K., Miller K.P., Babus J.K. ve Flaws J.A., 2006. Methoxychlor Inhibits Growth and Induces Atresia of Antral Follicles through an Oxidative Stress Pathway. *Toxicological Sciences*. 93 (2): 382-38.
- Güven K., Deveci E., Akba O., Onen A. ve Pomerai D., 1998. The Accumulation and Histological Effects of Organometallic Fungicides Propineb and Maneb on the Kidneys of Fetus and Female Rats During Pregnancy, *Toxicol. Lett.* 99: 91-98.
- Hayes T.B., 1998. Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians. *Journal of Experimental Zoology*. 281: 373-399.
- Hayes T., 2000. *Endocrine Disruption in Amphibians*. In: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles* (Sparling D, Linder G, Bishop C, eds). SETAC Press. Pensacola. 595-616.
- Hopkins W.A., 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Changes. *ILAR Journal*. 48 (3): 270-277.
- Hu Y. ve Kupfer D., 2002. Enantioselective Metabolism of the Endocrine Disruptor Pesticide Methoxychlor by Human Cytochromes P450 (P450s): Major Differences in Selective Enantiomer Formation by Various P450 Isoforms. *Drug metabolism and Disposition*. 30 (12): 1329-1336.
- Johnson L., Staub C., Silge R.L., Harris M.W. ve Chapin R.E., 2002. The Pesticide Methoxychlor Given Orally During the Perinatal/Juvenile Period Reduced the Spermatogenic Potential of Males as Adults by Reducing Their Sertoli Cell Number.

- Reprod. Nutr. Dev.* 42: 573-580.
- Jones D.K., Hammond J.I. ve Relyea R.A., 2009. Very Highyl Toxic Effects of Endosulfan Across Nine Species of Tadpoles: Lag Effects and Family-Level Sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (9): 1939-1945.
- Kaloyanova F. ve Chemishanska L.I., 1989. Dose Effect Relationship for Some Specific Effects of Dithiocarbamates. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 33 (1): 11-17.
- Kapoor J., Kumar A., Gupta U. ve Rao A.L.J., 1994. Spectrophotometric Determination of Maneb by Ternary Complex Formation with PAR and CTAB. *Talanta*. 41 (12): 2061-2065.
- Katzmann S., Loschenkohl A.W. ve Waringer J.A., 2003. Effects of Inter and Intraspecific Competition on Growth and Development of *Bufo viridis* and *Bufo bufo* tadpoles. *Limnologica*. 33: 122-330.
- Kete R. ve Yılmaz İ., 2000. İzmir Bölgesinde Yaşayan *Bufo viridis* (Anura, Amphibia)'in Üreme ve Gelişme Biyolojisi Üzerine Bir İnceleme. *Çev. Kor.* 10 (37): 3-8.
- Kidd H. ve James D.R., 1991. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services. Cambridge, UK. 1-56.
- Kolankaya D., 2006. Organochlorine Pesticide Residues and their Toxic Effects on the Environment and Organisms in Turkey. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 86: 147-160.
- Lafuenta A., Carracedo A., Romero A. ve Esquifino A.I., 2003. Methoxychlor Modifies the Ultradian Secretory Pattern of Prolactin and Affects its TRH Response. *Med. Sci. Monit.* 9: 137-142.
- Larsson K.S., Arnander C. ve Cekanova E., 1976. Studies of Teratogenic Effects of the Dithiocarbamates Maneb, Mancozeb and Propineb. *Teratology*. 14 (2): 171-183.
- Latchoumycandane C., Chitra K.C. ve Mathur P.P., 2002. The Effect of Methoxychlor on the Epididymal Antioxidant System of Adult Rats. *Reprod. Toxicol.* 16: 161-172.

- Maci R. ve Arias E., 1987. Teratogenic Effects of the Fungicide Maneb on Chick Embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13 (2): 169-173.
- Mackenzie D.I., Nichols J.D., Hines J.E., Knutson M.G. ve Franklin A.B., 2003. Estimating Site Occupancy, Colonization, and Local Extinction When a Species is Detected Imperfectly. *Ecology.* 84: 2200-2207.
- Mallat J., 1985. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants, A Stastical Review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 42: 630-648.
- Mallem L., Boulakoud M.S. ve Franck M., 2006. Hypothyroidism After Medium Exposure to the Fungicide Maneb in the Rabbit *Cuniculus lepus*. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 71 (2): 91-99.
- Martinez E.M. ve Swartz W.J., 1992. Effects of Methoxychlor on the Reproductive System Adult Female Mouse: Ultrastructural Observations. *Reproductive Toxicology.* 6: 93-98.
- Mobjerg N., Larsen E.H. ve Jespersen A., 2000. Morphology of the Kidney in Larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Journal of Morphology.* 245 (3): 177-195.
- Munk R. ve Schulz V., 1989. Study of Possible Teratogenic Effects of the Fungicide Maneb on Chick Embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17 (1): 112-118.
- Munoz J.C., Lopez D.M., Ricart M., Villagrasa R., Brix A., Geszinger A., Ginebreda H., Guasch M., Lopez de Alda A.M., Romani S. ve Barcelo D., 2009. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (NE Spain), *Environmental Toxicology and Chemistry* 10 (2): 1897-1992.
- Mwatibo J.M. ve Green J.D., 1998. Estradiol Disrupts Sea Urchin Embryogenesis Differently from Methoxychlor. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 61 (5): 577-582.
- Nemec M.D., Arce G.T., Holson J.F. ve Piccirillo V.J., 1993. Assesment of the Effect of Orally Administered Maneb Technical on Prenatal Development in the Rat. *Teratology.* 47 (5): 430.

- Ousterhout J., Struck R.F. ve Nelson J.A., 1981. Estrogenic Activities of Methoxychlor Metabolites. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2869–2871.
- Özbay G., Barlas N. ve Kolankaya D., 1991. Histopathological Effects of the Residual Maneb and Zineb in the Lettuces on the Liver and Kidney of Albino Mice. *Journal of Islamic Academy of Sciences.* 4 (4): 336-339.
- Özeti N. ve Yılmaz Y., 1994. *Türkiye Amfibileri.* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi. No: 151, İzmir. 1-57.
- Petrini S. ve Zaccanti F., 1998. The Effects of Aromatase and 5 a-reductase Inhibitors, Antiandrogen, and Sex Steroids on Bidder’s Organs Development and Gonadal Differentiation in *Bufo bufo* Tadpoles. *J. Exp. Zool.* 280: 245-259.
- Punzo F., 1997. The Effects of Azadirachtin on *Bufo quercus* tadpoles. *Florida Scientist.* 60 (3): 158-165.
- Rowe C.L., Hopkins W.A. ve Bridges C., 2003. Physiological Ecology of Amphibians in Relation to Susceptibility to Natural and Anthropogenic Factors. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press.* 9-58.
- Shimizu N., Aoyama H., Hojo H., Takahashi K.L., Kikuta M., Kushida H., Kawakatsu H. ve Teramoto S., 2001. Prenatal Developmental Toxicity Studies of 1, 1, 1-trichloro-2,2-bis(4-methoxyphenyl) ethane (methoxychlor) in Rats and Rabbits. *Congenital Anomalies.* 41: 329-337.
- Stöck, M., Moriiz C., Hickerson M., Frynta D., Dujsljayeva T., Eremchenko V., Macey J.R., Papenfuss T.J. ve Wake D.B., 2006. Evolution of Mitochondrial Relationship and Biogeography of Palearctic Green Toads (*Bufo viridis* subgroup) with Insights in Their Genomic Plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 41: 663-689.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L. ve Waller R.W., 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science.* 306: 1783- 1786.
- Şahin M., Gümüş A. ve Balcan E., 2008. Glycoconjugate Histochemistry of Mucous Glands in the Skin of Metamorphosing *Bufo viridis*. *Biologica.* 63 (3): 444-449.

- Tezcan H., 2009. Arılara Dost Fungusit Kullanımı. *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 9 (1): 32-38.
- Tuncer G., Karakaş T., Balkas T.I., Gökçay C.F., Aygün S., Yurteri C. ve Tuncel G., 1998. Land-based Sources of Pollution Along the Black Sea Coast of Turkey: Concentrations and Annual Loads to the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 36: 409-423.
- Tyler M.J., 1994. *Australian frogs. A natural history*. Revised Edition. Reed, Sydney. 1-32.
- Uluocak B.H. ve Egemen Ö., 2005. İzmir ve Aliğa Körfezinde Mevsimsel Olarak Avlanan Bazı Ekonomik Balık Türlerinde Organik Klorlu Pestisit Kalıntılarının Araştırılması. *Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 22 (1-2): 149-160.
- Vural N., 1996. *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. No: 73. Ankara. 1-130.
- Wells K.D., 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago. 1400 p.
- Witschi E., 1929. Studies on Sex Differentiation and Sex Determination in Amphibians. *The Journal of Experimental Zoology*. 52 (2): 235-253.
- Wyman R.L., 2005. What's Happening to the Amphibians. *Conservation Biology*. 4 (4): 350-352.
- Xu Q. ve Oldham R.S., 1997. Lethal and Sublethal Effects of Nitrogen Fertilizer Ammonium Nitrate on Common Toad (*Bufo bufo*) Tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32 (3): 298-303.
- Yılmaz İ., 1984. Trakya Kuyruksuz Kurbağaları Üzerine Morfolojik ve Taksonomik Bir Araştırma (Anura: Discoglossidae, Pelobatidae, Bufonidae, Hylidae, Ranidae). *TÜBİTAK Doğa Bilim Dergisi*. 8 (2): 244-264.
- Yin X.H., Li S.N., Zhang L., Zhu G.N. ve Zhuang H.S., 2008. Evaluation of DNA Damage in Chinese Toad (*Bufo bufo gargarizans*) After in vivo Exposure to Sublethal



Concentrations of Four herbicides Using the Comet Assay. *Ecotoxicology*. 17 (4): 280-286.

You J., Casanova M., Bartolucci E.J., Fryczynski M.W., Dorman D.C., Everitt J.I., Gaido K.W., Ross S.M. ve Heck H., 2002. Combined Effects of Dietary Phytoestrogen and Synthetic Endocrine-Active Compound on Reproductive Development in Sprague-Dawley Rats: Genistein and Methoxychlor. *Toxicol. Sci.* 66 (1): 91-104.

Zavanella T., Zaffaroni N.P. ve Arias E., 1984. Abnormal Limb Regeneration in Adult Newts Exposed to the Fungicide Maneb 80. A Histological Study. *J. Toxicol. Environ. Health*. 13 (6): 743-745.

## ÇİZELGELER

## Sayfa No

Çizelge 3.2.2.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarına maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik uygulamasına ait örnekleme tarihleri .....	23
Çizelge 3.2.2.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarına maneb ve metoksiklor pestisitlerinin kronik uygulamasına ait örnekleme tarihleri .....	23
Çizelge 3.2.2.3. <i>Bufo bufo</i> larvalarında maneb pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri .....	23
Çizelge 3.2.2.4. <i>Bufo bufo</i> larvalarında metoksiklor pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri .....	24
Çizelge 3.2.2.5. <i>Bufo viridis</i> larvalarında maneb pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri .....	24
Çizelge 3.2.2.6. <i>Bufo viridis</i> larvalarında metoksiklor pestisitinin kronik uygulamasında, gruplara göre maruziyet süreleri .....	25
Çizelge 4.1.1. <i>Bufo bufo</i> örneklerinin toplandığı suya ait bazı ekolojik veriler ...	29
Çizelge 4.1.2. <i>Bufo viridis</i> örneklerinin toplandığı suya ait bazı ekolojik veriler	29
Çizelge 4.1.3. <i>Bufo viridis</i> örneklerinin yumurtladığı suya ait bazı ekolojik veriler .....	30
Çizelge 4.1.4. <i>Bufo bufo</i> örneklerinin yumurtladığı suya ait bazı ekolojik veriler .....	31

Çizelge 4.2.1.3.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarında, maneb pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g/l}$ ) .....	48
Çizelge 4.2.1.3.2. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar .....	50
Çizelge 4.2.1.3.3. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler .....	51
Çizelge 4.2.1.3.4. <i>Bufo bufo</i> larvalarında, metoksiklor pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g/l}$ ) .....	53
Çizelge 4.2.1.3.5. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar .....	56
Çizelge 4.2.1.3.6. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler .....	57
Çizelge 4.2.2.3.1. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, maneb pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g/l}$ ) .....	72
Çizelge 4.2.2.3.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar .....	74
Çizelge 4.2.2.3.3. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler .....	75

Çizelge 4.2.2.3.4. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, metoksiklor pestisitine ait letal konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g/l}$ ) .....	77
Çizelge 4.2.2.3.5. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından ıslak ağırlık (g), total vücut uzunluğu (mm), en (mm) ve kuyruk uzunluğu (mm) değerlerine ait ortalamalar ve standart hatalar .....	80
Çizelge 4.2.2.3.6. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından gruplar arasındaki farkın ortaya koyulması amacıyla yapılan diskriminant analizine ait istatistiksel veriler .....	81
Çizelge 4.3.1.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, maneb pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki somatik yaş / gelişim evresi .....	82
Çizelge 4.3.1.2. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki somatik yaş / gelişim evresi .....	91
Çizelge 4.3.2.1. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, maneb pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 16.-48. somatik yaş / gelişim evresi .....	98
Çizelge 4.3.2.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, maneb pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 58.-83. somatik yaş / gelişim evresi .....	99
Çizelge 4.3.2.3. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 16.-48. somatik yaş / gelişim evresi .....	109
Çizelge 4.3.2.4. <i>Bufo viridis</i> larvalarında, metoksiklor pestisitinin kronik uygulanması neticesindeki 58.-83. somatik yaş / gelişim evresi .....	110

<b>ŞEKİLLER</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. Amfibilerde gonad farklılaşması .....	17
Şekil 3.1. Ampleksus halindeki <i>Bufo bufo</i> örnekleri .....	18
Şekil 3.2. Ampleksus halindeki <i>Bufo viridis</i> örnekleri .....	18
Şekil 3.1.1. Kordon halinde bırakılan döllenmiş <i>Bufo bufo</i> yumurtaları .....	19
Şekil 3.1.2. Kordon halinde bırakılan döllenmiş <i>Bufo viridis</i> yumurtaları .....	19
Şekil 3.2.1.1. Akut toksisite denemesine ait uygulama akvaryumları .....	21
Şekil 3.2.2.1. Kronik toksisite denemesine ait uygulama akvaryumları .....	22
Şekil 3.3.1. Morfolojik ölçümlere ait referans noktaları .....	26
Şekil 4.1.1. Ampleksus halindeki <i>Bufo viridis</i> örnekleri ve yumurtalar .....	30
Şekil 4.1.2. Döllenmiş <i>Bufo bufo</i> yumurtalarının havuzdan toplanması .....	31
Şekil 4.2.1.1.1. Kontrol grubu <i>Bufo bufo</i> larvaları .....	33
Şekil 4.2.1.1.2. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan 25. evre <i>Bufo bufo</i> larvasında düşük miktarda kuyruk deformasyonu .....	33
Şekil 4.2.1.1.3. 50 µg/l maneb uygulaması yapılan 27. evre <i>Bufo bufo</i> larvasında düşük miktarda kuyruk deformasyonu .....	33
Şekil 4.2.1.1.4. Kontrol ve maneb uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvaları .....	34

Şekil 4.2.1.1.5. Kontrol grubu ve maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarında kuyruk deformasyonları .....	35
Şekil 4.2.1.1.6. Kontrol ve 100 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvaları .....	36
Şekil 4.2.1.1.7. 50 µg/l metoksiklor uygulamasının yapıldığı 25. evre <i>Bufo bufo</i> larvası .....	36
Şekil 4.2.1.1.8. Kontrol ve metoksiklor uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarında kuyruk .....	37
Şekil 4.2.1.2.1. Kontrol grubu ve maneb uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler .....	38
Şekil 4.2.1.2.2. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvasında solungaçlardan geçen enine kesitte lamellar birleşmeler .....	39
Şekil 4.2.1.2.3. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarına ait karaciğerden geçen enine kesitlerdeki karaciğer nekrozları .....	40
Şekil 4.2.1.2.4. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarına ait pronefrik tübüllerden geçen enine kesitler .....	41
Şekil 4.2.1.2.5. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvasında notokorda defekti .....	42
Şekil 4.2.1.2.6. 5000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvasında notokorda defekti ve somit formasyonundaki bozulmalar .....	42
Şekil 4.2.1.2.7. Kontrol grubu ve metoksiklor uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo bufo</i> larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler .....	43

Şekil 4.2.1.2.8. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvasında, pronefrik tübüllerde, epitel hücre deformasyonu .....	44
Şekil 4.2.1.2.9. Kontrol grubu <i>Bufo bufo</i> larvası, somitlerden geçen enine kesit ....	45
Şekil 4.2.1.2.10. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvası, somit formasyonunda bozulmalar .....	45
Şekil 4.2.1.2.11. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvası, somit formasyonunda bozulmalar .....	46
Şekil 4.2.1.3.1. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı .....	47
Şekil 4.2.1.3.2. <i>Bufo bufo</i> larvalarına 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından probit grafiği .....	47
Şekil 4.2.1.3.3. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri .....	48
Şekil 4.2.1.3.4. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	49
Şekil 4.2.1.3.5. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	49
Şekil 4.2.1.3.6. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri .....	50
Şekil 4.2.1.3.7. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar .....	51

Şekil 4.2.1.3.8. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı .....	52
Şekil 4.2.1.3.9. <i>Bufo bufo</i> larvalarına 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından probit grafiği .....	53
Şekil 4.2.1.3.10. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri .....	54
Şekil 4.2.1.3.11. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	54
Şekil 4.2.1.3.12. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	55
Şekil 4.2.1.3.13. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri .....	55
Şekil 4.2.1.3.14. <i>Bufo bufo</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar .....	56
Şekil 4.2.2.1.1. Kontrol grubu, 28. evre <i>Bufo viridis</i> larvası .....	57
Şekil 4.2.2.1.2. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan, 26. evre <i>Bufo viridis</i> larvası ...	58
Şekil 4.2.2.1.3. 50 µg/l maneb uygulaması yapılan, 26. evre <i>Bufo viridis</i> larvası ...	58
Şekil 4.2.2.1.4. Kontrol ve maneb uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo viridis</i> larvaları	59
Şekil 4.2.2.1.5. Kontrol ve maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarına ait kuyruk .....	60



Şekil 4.2.2.1.6. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan, 27. evre <i>Bufo viridis</i> larvası .....	60
Şekil 4.2.2.1.7. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan 25. evre <i>Bufo viridis</i> larvasında visseral ödem .....	61
Şekil 4.2.2.1.8. Kontrol ve 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvaları .....	62
Şekil 4.2.2.1.9. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan 25. evre <i>Bufo viridis</i> larvasında omurga eğriliği .....	62
Şekil 4.2.2.2.1. Kontrol grubu ve maneb uygulamalarının yapıldığı <i>Bufo viridis</i> larvalarına ait iç organlardan geçen enine kesitler .....	63
Şekil 4.2.2.2.2. Kontrol grubu <i>Bufo viridis</i> larvası, karaciğerden geçen enine kesit	64
Şekil 4.2.2.2.3. 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, karaciğerden geçen enine kesitte nekroz .....	64
Şekil 4.2.2.2.4. Kontrol grubu <i>Bufo viridis</i> larvası, solungaçlardan geçen enine kesit .....	65
Şekil 4.2.2.2.5. 1000 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, solungaçlardan geçen enine kesitte operculum defekti .....	65
Şekil 4.2.2.2.6. 100 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, solungaçlardan geçen enine kesitte lamellar birleşmeler .....	66
Şekil 4.2.2.2.7. Kontrol grubu <i>Bufo viridis</i> larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesit .....	66

Şekil 4.2.2.2.8. 100 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo viridis</i> larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesitte, epitel hücresi deformasyonu .....	67
Şekil 4.2.2.2.9. 1000 µg/l maneb uygulamasının yapıldığı <i>Bufo viridis</i> larvası, pronefrik tübüllerden geçen enine kesitte, epitel hücresi deformasyonu .....	67
Şekil 4.2.2.2.10. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, iç organlardan geçen enine kesitte visseral ödem .....	68
Şekil 4.2.2.2.11. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, iç organlardan geçen enine kesitte visseral ödem .....	68
Şekil 4.2.2.2.12. 50 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, neural boruda deformasyon, notokorda defekti ve somit formasyonunda bozulmalar .....	69
Şekil 4.2.2.2.13. 100 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvası, neural boruda deformasyon, notokorda defekti ve somit formasyonunda bozulmalar .....	69
Şekil 4.2.2.2.14. Kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarında karaciğerden geçen enine kesitler .....	70
Şekil 4.2.2.3.1. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı .....	71
Şekil 4.2.2.3.2. <i>Bufo viridis</i> larvalarına 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından probit grafiği .....	71
Şekil 4.2.2.3.3. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (g) değerlerinin değişimleri .....	72

Şekil 4.2.2.3.4. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	73
Şekil 4.2.2.3.5. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	73
Şekil 4.2.2.3.6. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri .....	74
Şekil 4.2.2.3.7. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle maneb uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar .....	75
Şekil 4.2.2.3.8. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından, günlere bağlı olarak hayatta kalan birey sayısı .....	76
Şekil 4.2.2.3.9. <i>Bufo viridis</i> larvalarına 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından probit grafiği .....	77
Şekil 4.2.2.3.10. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait ıslak ağırlık (gr) değerlerinin değişimleri .....	78
Şekil 4.2.2.3.11. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait total vücut uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	78
Şekil 4.2.2.3.12. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait kuyruk uzunluğu (mm) değerlerinin değişimleri .....	79
Şekil 4.2.2.3.13. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması öncesi ve sonrasına ait en (mm) değerlerinin değişimleri .....	79
Şekil 4.2.2.3.14. <i>Bufo viridis</i> larvalarına, 120 saat süreyle metoksiklor uygulaması ardından total uzunluk ölçümlerine göre gruplar arasındaki farklar .....	81

Şekil 4.3.1.1. Kontrol ve maneb uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri .....	83
Şekil 4.3.1.2. 1; 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvalarında, pestisit konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi .....	83
Şekil 4.3.1.3. Kontrol grubu <i>Bufo bufo</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	84
Şekil 4.3.1.4. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	85
Şekil 4.3.1.5. 46. somatik yaşındaki <i>Bufo bufo</i> larvalarının maneb uygulamasına bağlı olarak hayatta kalan larva yüzdeleri .....	86
Şekil 4.3.1.6. Kontrol grubu 39. evre <i>Bufo bufo</i> larvasında pronefrik tübüller ve farklılaşmamış gonad taslağı .....	87
Şekil 4.3.1.7. Kontrol grubu 46. evre <i>Bufo bufo</i> larvasında mezonefroz böbrek ve testis .....	88
Şekil 4.3.1.8. Kontrol grubu 46. evre <i>Bufo bufo</i> larvasında mezonefroz böbrek ve ovaryum .....	88
Şekil 4.3.1.9. 46. somatik yaşındaki <i>Bufo bufo</i> larvalarında, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	89
Şekil 4.3.1.10. Metamorfozunu tamamlamış <i>Bufo bufo</i> larvalarının, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	90

Şekil 4.3.1.11. Kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri .....	92
Şekil 4.3.1.12. 0,1, 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvalarında, somatik yaş, metamorfoz süresi ilişkisi .....	92
Şekil 4.3.1.13. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo bufo</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	94
Şekil 4.3.1.14. <i>Bufo bufo</i> larvalarının 46. somatik yaşında metoksiklor uygulamasına bağlı olarak hayatta kalan larva yüzdeleri .....	95
Şekil 4.3.1.15. 46. somatik yaşındaki <i>Bufo bufo</i> larvalarında, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	96
Şekil 4.3.1.16. Metamorfozunu tamamlamış <i>Bufo bufo</i> larvalarının, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	97
Şekil 4.3.2.1. 83. somatik yaşındaki kontrol ve maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri .....	100
Şekil 4.3.2.2. 0,5, 1, 5 ve 10 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarında, uygulama konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi .....	100
Şekil 4.3.2.3. Kontrol grubu <i>Bufo viridis</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	102
Şekil 4.3.2.4. 10 µg/l maneb uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	103

Şekil 4.3.2.5. <i>Bufo viridis</i> larvalarının 83. somatik yaşında maneb uygulamasına bağlı olarak hayatta kalma yüzdeleri .....	104
Şekil 4.3.2.6. Kontrol grubu 39. evre <i>Bufo viridis</i> larvasında pronefrik tübüller ve farklılaşmamış gonad taslağı .....	105
Şekil 4.3.2.7. Kontrol grubu 46. evre <i>Bufo viridis</i> larvasında testis .....	105
Şekil 4.3.2.8. Kontrol grubu 46. evre <i>Bufo viridis</i> larvasında mezonefroz böbrek ve ovaryum .....	106
Şekil 4.3.2.9. 83. somatik yaşındaki <i>Bufo viridis</i> larvalarında, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	107
Şekil 4.3.2.10. Metamorfozunu tamamlamış <i>Bufo viridis</i> larvalarının, kontrol ve maneb uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları .....	108
Şekil 4.3.2.11. 83. somatik yaşındaki kontrol ve metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarında metamorfozu tamamlama yüzdeleri .....	111
Şekil 4.3.2.12. 0,5 ve 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvalarında, uygulama konsantrasyonu, metamorfoz süresi ilişkisi .....	111
Şekil 4.3.2.13. 1 µg/l metoksiklor uygulaması yapılan <i>Bufo viridis</i> larvaları somatik yaş / en ileri gelişim evresi fotoğrafları .....	112
Şekil 4.3.2.14. <i>Bufo viridis</i> larvalarının 83. somatik yaşında metoksiklor uygulamasına bağlı olarak hayatta kalma yüzdeleri .....	113

Şekil 4.3.2.15. 83. somatik yaşındaki *Bufo viridis* larvalarında, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları ..... 114

Şekil 4.3.2.16. Metamorfozunu tamamlamış *Bufo viridis* larvalarının, kontrol ve metoksiklor uygulama gruplarındaki, farklılaşmamış gonad taslağı, ovaryum ve testis gelişiminin görüldüğü larva sayıları ..... 115

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mert GÜRKAN  
Doğum Yeri : İzmir  
Doğum Tarihi : 14.09.1978

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLER

#### a) Yayınlar – \* SCI – Diğer (Uluslar arası)

\* **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. (2011). Morphological and histological effects of copper sulfate on the larval development of green toad, *Bufo viridis*. *Turkish Journal of Zoology* (Kabul edildi).

\* Çelik, İ., Çelik, P., Cirik, Ş., **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. (2011). Embryonic and larval development of black skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*, Boulenger, 1895) under laboratory conditions. *Aquaculture Research*. (Kabul edildi).

#### b) Bildiriler – \* Uluslar arası- Ulusal

\* **Gürkan, M.**, Tosunoğlu, M., Tok, C.V. (2004). Çanakkale Sarıçay Deltası'nın Avifaunası. 1. Uluslar arası Avrasya Ornitoloji Kongresi (8-11 Nisan), Antalya (Poster).

**Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. Ataşoğlu, C. (2008). Kefirin oğlaklarda duodenumun histolojik yapısı üzerine etkileri. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (23-27 Haziran), Trabzon (Poster).

**Gürkan, M.**, Topyıldız, H., Üstel, S., Hayretdağ, S., Konyalı, A. (2008). Türk Saanen ve Maltız ırkı keçilerde kotiledonların histolojik yapısı. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (23-27 Haziran), Trabzon (Poster).

\* **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. (2009). Bakır sülfat'ın gece kurbağası *Bufo viridis* Laurenti, 1768 (Salientia: Bufonidae) larvaları üzerine toksik etkileri. 7. Toksikoloji Kongresi (29 – 31 Mayıs), Ankara (Poster).



\* Topyıldız, H., **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. (2009). *Vipera xanthina* zehrinin sıçanların deri, kas ve karaciğer dokuları üzerine toksik etkilerinin incelenmesi. 7. Toksikoloji Kongresi (29 – 31 Mayıs), Ankara (Poster).

Yurtman, İ. Y., Gamlı, G., Tölu, C., **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S., Savaş, T., Ataşoğlu, C. (2009). Açlığın güvercinlerde bazı organ ağırlıkları ve koksidiyal yük üzerindeki etkileri. 6. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi (24-26 Haziran), Erzurum (Tam metin bildiri).

**Gürkan, M.**, Topyıldız, H., Hayretdağ, S. (2010). Sıçanların kalp, akciğer ve böbrek dokuları üzerine *Vipera xanthina* zehrinin toksik etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (21-25 Haziran), Denizli (Poster).

**Gürkan, M.**, Hayretdağ, S. (2010). *Bufo viridis* LAURENTI, 1768 (Salientia: Bufonidae) larvalarının gelişimleri üzerine morfolojik ve histolojik incelemeler. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (21-25 Haziran), Denizli (Poster).

Yurtman, İ. Y., Gamlı, G., Tölu, C., **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S., Savaş, T., Ataşoğlu, C. (2010). Sütten kesim öncesi dönemde probiyotik tüketen oğlaklarda rumenin morfometrik yapısı. Ulusal Keçicilik Kongresi (24-26 Haziran), Çanakkale (Tam metin bildiri).

Yurtman, İ. Y., Gamlı, G., Tölu, C., **Gürkan, M.**, Hayretdağ, S., Savaş, T., Ataşoğlu, C. (2010). Süt emen oğlaklarda probiyotik tüketiminin ince bağırsağın morfometrik yapısı üzerine etkileri. Ulusal Keçicilik Kongresi (24-26 Haziran), Çanakkale (Tam metin bildiri).

### c) Katıldığı projeler

Kefir Uygulamasının Açlık Sonrasında Güvercinlerde Performans; Sağlık ve Bağırsak Histolojisine Etkileri. ÇOMÜ-BAP.

Maneb ve Metoksiklorun, *Bufo bufo* (LINNAEUS, 1758) ve *Bufo viridis* LAURENTI, 1768 (Salientia: Bufonidae) Populasyonlarında Larva Gelişimi ve Üreme Sistemi Üzerine Etkileri. ÇOMÜ-BAP.

### İŞ DENEYİMİ

06.01.2004 - 30.05.2011: Araştırma Görevlisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

01.06.2011 - Devam ediyor: Araştırma Görevlisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi.

## **İLETİŐİM**

mertgurkan@comu.edu.tr