

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR KAYISI BAHÇESİNDE MEVSİMLİK DÜZENLİ PESTİSİT
UYGULAMASININ TOPRAK SOLUCANLARINA
“*LUMBRICUS SP.*” ETKİSİNİN İZLENMESİ

ERTAN YOLOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
TEMMUZ 2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürilerimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ
(Başkan)

.....
Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
(Üye)

.....
Prof. Dr. Murat ÖZMEN
(Üye)

.....
Onay
Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../..../2006

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİR KAYISI BAHÇESİNDE MEVSİMLİK DÜZENLİ PESTİSİT UYGULAMASININ TOPRAK SOLUCANLARINA “*LUMBRICUS SP.*” ETKİSİNİN İZLENMESİ

ERTAN YOLOĞLU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

61 + x sayfa

2006

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Bu çalışmada, kayısı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan metil paratyon (insektisit), bakır oksiklorür (fungusit), tebukonazol (fungusit) ve thiram'ın (fungusit) tarımsal amaçlı kullanımı sonucu neden olduğu toprak kirliliğinin, hedef olmayan toprak canlıları üzerindeki etkilerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla bir kayısı bahçesinde ağaçlara düzenli mevsimsel ilaçlamanın toprak solucanı (*Lumbricus sp.*) üzerine etkileri, biyokimyasal belirteçler kullanılarak izlendi. Çalışma alanı bölgelere ayrılarak (Ana uygulama alanı, fungusit alanı, insektisit alanı ve insektisit + fungusit alanı), 2005 ilkbahar döneminde ilaçlama yapıldı. Mart 2005’de yapılan ilk uygulamada metil paratyon + bakır oksiklorür karışımı kullanıldı. Nisan 2005’de yapılan ikinci uygulamada ise tebukonazol uygulandı. Mayıs 2005’de yapılan üçüncü uygulamada ise metil paratyon + thiram karışımı spreylendi. Her uygulamadan sonra çalışma alanından 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde periyodik olarak alınan toprak solucanı örneklerinde mikrozomal bir enzim olan etoksiresorufin-O-deetilaz (EROD) ve sitozolik enzimler olan glutatyon-S-transferaz (GST), karboksilesteraz (CE) ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri saptandı.

Bütün pestisit uygulamalarını takip eden 1. günde bütün bölgelerde bazı enzim aktivitelerinde değişiklikler saptandı. Araştırma sonuçlarımız, pestisit karışımının toprak solucanları üzerine, pestisitlerin tek tek uygulanmasından daha etkili olduğunu göstermektedir. Mikrokosm düzeyinde değerlendirilen ekotoksikolojik etkilerin sonucunda biyobelirteç olarak seçilen EROD, AChE ve CE enzimlerinin uygun belirteçler olduğu sonucuna da varılmıştır. Ayrıca, kullanılan pestisitlerin toprak kirliliğine neden olduğu, toprakta hedef olmayan organizmalar açısından olumsuz etkilere yolaçtığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: pestisit, toprak solucanı, *Lumbricus sp.*, toksik etki

ABSTRACT

Master Thesis
(MSC)

EFFECT OF SEASONAL-REGULAR PESTICIDE APPLICATION ON EARTHWORM “*LUMBRICUS SP.*” IN AN APRICOT ORCHARD

ERTAN YOLOĞLU

Department of Biology
Institute of Natural Sciences
Inonu University

61 + x pp.

2006

Supervisor: Prof.Dr. Murat ÖZMEN

In this study, Common pesticides; methyl parathion (as an insecticide), copper oxychloride (as a fungicide), tebuconazole (as a fungicide) and thiram (as a fungicide) were used to determine the effects on non-target organisms. The effects of selected pesticides on earthworm (*Lumbricus sp.*) were determined using selected biochemical markers. The study area was divided into four regions (main study area, fungicide area, insecticide area and insecticide+fungicide area) and pesticides were applied at early spring-2005. Parathion methyl + copper oxychloride was used in first application (March 2005) into the main study area. The second pesticide application was done at April-2005 and tebuconazole was used. Final pesticide sprayed at May-2005 and mixture of parathion methyl + thiram was used in this case. Earthworm samples were collected from each application area and other areas at 1st, 3rd, 5th, 7th and 10th days after pesticide applications. The earthworm samples were used to determine ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathion-S-transferase (GST), carboxylesterase (CE) and acetylcholinesterase (AChE) activities from microsomal or cytosolic preparates.

Some enzyme activities were changed in all application areas at 1st day after all of the pesticide applications. Results also showed that, pesticide mixture is more effective than simple application of selected chemicals on earthworm. It is also decided that, selected biomarkers EROD, AChE and CE are the suitable enzymes to determine the effects of this kind of pesticide exposure in an apricot orchard, in this ecotoxicological microcosm study. The pesticides used in this study caused soil pollution and affects adversely to this non-target organisms in the ecosystem.

KEYWORDS: pesticide, earthworm, *Lumbricus sp.*, toxic effect

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmanın yapılmasını sağlayan İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e, istatistiksel analizlerde sağladığı destek için Sayın Doç. Dr. Saim YOLOĞLU'na, araştırmanın yapıldığı Kayısı Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Bayram Murat ASMA'ya, projeyi (2005/65) destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu'na, çalışmamın her aşamasında yanımda olan Sayın Arş.Grv. Abbas GÜNGÖRDÜ' ye ve emeği geçen bütün arkadaşlarıma,

Ve...

Her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan **AİLEME**,

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Toprak Kirliliği.....	1
1.2. Pestisitler.....	5
1.3. Pestisitlerin Özellikleri.....	5
1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	7
1.4.1. Hedef Organizmaya Göre Sınıflandırma.....	7
1.4.2. Fizikokimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırma.....	7
1.4.3. İnsektisitler.....	8
1.4.4. Fungusitler.....	10
1.5. Toprak Solucanı (<i>Lumbricus Sp.</i>).....	12
1.6. Biyobelirteç Olarak Seçilen Enzimler.....	17
1.6.1. Asetilkolinesteraz.....	17
1.6.2. Glutasyon-S-Transferaz.....	19
1.6.3. Karboksilesteraz.....	19
1.6.4. Etoksiresorufin-O-deetilaz.....	20
2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Pestisitler ve Uygulama.....	27
3.2. Toprak Solucanı Örneklerinin Sağlanması.....	27
3.3. Toprak Solucanı Homojenatlarının Hazırlanması.....	28
3.4. Enzimatik Çalışmalar.....	29
3.4.1. Sitozolik Karboksilesteraz Aktivitesi.....	29
3.4.2. Sitozolik Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi.....	30

3.4.3.	Sitozolik Asetilkolinesteraz Aktivitesi.....	31
3.4.4.	Mikrozomal Etoksiresorufin-O-deetilaz Aktivitesi.....	31
3.4.5.	Mikrozomal ve Sitozolik Total Protein Tayini.....	31
3.5.	İstatistiksel Analiz.....	31
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1.	Tomurcuk Döneminde Uygulanan Metil paratyon ve Bakır oksiklorür'ün Toprak Solucanları Üzerine Etkileri.....	33
4.2.	Çiçek Döneminde Uygulanan Tebukonazol'ün Toprak Solucanları Üzerine Etkisi.....	38
4.3.	Meyve Döneminde Uygulanan Thiram ve Metil Paratyon'un Toprak Solucanları Üzerine Etkileri.....	44
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
6.	KAYNAKLAR.....	54
	ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Metil paratyon'un yapısal formülü.....	9
Şekil 1.2	TMTD'nin yapısal formülü.....	11
Şekil 1.3	Tebukonazol'ün yapısal formülü.....	12
Şekil 1.4	Bazı Epijeik, Endojeik ve Anesik türler.....	13
Şekil 1.5	<i>Lumbricus terrestris</i> türü toprak solucanı.....	15
Şekil 1.6	Asetilkolin'in genel kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.7	Asetilkolin ve Asetilkolinesteraz arasındaki hidroliz reaksiyon.....	18
Şekil 4.1	Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.2	Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında EROD aktivitesi üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.3	Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında GST aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.4	Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında CE aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.5	Tebukonazol'ün toprak solucanlarında AChE aktivitesi üzerine etkisi....	39
Şekil 4.6	Tebukonazol'ün toprak solucanlarında EROD aktivitesi üzerine etkisi...	41
Şekil 4.7	Tebukonazol'ün toprak solucanlarında GST aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.8	Tebukonazol'ün toprak solucanlarında CE aktivitesi üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.9	Thiram ve metil paratyonun AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.10	Thiram ve metil paratyonun EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.11	Thiram ve metil paratyonun GST enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.12	Thiram ve metil paratyonun CE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	49

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.1	Yıllara göre pestisitlere karşı dirençli hale gelen tür sayısındaki artış.....	2
Tablo 1.2	Bazı kirlilik kaynakları ve kirleticileri.....	3
Tablo 1.3	Bazı pestisitlerin yarılanma süreçleri.....	6
Tablo 1.4	Bazı yaygın pestisitlerin toprak solucanlarına toksisitesi.....	10
Tablo 4.1	Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	33
Tablo 4.2	Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	35
Tablo 4.3	Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	36
Tablo 4.4	Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	37
Tablo 4.5	Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	39
Tablo 4.6	Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	40
Tablo 4.7	Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	42
Tablo 4.8	Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	43
Tablo 4.9	Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	45
Tablo 4.10	Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	46
Tablo 4.11	Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	47
Tablo 4.12	Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde 10 gün süre ile gözlenen değişimler.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

OP	Organofosfor
PM	<i>O,O</i> -dimetil- <i>O</i> -4-nitrofenil fosforotiyoat
TMTD	Tetrametilthiuram disulfide
CYP450	Sitokrom P450
ChE	Kolinesteraz
AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Bütirilkolinesteraz
GST	Glutatyon-S-Transferaz
GSH	Redükte glutatyon
CE	Karboksilesteraz
hCE	Hepatik karboksilesteraz
EROD	Etoksiresorufin- <i>O</i> -deetilaz
PROD	Pentoksiresorufin- <i>O</i> -deetiaz
BROD	Benzoksiresorufin- <i>O</i> -deetiaz
GOT	Glutamik-oksaloasetik transaminaz
GPT	Glutamik-piruvik transaminaz
ACP	Asit fosfataz
ALP	Alkalın fosfataz
SOD	Süperoksit dismutaz
Cyp 1A	Sitokrom P4501A
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PCB	Poli Klorlu Bifenil
BaP	Benzo[a]pyrene
KCl	Potasyum klorür
CDNB	1-kloro2-4dinitrobenzene
PNPA	Paranitrofenolasetat
ACTI	Asetilthiokoliniodid
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum
DTT	Dithiothreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis -2-nitrobenzoik asit
OD	Optik Densite

1.GİRİŞ

1.1. Toprak Kirliliği

Tarımsal üretimin miktar ve kalitesinin artırılması amacıyla yapay gübreler, pestisitler, toprak düzenleyicileri ve hormonların kullanılması, katı ve sıvı atıkların deşarjı, atık çamur uygulamaları, kirli suların tarımsal sulamada kullanılması, atmosferik çökelmeler ve radyoaktif serpintiler gibi girişimler sonucu topraklar kirlenmektedir. Bunun sonucu toprakların verimli ve sorunsuz kullanılabilme yeteneklerinin sınırları daralmakta, her geçen gün sorun artarak devam etmektedir. Diğer taraftan, toprakların doğal yapıları içinde bulunan asbest gibi kirleticilerde toprak kirliliğinin başka bir sorunudur [1, 2].

Yüzyıllardır insanlar, hem besin kaynaklarını hem de sağıklarını korumak amacı ile çeşitli zararlıları kontrol altında tutmaya çalışmışlardır. Örneğin; Kükürdün, çok eski zamanlarda dahi fungusit olarak kullanıldığına ilişkin bilgiler vardır. Günümüzde de kükürt önemli bir pestisit olarak meyvecilikte kullanılmaktadır [3]. Yine 1940'lerden önce birkaç farklı çeşitte pestisit bulunmaktaydı. Bunların çoğu bitkilerden elde edilen nikotin ve kafein gibi nispeten kolay yıkılabilen organik bileşiklerdi. Zararlı böcek kontrolündeki büyük bir yenilik, DDT gibi sentetik organik kimyasal maddelerin 1939 yılında kullanılmaya başlaması ile gerçekleşmiştir. Ancak DDT ve benzeri sentetik pestisitler biyolojik olarak yükseltgenmesinden dolayı, sucul ve karasal hayvanlar ile insanların yağ dokularında birikmektedir. İnsanlar üzerindeki bu tür olumsuz etkileri nedeni ile önce ABD' de 1972 yılında, daha sonraki yıllarda ise Avrupa'da ve ülkemizde kullanımları yasaklanmıştır [2, 4]. Tarımsal mücadelede insektisit olarak kullanılan DDT ve benzeri kimyasal maddeler, bir taraftan kalıcılıkları nedeni ile çevresel kirliliğe neden olurken, diğer taraftan da kullanıldığı organizmalarda direnç sorunu gelişmeye başlamıştır. Tarımsal mücadelede kullanılan pestisitlerin zamanla çeşitliliğinin artmasına bağılı olarak pestisitlere karşı artan dirençli tür sayısı Tablo 1.1' de gösterilmektedir [5].

Tablo 1.1 Yıllara göre pestisitlere karşı dirençli hale gelen tür sayısındaki artış

<u>Yıl</u>	<u>Dirençli tür sayısı</u>
1945	15
1950	20
1955	25
1960	150
1965	200
1970	300
1975	350
1980	400
1990	467

Günümüzde dünya nüfusunun artmasına bağlı olarak tarımsal üretimi artırmak amacı ile zirai ilaçların bilinçsizce kullanımı giderek artmaktadır. Dünya'daki karasal ve sucul ekosistemleri ve bu ekosistemlerde yaşayan canlıları tehdit eden en önemli sorunlardan biri, zirai mücadelede kullanılan bu pestisitler ve diğer kimyasallardır. Karasal ekosistemlerin yararları göz önüne alındığında, zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin zararları da ortaya çıkacaktır. Bunun sonucu olarak, sentetik kimyasallar ve pestisitler hedef olmayan canlıları olumsuz bir şekilde etkilemekte ve ekosistemin yapısını bozmaktadır [2]. Çevreye bırakılan kimyasallar, ekosistemin normal fonksiyonlarını kısa veya uzun süreli olarak ve geçici ya da kalıcı şekilde değiştirebilirler. Sonuçta ekonomik, sosyal ve çevresel kayıplara neden olurlar [6]. Bu potansiyel etkilerin en önemli sebepleri pestisitlerin, toksik maddelerin ve diğer kirlilik kaynaklarının çoğunlukla bir hedef seçiciliklerinin olmamasıdır (Tablo 1.2).

Tablo 1.2 Bazı kirlilik kaynakları ve kirleticileri

Kirlilik Kaynakları	Kirleticiler
Kentsel ve Endüstriyel atıklar, Sıvı Gübreler	Nitratlar, Fosfatlar, Ağır Metaller, Boyalar, Fenoller, Diğer organik kirleticiler ve Patojen mikroorganizmalar
Pestisit Kullanımı	Az veya Çok dirençli bileşikler (organofosforlu bileşikler, karbamat bileşikler)
Endüstri	Ağır Metaller, Hidrokarbonlar, Asitler, Solventler, Radyoaktif maddeler vb.
Kentsel ve Endüstriyel Atmosferik Kirlilik Kaynaklı Olarak	Ağır Metaller, Dioksinler, Asitler vb.
Hidrokarbon Depolanan Alanlar (Gaz istasyonlarından yağ depolarına kadar)	Hidrokarbonlar
Çöplük Alanları	Ağır Metaller, Mikroorganizmalar, Asitler, Endüstriyel atıklarla bağlantılı olarak oluşan çeşitli kimyasallar, vb.
Cephanelikler ve Eski Savaş Alanları	Kompleks ve dirençli bileşikler

Gerek bitkiler üzerine, gerekse doğrudan toprağa verilerek yapılan pestisit uygulamasından mikro ve makro toprak flora ve faunası etkilenir. Mikroorganizmalar, topraktaki çeşitli bileşikleri etkileyerek ekosistemde mineral madde döngüsünün sağlıklı bir şekilde işlenmesini sağlar. Toprak canlılarının tümünü ortadan kaldıracak geniş etkili pestisit yoktur denilebilir. Bununla birlikte yoğun olarak kullanılan pestisitler ve bunların metabolitleri; bakteriler, funguslar ve omurgasız hayvanlar gibi çeşitli canlı grupları üzerinde öldürücü etki yapabilir. Sonuçta toprağın havalanması, nitrifikasyon, mineralizasyon, toprağın taneli yapı kazanması, kök nodüllerinin oluşması gibi olaylar olumsuz olarak etkilenebilir [7].

Farklı kimyasal bileşimlere sahip binlerce insektisit, günümüzde dünyanın her yerinde tarım ürünlerini zararlı böceklerle karşı korumak için kullanılmaktadır. Hedef böcekler için kullanılan insektisit miktarı, kullanılan toplam pestisit miktarının küçük bir yüzdesidir [8, 9]. Tarımda kullanılan bu pestisitlere kaçınılmaz olarak hedef olmayan organizmaların da maruz kalması nedeniyle, birçok faydalı tür ve onların

aktivitelerinde istenmeyen etkiler meydana gelebilir [10]. Pestisitlere maruz kalmanın değerlendirilmesi, hedef olmayan organizmalar üzerine toksik maddelerin potansiyel etkilerinin anlaşılmasını sağlar [11].

Tarımsal mücadelede kullanılan pestisitlerin, karasal ekosistem üzerine olumsuz etkilerinden dolayı son dönemlerde ekotoksikoloji çalışmaları önem kazanmıştır. Pestisitlerin toprak organizmaları üzerine etkileriyle ilgilenen ekotoksikite çalışmaları, pestisitlerin toksisitesini ve karasal ekosistem üzerine bu çevresel kirleticilerin potansiyel riskini değerlendirebilmemiz için gereklidir [12].

Toprak solucanları, toprakta hem besin zincirindeki önemi hem de toprak üzerindeki fiziksel etkileri nedeniyle önemli organizmalardır. Toprağın verimliliği ve bitki üretimi üzerinde önemli etkiye sahip olan bu organizmalar ekolojik tarımında en önemli unsurlarından birisidir. Beslenmeleri ve galeri açma faaliyetleri yoluyla toprağın dengesini olumlu yönde geliştirebilen, su geçirgenliğini (su infiltrasyonunu) artırabilen, yüzeye uygulanan organik madde, kireç ve gübrelerin toprakla karışmasını hızlandırabilen bu organizmalar, toprağın gözenekliliğini de artırabilirler. Bunun yanı sıra, bitki kök gelişimini desteklerken, kök hastalıklarının oranını da önemli ölçüde azaltabilirler. Toprak solucanları bu faaliyetleriyle yıllık üretim miktarını ve özellikle tahıl üretiminde kaliteyi artırıcı bir etki yapmaktadırlar [13]. Toprak solucanlarının, topraktaki azot çevriminde, erozyonun azaltılmasında da rolleri vardır. Araştırmalar, açtıkları galeriler nedeniyle bu canlıların eğimli çayırarda yüzey suyu akışını yarı yarıya azalttıklarını, böylece suyun yüzeyde akışını önemli ölçüde engelleyerek erozyonu önlediklerini göstermektedir [14].

Pestisitler gibi çevresel kirleticilerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak için, toprak solucanları en uygun organizmalardan biri olarak görülmektedir [15, 16]. Toprak solucanları, toprak altında yaşayan hayvanların toplam biyokütlesinin %60'ı ile %80'ini temsil etmektedir [17]. Ayrıca, toprak solucanları birçok organik maddenin parçalanmasına ve toprak verimliliğine de katkıda bulunurlar [18]. Bu nedenlerden dolayı, toprak solucanlarının, toprak organizmaları üzerine pestisitler gibi kimyasal maddelerin etkilerinin saptanması için kullanılması uygun ve yararlıdır.

Birçok çalışma, toprak solucanlarının yaşaması, gelişmesi, üremesi, metabolizması, enzim aktiviteleri ve sinir sistemi üzerine organofosforlu, organoklorlu ve karbamat pestisitlerin baskılayıcı etkilerini göstermektedir [19]. Toprak günümüzde çok çeşitli unsurlar ile kirlendiğinden, kirlilik etmenlerine en çok maruz kalan bu

organizmaların, özellikle tarım alanlarında sistemik olarak pestisit uygulamasını takiben, nasıl bir etkiye maruz kaldıklarının biyolojik izleme yöntemleri çerçevesinde ele alındığı bir araştırma ise literatür kayıtlarında bulunmamaktadır. Birçok tarım alanında, özellikle meyvecilikte bir dönem içinde çeşitli pestisitler birbirini takiben kullanılmaktadır. Yöremizde en önemli tarımsal faaliyetlerden biri olan kayısı yetiştiriciliğinde de çok çeşitli pestisitler, erken bahar aylarından itibaren, ürün hasadı sona erece kadar çeşitli aşamalarda uygulanmaktadır.

Bu çalışmada, yöremizde kayısı yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılan, metil paratyon (insektisit), bakır oksiklorür (fungusit), tebukonazol (fungusit) ve thiram'ın (fungusit) sistemik şekilde uygulamasının toprak solucanları (*Lumbricus sp.*) üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bu pestisitlerin toksik etkilerinin saptanması amacı ile toprak solucanlarından *Lumbricus* cinsine ait organizmalar biyoindikatör olarak kullanılmıştır.

Buna bağlı olarak test edilen organizmaların uygulanan pestisitlere karşı verdiği yanıtlar çeşitli biyobelirteçler kullanılarak saptanmıştır. Çevre ekotoksikolojisinde en fazla kullanılan biyobelirteçler, ksenobiyotiklerin ve bunların metabolitlerinin biyotransformasyonuna katılan enzimlerinin aktivitelerindeki değişikliklerdir [20]. Çalışmamızda da, kullandığımız pestisitler için bazı biyotransformasyon enzimlerinin biyobelirteç olarak değerlendirilmesinin de uygulamaya bağlı enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

1.2. Pestisitler

Günümüzde kullanılan pestisitlerin hedef organizmalar kadar hedef olmayan organizmalar üzerinde de olumsuz etkilere yol açtıkları bilinmektedir. Bu nedenle bu türden maddelere **Biyosit** adı da verilebilir. Çevre Koruma Kurumu (U.S. EPA)'nın tanımına göre; pestisitler, tarımsal üretimi olumsuz şekilde etkileyen herhangi bir zararlıyı öldürmeyi, uzaklaştırmayı ve azaltmayı amaçlayan maddelerin karışımı olan veya tek başına kullanılan bir maddedir [21, 22].

1.3. Pestisitlerin Özellikleri

Pestisitlerin özellikleri, çevredeki davranışlarının ve akıbetlerini tanımlanmasında oldukça önemlidir [6]. Bu özellikler;

Yarılanma Ömürleri; Ortamda bulunan pestisitlerin toplam miktarının yarısının ortamdan uzaklaştırılması için geçen süreye “yarılanma ömrü” ($T_{1/2}$) denir. Yarılanma ömrünün uzaması, pestisitlerin dirençliliğinin artması anlamına gelmektedir. Yarılanma ömrü, maddenin kimyasal yapısına bağlı bir özellik olmasına rağmen, çeşitli çevresel ve uygulama faktörleri yarılanma ömrünü etkiler [23]. Tablo 1.3 çeşitli pestisitler için yarılanma süreçlerini göstermektedir [6].

Tablo 1.3 Bazı Pestisitlerin Yarılanma Süreçleri

Düşük Düzeyde Dirençli ($T_{1/2}$ <30 gün)	Orta Düzeyde Dirençli ($T_{1/2}$ 30-100 gün)	Yüksek Düzeyde Dirençli ($T_{1/2}$ >100 gün)
Aldikarp	Aldrin	DDT
Kaptan	Atrazin	Bromasil
Dalapon	Karbaril	Klordan
Dicamba	Karbofuran	Lindan
Malatyon	Diazinon	Pikloram
Metil paratyon	Endrin	Trifluralin
Oksamil	Paratyon	Paraquat

Topraktaki Tutunmaları; Bütün pestisitler, toprak partiküllerine bağlanma eğilimindedir. Pestisitlerin toprağa bağlanmasında, toprağın yapısal özellikleri ve pestisitlerin kimyasal özellikleri önemli bir role sahiptir.

Suda Çözünübilirlikleri; Birçok pestisit, hedef organizma tarafından absorbe edilebilmeleri ve su ile birlikte uygulanabilmeleri için suda çözünübilir olmaları ticari bakımdan önem taşımaktadır. Buna karşın, pestisitlerin suda çözünübilirliği arttıkça, yıkanma yani toprağa ve su kaynaklarına bulaşma riski artar. Suda çözünübilirliği azaldığında ise toprak partiküllerine bağlanma riski artmaktadır [24].

Pestisitlerin bu üç özelliği, uygulamadan sonra pestisitlerin yağmur suları veya sulama suları ile yüzeyden yıkanma veya yer değıştirme miktarlarının tanımlanmasında önemli bir rol oynarlar [25].

1.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, hedef organizmaya, etki şekillerine, generasyonlarına, nasıl/ne zaman etki gösterdiklerine, fizikokimyasal özelliklerine ve spektrumuna göre birçok farklı şekilde sınıflandırılabilirler [22].

1.4.1. Hedef Organizmaya Göre Sınıflandırma;

- 1-İnsektisitler (Zararlı böcekleri öldürenler)
- 2- Herbisitler (Yabancı otları yok edenler)
- 3- Fungusitler (Fungusları öldürenler)
- 4- Rodentisitler (Kemiricileri öldürenler)
- 5- Akarisitler (Akarları öldürenler)
- 6- Nematositler (Nematodları öldürenler)
- 7- Molluskisitler (Yumuşakçaları öldürenler)
- 8- Mitisitler (Keneleri öldürenler)
- 9- Algisitler (Algleri öldürenler)
- 10- Bakterisitler (Bakterileri öldürenler)

Pestisitlerin hedef organizmaya göre sınıflandırılması, mücadele edilecek zararlı göz önünde bulundurularak birçok farklı şekilde yapılabilir. Günümüzde kullanılan pestisitler içinde özellikle insektisitler, herbisitler, fungusitler ve rodentisitler ilk sırayı almaktadır [21, 26].

1.4.2. Fizikokimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırma;

Pestisitlerin fizikokimyasal özellikleri, pestisitın uygulanma şekli ve seçilen hedef tarafından kolay bir şekilde absorbe edilmeleri açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle pestisitler, fizikokimyasal özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir [27]. Bunlar;

- 1- Suda çözünen toz şeklindeki pestisitler
- 2- Solüsyon halindeki pestisitler
- 3- Granüler haldeki pestisitler
- 4- Toz halindeki pestisitler
- 5- Pellet şeklindeki pestisitler
- 6- Fumigantlar
- 7- Jel şeklindeki pestisitler

1.4.3. İnsektisitler

Zararlı böcekleri uzaklaştırmak, azaltmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ajanlardır. İnsektisitler, kimyasal yapılarına göre başlıca 5 gruba ayrılmaktadırlar [22]. Bunlar;

- 1- İnorganik İnsektisitler
- 2- Organoklorlu İnsektisitler
- 3- Organofosfatlı İnsektisitler
- 4- Karbamat insektisitler
- 5- Piretroitler

Yaygın olarak kullanılan insektisitler arasında karbamatlar, toprak solucanları için en toksik ve en ölümcül olan insektisitlerdir. Uygulamada önerilen çok küçük konsantrasyonlarda dahi şiddetli bir şekilde toprak solucanı popülasyonunun azalmasına neden olabilir [28].

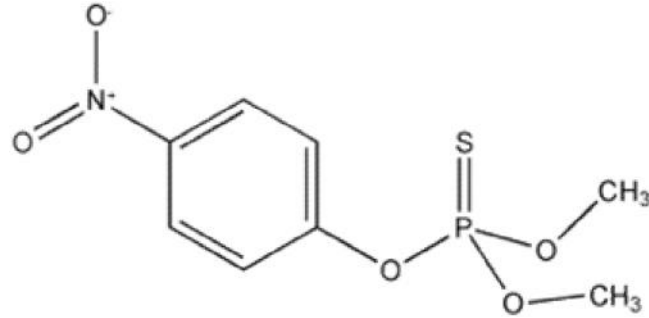
Organofosforlu pestisitler (OP), bütün dünyada en yaygın olarak kullanılan pestisitler arasındadır [29]. OP'ler en toksik maddeler arasındadır ve bu nedenle kimyasal mücadele ajanları ve pestisit olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. OP'ler AChE enzimine bağlanarak sinirsel iletimi bozarlar ve sonuçta felç ve ölüme neden olurlar [30]. Organofosforlu bileşikler içinde toprak solucanları için en toksik insektisit phorate'dir. Normal önerilen dozlarda dahi bu kimyasalın toprak solucanı popülasyonlarını yok ettiğine ilişkin raporlar vardır. Buna karşılık, klorpiyrifos, isofenfos ve triklorofon, normal oranlarda uygulandığı zaman toprak solucanları için toksik değildir. Azinfosmetil, klorfenvinfos, malatyon ve fenitrotrion'unda normal dozajlarda kullanıldığında toprak solucanlarına önemli bir etkisi bulunmadığı iddia

edilmektedir [28]. Toprak solucanları için toksik olan bazı pestisitlerin toksisite seviyesi Tablo 1.4’ de verilmiştir [28].

Metil paratyon (*O,O*-dimetil-*O*-4-nitrofenil fosforothioate, PM), zararlı böcek kontrolünde yaygın olarak kullanılan organofosfatlı bir insektisit ve akarisit. PM, EPA’nın sınıflandırılmasına göre de, toksisite sınıf-1’de yani en toksik maddeler arasında gösterilen bir insektisittir [30]. Metil paratyon’un yapısal formülü Şekil 1.1’ de gösterilmektedir.

Paratyon, sistemik olmayan organofosfatlı bir insektisittir. Orta düzeydeki toksisitesine karşın, en yaygın şekilde kullanılan pestisitlerden biridir. 1991’de paratyon, sınırlı kullanılan bir pestisit olmuştur. Paratyon, bitkiler tarafından iyi bir şekilde tolere edilir, topraktan kolay bir şekilde yıkanmaz ve toprak mikroorganizmaları tarafından haftalar içinde metabolitlere dönüştürülür ve yıkılır [31].

Organofosfatlar da karbamatlar kadar, birçok hayvanda sinaptik boşluklardaki sinir impulslarının iletiminde önemli bir bileşen olan asetilkolin molekülünü taklit ederler. Organofosfatların ve karbamatların bulunması, asetilkolinin yıkılmasının baskılanması nedeni ile kolinesterazın fosforilasyonu ile sonuçlanır [28].



Şekil 1.1 Metil paratyon’ un yapısal formülü

Tablo 1.4 Bazı yaygın pestisitlerin toprak solucanlarına toksisitesi

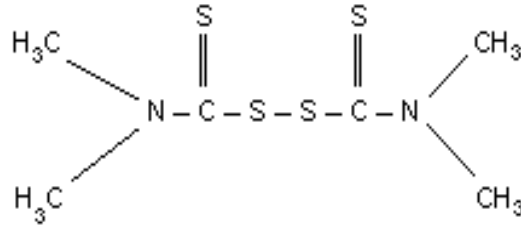
Pestisit Grubu	Kimyasal Adı	Etkisi
<u>İnsektisitler</u> Oganoklorlu İnsektisitler	Klordan Endosulfan Aldrin Dieldrin	Çok toksik Çok toksik Yüksek dozlarda toksik Yüksek dozlarda toksik
Organofosforlu İnsektisitler	Phorate Metil paratyon Malatyon Triklorfon	Normal dozlarda çok toksik Kısmen toksik Normal dozlarda toksik değil Normal dozlarda toksik değil
Karbamat İnsektisitler	Aldikarp Karbofuran Ditiokarbamat Oksamil	Çok toksik Çok toksik Son derece toksik Son derece toksik
Fungusitler	Benomil Karbendazim Tiofanat Metil	toksik toksik toksik
Fumigantlar	Klorpistrin Metil Bromid Dikloropropan	Son derece toksik Son derece toksik Son derece toksik
Herbisitler	Bütün Kimyasallar	Normal dozlarda çok az toksik veya toksik değildir.

1.4.4. Fungusitler

Çeşitli çalışmalar bakırlı fungusitlerin toprak solucanları için toksik olduğunu göstermektedir. Büyük miktarlarda bakır kalıntılarıyla kontamine olmuş topraklarda az sayıda toprak solucanı bulunduğunu ve bu toprakların yüzey kısmında bozulmamış organik maddelerin kalın bir tabaka oluşturduğu rapor edilmektedir. Karbamat fungusitler de, insektisit benzerleri gibi toprak solucanlarına aynı şekilde toksiktirler. Benomil, thiabendazol, karbendazim ve benzeri benzimidazole sınıfına ait fungusitlerde, çimen toprak solucanları üzerinde dikkate değer bir toksisiteye

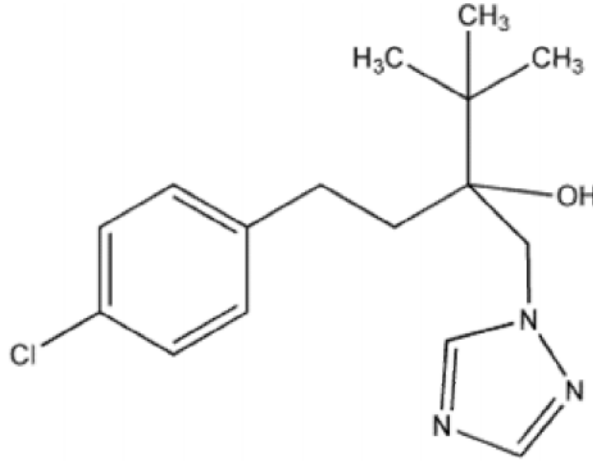
sahiptirler. Yaygın olarak kullanılan bir fungusit olan benomil, toprak solucanları için oldukça toksiktir [28].

Ditiokarbamatlar, pestisitlerin önemli bir sınıfını oluştururlar ve memeliler için kısmen güvenli olduklarına inanıldığı için, son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Thiuram veya thiram (tetrametilthiuram disülfid), bir ditiokarbamat fungusittir ve meyvelerde, sebzelerde ve süs bitkilerinde çeşitli hastalıkların kontrolü için tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [32, 33]. Thiram yüksek dozlarda, alandaki kuşları, tavşanları, kemirgenleri uzaklaştırıcı etki yapmaktadır. Ayrıca, thiuram, belirli antiseptik spreylerde ve medikal sabunlarda bakteriosit olarak ve insanda uyuz tedavisinde de kullanılmaktadır [34]. Thiram mikroorganizmalarda bazı sülfidril (SH) enzimlerini etkileyen dimetil ditiokarbamatlardan biridir. Birçok çalışmada belirtildiğine göre, hücreye girdikten sonra thiuram hızlıca bu bileşiğin şelatlaşma özellikleri nedeniyle, aktif parçaları olan thiol ve dimetilditiokarbamik asit gibi eş bileşenlerine indirgenmektedir. Thiram ve diğer bazı ditiokarbamat fungusitler immün yanıtı yol açarken, thiram ayrıca memelileride kapsayan birçok hayvanda gelişimsel toksisiteye neden olurlar. Sıçanlarda ve farelerde yarık damak, bitişik kaburga ve hidrosefaliye neden oldukları rapor edilmiştir. Gelişimsel toksisitenin yanı sıra, organizma thiuram'a maruz kalmaya devam ederse genotoksik etkide rapor edilmiştir [32]. Thiram toz halinde, su ile karıştırılarak ve diğer fungusitlerle karıştırılarak kullanılabilir. TMTD'nin yapısal formülü Şekil 1.2' de gösterilmektedir.



Şekil 1.2 TMTD' nin yapısal formülü

Tebukonazol, ((RS) - 1 - p- klorofenol – 4, 4-dimetil -3 - (1H - 1, 2, 4-triazol – 1 - ylmetil)pentan – 3 - ol), fungal CYP450 enzimlerine daha fazla affinite gösteren bir fungusit olup, CYP450 monooksijenaz süper ailesine dahil CYP51 tarafından katalizlenen funguslardaki sterol 14 α -demetilasyon reaksiyonunun potansiyel inhibitörüdür [35, 36]. Tebukonazol'ün yapısal formülü Şekil 1.3' de gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Tebukonazol'ün yapısal formülü

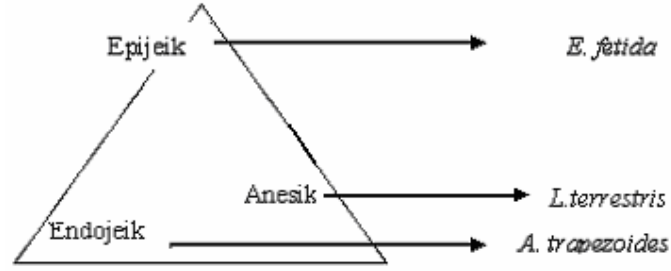
Bakır oksiklorür ($3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuCl}_2$), yıllardır etkili bir koruyucu fungusit olarak kullanılmaktadır. Daha çok sebzelerdeki, ağaç meyvelerindeki ve asmalardaki fungal hastalıkları kontrol etmek için kullanılır. Bakır oksiklorürden serbest kalan bakır iyonları, fungal sporlar içindeki enzimleri ve proteinleri bozarak etki gösterirler. Sporlarda aktif olarak bakır birikir ve çimlenme (filizlenme) çok düşük konsantrasyonlarda dahi inhibe edilir [37].

Bakır oksiklorür, toprak solucanlarının gelişimi ve kokon üretimi üzerine negatif bir etki yaparak, üremelerini önemli bir şekilde etkilemektedir [38].

1.5. TOPRAK SOLUCANI (*LUMBRICUS SP.*)

Toprak solucanları, toprak içinde açtıkları galerilerde yaşarlar ve galerilerinin bulunduğu toprak katmanına göre **epiyeik**, **endoyeik** ve **anesik** olmak üzere üç farklı gruba ayrılabilirler (Şekil 1.4). "**Epiyeik**" türler yüzeye yakın yaşarlar ve buradaki

organik maddelerle beslenirler. Mineral toprak katmanında (üstten 20 cm.) yaşayan türler ise "**endojeik**" türler denilmektedir. Bu türler toprağa karışmış organik madde ile beslenirler ve toprağın havalanmasında çok etkili olurlar. "**Anesik**" türler ise derin galeri açan türlerdir. Bunlar da yine yüzey organik maddeleriyle beslenirler. Genellikle büyük türler anesik, küçük türler endojeik ve epijeik olmaktadır. Epijeik türler yaygın olarak, düşen yaprakların örtü oluşturduğu ormanlarda ve ağaçlık bölgelerde bulunurlar. Anesik ve endojeik türler ise, ormanlık bölgelerden çok, tarımsal alanlarda ve çayırarda daha yaygındırlar [39].



Şekil 1.4 Bazı Epijeik, Endojeik ve Anesik türler

Toprak solucanlarının belirli bir alandaki yoğunlukları iklime, toprak yapısına, topraktaki besin maddesi birikimine ve bitki örtüsüne bağlı olarak değişim göstermektedir. İlkbahar ve sonbahar aylarında yüzeye yakın yaşadıkları için sıkça görülürken, soğuk ve kurak havalarda derinlere inerek diyapoz'a (uyku hali) girerler. Bu dönemlerde derinlerde kendi etraflarına sarılarak bir yumak haline gelirler. Bu derinlik bazı türlerde birkaç metreye kadar ulaşabilmektedir. Toprak solucanları nemli, yüksek kil ve düşük silt içeren topraklarda daha yüksek yoğunlukta bulunurlar. Buna karşılık asidik, kumlu ya da kurak topraklarda daha az yoğunlukta bulunurlar [40].

Toprak solucanlarının vücutları, yuvarlak ve ince uzun bir silindiri andırır; dorsal kısmı koyu, ventral kısmı daha açık renklidir. Vücutları birçok segmente ayrılmıştır. Her segmentte, yönleri önden arkaya dönük olan dört çift kıl bulunur. Canlı bir solucanda, bu kıllar kolayca görülmez ancak solucanın karnına elle arkadan öne doğru dokunulacak olursa, kıllar hemen hissedilir. Toprak solucanları, dış taraftan ince bir kutikula tabakasıyla kaplıdır. Kutikula, epidermis tarafından salgılanır. Epidermis hücreleri arasında, derinin nemli ve kaygan olmasını sağlayan bir hücreli bezler vardır. Epidermisin altında, halkalı ve boyuna kas tabakaları yer alır. Halka biçimindeki

kasların kasılması, solucanın incilmesi ve uzamasını; boyuna kasların kasılması ise kalınlaşması ve kısalmasını sağlar [41].

Toprak solucanlarının görme organı bulunmadığı halde, ışığa karşı oldukça duyarlıdırlar. Bu hassasiyet, epidermis hücrelerinin arasında bulunan pigmentsiz hücreler tarafından sağlanır. Solucanın sırt tarafında küçük delikler vardır. Solucan kuruma tehlikesi ile karşı karşıya kaldığı zaman bu deliklerden dışarıya çıkan vücut sıvısı, hayvanı ölüm tehlikesinden korur. Çoğu kez vücut sıvısıyla birlikte, lenf hücreleri de dışarıya çıkar ve solucanın üzerinde bulunan zararlı bakterileri yok eder [41].

Toprak solucanlarının sindirim sistemleri boru şeklindedir. Ön kısımda ağız bulunur. Bunu kaslı bir farinks ve ince bir özfagus takip eder. Özfagustan sonra kursak, katı ve bağırsak yer alır. Toprak solucanları, toprağa karışmış olan organik maddeleri toprakla birlikte alırlar ve toprağı sindiremedikleri için ufalanmış bir halde, anüsten dışarıya atarlar. Buna **solucan toprağı** adı verilir. Toprak solucanlarının, tonlarca toprağı bağırsaklarından geçirerek organik maddeleri parçaladıkları, organik maddelerle mineral maddelerin birbirine karışmasını sağladıkları ve bitki besin elementlerinin faydalı hale gelmesinde yardımcı oldukları bilinmektedir [42].

Toprak solucanları, hermafrodit olup, her iki eşeyssel organa da sahiptir ve 10.-11. segmentler her biri ayrı sölomik boşluklara yerleşmiş birer çift testis içerir. Testislerde üretilen spermler, sölom boşluğunda yer alan sperm keselerinde birikir ve sperma hunileri tarafından toplanarak, sperma kanalıyla 15. segmentin ventral tarafındaki erkek üreme organı açıklığına taşınır. Yumurtalar 13. segmentte bulunan bir çift ovaryum tarafından sölomik boşluğa dökülür. 14. segmentin ventralindeki dişi üreme organı açıklığına açılan oviduktlara taşınır. Çiftleşme sırasında alınan spermler, 9. ve 10. segmentlerdeki iki çift reseptakulum seministe (sperma kabul odası) depolanır [42, 43].

Bir toprak solucanı, bir başka toprak solucanı ile bir arada bulunduğunda, ters yönde durarak karın taraflarını birbirine bastırırlar ve kalınlaşmış bir epidermis halkası olan 32.-37. segmentlerde bulunan **Klitellum**'un mukus salgısı yardımıyla birbirlerine yapışarak karşılıklı bir şekilde gonadal açılım ile sperm değişimini gerçekleştirirler. Bu **Spermatoforez** olarak adlandırılır. Bazı türlerde ya partenogenetik (dişilerden dişi üretmesi "saf soy") ya da kendini dölleme görülebilir [41, 44].

Klitellum, mukoz kılıf ve besin materyali üretir. Klitellum, çiftleşme süresince bir toprak solucanından diğerine transfer edilen spermlerin toprak solucanlarının

yumurtalıklarından taşınmasını sağlar. Klitellum, albüminli bir sıvı içeren zarımsı bir kokon oluşturur. Solucanın başından kokon çıkarken dişi üreme açıklığından yumurtalar, içeriye bırakılır; kokon sperma kabul odasından geçerken spermeler eklenir. Başlangıçta kokon oldukça yumuşaktır, ancak toprağa bırakıldıktan sonra biraz kehribar rengi alır. Deriye benzer ve kurumaya ve zarara oldukça dirençli bir hale gelir. Yumurtalar kokon içinde gelişir ayrıca bir larva evresi yoktur. Solucanların rejenerasyon kabiliyetleri de oldukça yüksektir [42, 44].

Toprak solucanları, türe bağlı olarak her yıl 3-80 kokon üretebilirler. Toprağın daha derin bölümlerinde yaşayan türlerin, daha fazla miktarda koza üretme eğiliminde olan yüzey türlerinden daha iyi bir şekilde avcılardan koruyabildikleri için çok fazla sayıda koza üretmelerine gereksinim duymadıkları düşünülebilir. Her bir kozanın içindeki döllenmiş yumurta sayısı 1-20 arasında değişir. Bu türe, beslenme gibi faktörlere ve toprak nemi gibi önemli çevresel faktörlere bağlıdır [45].

Toprak solucanlarının yaşam uzunluğu türe bağlı olarak değişir. Çeşitli uzmanların raporlarına göre, belirli türler potansiyel olarak 4-8 yıl yaşayabilirler. Korunan kültürel şartlarda (predatörün olmadığı ve ideal şartlarda) yapılan bir araştırmada, *Allolobophora longa* yaklaşık olarak 10 yıl, *Eisenia foetida* 4.5 yıl ve *Lumbricus terrestris* (Şekil 1.5) 6 yıl yaşamışlardır. Solucanlar eşeyssel olgunluğa ulaşırsalar bile, gelişimleri devam eder. Ancak bu evrede klitellum' un yok oluşuna kadar ağırlıkta çok daha düşük bir artış gerçekleşir ki bu da yaşlanmayı ifade eder. Yaşlanma süresince, toprak solucanının ölümüne kadar vücut ağırlığında yavaş bir gerileme meydana gelir [46].



Şekil 1.5 *Lumbricus terrestris* türü toprak solucanı

Dünya’da en yaygın olarak bulunan ve benzeri bilimsel çalışmalarda kullanılan toprak solucanları *Lumbricus* türleridir. Bu cinsin bugüne kadar yaklaşık 150 türü kaydedilmiştir. Yurdumuzda toprak solucanları üzerine yapılmış yeterli sistematik çalışması bulunmamakla birlikte, en yaygın türlerin *Lumbricus* cinsine ait olduğu bilinmektedir. Sistematik sınıflandırma anahtarları kullanılarak çalışma alanımızda yapılan incelemede yaygın bulunan türün *Lumbricus terrestris* olduğu kanaatine varılmıştır. Buna bağlı olarak biyoindikatör organizma olarak bu türe ait bireyler toplanmıştır. Bununla birlikte, toplanan test organizmaları ile ilgili detaylı bir sistematik çalışması yapılmadığından, tür düzeyinde bir sınıflandırmadan kaçınılarak, çalışmada *Lumbricus sp.* olarak ifade edilmiştir.

Birçok özelliğinin bilinmesi ve aynı zamanda topraktaki kimyasal kirliliğine en çok maruz kalan bir toprak organizması olmasından dolayı çalışmamızda biyoindikatör olarak kullandığımız toprak solucanının sistematik kategorideki yeri aşağıdaki gibidir;

Alem	: Animalia
Şube	: Annelida
Sınıf	: Clitellata
Altsınıf	: Oligochaeta
Takım	: Haplotaxida
Alttakım	: Lumbricina
Süper aile	: Lumbricoidea
Aile	: Lumbricidae
Cins	: <i>Lumbricus</i>

Lumbricus terrestris, Avrupa’ya özgü en büyük kırmızımsı toprak solucanıdır. Pigmentasyon, toprağın üst kısımlarında çoğunlukla vücutlarının son kısmının önünde gerçekleşir. Tipik olarak uzadıkları zaman 20 - 25 cm uzunluğa erişebilirler. Gece toprak yüzeyinde çiftleşme gibi diğer birçok toprak solucanında pek fazla görülmeyen bir özelliğe (alışkanlıkları) sahiptirler. Kuyruk kısımları, belirgin bir şekilde yassılaşıp sonlanır [46].

Lumbricus terrestris, bir **anesik** toprak solucanı türüdür. Bunlar, sürekli olarak derin oyuklar oluştururlar ve beslenme için yüzeye gelirler. Bu türün ilginç bir özelliği, yaprak parçalarını oyuklarına çekerek götürürler ve yemeye başlamadan önce kısmen çürütürler. Bu türler genellikle bitki parçaları ile beslenirken, ezilmiş böceklerle ve dışkı

ile beslendikleri de gözlemlenmiştir. Toprak yüzeyine çıktıkları zaman güvenlikleri için vücutlarının arka kısımları çukur içinde kalır ve herhangi bir tehlike ile karşılaştıkları zaman hızlı bir şekilde geri çekilebilirler. *Lumbricus terrestris*'lerin tam olarak yaşam süreleri bilinmemekle beraber, laboratuvar şartlarında 6 yıl canlılıkları sürdürülebilir. Genel değerlendirmelere göre ise, yaşam süreleri muhtemelen 4-8 yıl arasında değişebilmektedir [46, 47].

Lumbricus terrestris, geniş bir dağılım gösterdiği için farklı isimlerle altında adlandırılırlar. Britanya adalarında, **Yaygın Toprak Solucanı** olarak adlandırılırlar. Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'da ise **Gece Sürünen (Night Crawler)** terimi daha yaygındır. Kanada'da, **Dew Worm** olarak, İngiltere'de **Lob Worm** olarak adlandırılmaktadırlar [46].

1.6. BİYOBELİRTEÇ OLARAK SEÇİLEN ENZİMLER

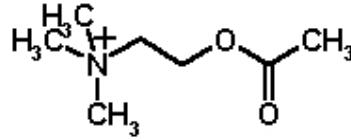
1.6.1. Asetilkolinesteraz

Kolinesterazlar (ChE), kolin esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzim grubu olup temel olarak kolinerjik nörotransmisyonla ilgili serin hidrolazların bir sınıfındandır. Bu enzimler büyük oranda omurgalılarda ve böceklerde çalışılmaktadır. Ancak, yumuşakçalarla da yapılan birkaç çalışma vardır [48]. ChE'lerin bilinen iki tipi vardır. Bunlardan ilki, asetil koline ilgisi olan asetilkolinesteraz (AChE), ikincisi de bütirilkoline ilgisi olan bütirilkolinesterazdır (BChE). BChE'ler ayrıca, özgül olmayan esteraz veya pseudokolinesterazlar olarak da bilinirler [20].

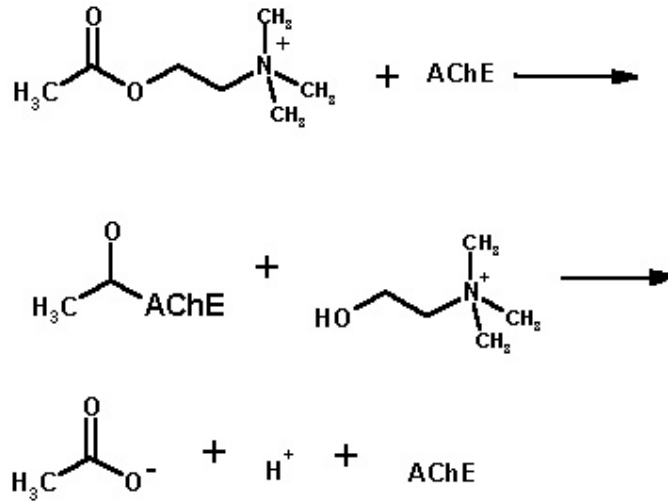
Asetilkolinesteraz (AChE) (E.C 3.1.1.7), asetilkolin bağımlı nörotransmisyonunda önemli bir rol oynayan özgül bir esterazdır ve nöral transmisyonu sonlandırmadaki önemli fizyolojik fonksiyonları nedeniyle AChE çeşitli kolinerjik toksinler için bir hedeftir [49, 50].

Asetilkolin merkezi sinir sisteminde, birkaç rolü olan klasik bir nörotransmitterdir. Asetilkolin serbest kaldıktan sonra, tip B karboksilesterazlar ailesine dahil olan ve asetilkolini (Şekil 1.6), kolin ve asetik asite hidrolizleyen asetilkolinesteraz tarafından sinaptik boşluktan hızlı bir şekilde uzaklaştırılır (Şekil 1.7). Tam olarak bazı dokulardaki AChE'nin fizyolojik fonksiyonları açıklığa kavuşturulmamış olsa da, memeli eritrositlerinde ve diğer organlarda da bulunabilirler [50,51].

AChE, özellikle organofosforlu (OP) ve karbamat pestisit toksisitesinin uyarılarını hızlı bir şekilde bildirdiği için, yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir. OP insektisitlerin AChE enzimini geri dönüşümsüz olarak baskıladıkları bilinmektedir. OP insektisitlerin baskılayıcı etkileri, enzimin aktif bölgesine bağlanma kapasitelerine ve davranış ve yaşla ilişkili olarak fosforilasyon oranlarına bağlıdır [20, 52].



Şekil 1.6 Asetilkolin'in genel kimyasal yapısı



Şekil 1.7 Asetilkolin ve Asetilkolinesteraz arasındaki hidroliz reaksiyonu

1.6.2. Glutasyon-S-transferaz

Glutasyon-S-Transferaz (GST) (E.C.2.5.1.18), Faz II enzimidir ve organizmalarda detoksifikasyon sisteminin önemli bir parçasıdır. Reaktif oksijen metabolizmasına karşı hücrelerin korunmasından sorumludur. Çoğu ksenobiyotiğin toksisitesi GST indüksiyonu ile belirlenebilir. GST, redükte glutasyon (GSH) ile elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu katalizleyen sitozolik bir enzimdir. GST'nin, prostaglandinlerin ve lökotrienlerin biyosentezi ve hücre içi taşımadaki önemli fonksiyonlarının dışında, oksidatif zarara, DNA'nın ve lipidlerin peroksidatif ürünlerine karşı savunmada da kritik bir rolü vardır [20].

GST gibi faz II detoksifikasyon enzimleri, faz I metabolizmasının ürünlerinin büyük polar, suda-çözünür gruplarına atak yaparak eliminasyonlarını sağlarlar. Özellikle sitokrom P450 tarafından üretilen ara ürünleri çeşitli makromoleküllere bağlayarak ya da glutasyon ile reaksiyona sokarak detoksifiye ederler [20, 53]

1.6.3. Karboksilesteraz

Lipolitik enzimler iki büyük sınıfı kapsarlar; bunlar, ester içeren molekülleri katalizleyen karboksilesterazlar ve triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyen lipazlardır. Bu enzimler hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunurlar [54].

Karboksilesteraz (CE) (E.C 3. 1. 1. 1), esterlerin, amidlerin ve tioesterlerin hidrolizini katalizleyen esterazların serin hidrolazlar süper ailesinin üyesidirler [55]. CE'lar, esterleri benzer karboksilik asit ve hidroksillenmiş ürünlere dönüştürebilme kapasitesine sahip enzimlerin büyük bir grubudur [56].

Pestisitler için alternatif fosforilizasyon alanları olduklarından dolayı CE'lerin veya B-esterazların inhibisyonu, kolinesterazlardan daha hızlıdır. Karboksilesterazın bir organofosfat toksisite tampon enzimi olduğu düşünüldüğünde kolinesterazlar rekabetsel olarak CE tarafından korunmuş olabilirler. Bu nedenden dolayı CE, pestisit maruziyetine karşı kolin esterazlardan daha duyarlı bir biyobelirteç olarak kullanılabilir [57].

Memeli karboksilesterazları, birçok dokuda hücrenin endoplazmik retikulumunda lokalize olmuşlardır. Hayvanların çeşitli dokuları arasında, en yüksek substrat hidroliz aktivitesi tipik olarak karaciğerde bulunmuştur. Fakat testis, böbrek ve

plazma gibi bazı dokularda da aktivite gözlenmiştir. Önemli miktardaki ilaçlar CE tarafından metabolize edildiği için, bu enzimlerin her bir dokuda değişen aktiviteleri klinik açıdan da önemlidir. Bununla birlikte insanların CE izoenzimlerinin hidrolitik kabiliyetleri ve yapılarındaki farklılıklar hakkında çok az şey bilinmektedir. İnsan karaciğerinde hCE-1 ve hCE-2 olarak adlandırılan iki önemli karboksilesteraz tanımlanmıştır [55, 58].

Son zamanlarda, lipazlar ve esterazlar gibi enzimler ucuz ve çevreci işlemlerde hidroliz ve esterifikasyon yeteneklerinden dolayı, kiral ilaçların üretiminde potansiyel kullanımlarına dikkat çekilmektedir [59].

Organofosforlu ve karbamat insektisitlere evrimsel bir yanıt olarak özgül olmayan CE yüksek düzeyde üretimi, birçok arthropod türünde ispatlanmıştır. En yaygın olarak çalışılan sivrisinek türlerinin *Culex* cinsi üyelerinde bu direnç mekanizması görülmüştür. OP duyarlı böceklerde, insektisitlerin aktif okson türevleri, esteraz inhibitörü gibi davranırlar çünkü, bunlar enzimler için yüksek affiniteli zayıf substratlardır [60].

1.6.4. Etoksiresorufin-O-deetilaz

Faz I detoksifikasyon mekanizması genel olarak, sitokrom P450 enzim sistemlerini kapsarlar ve polar olmayan bileşikler için hidroksil, sulfonil gibi fonksiyonel bir grubun meydana gelmesi ile sonuçlanan reaksiyonları katalizler. Bazen, Faz I reaksiyonları sonucu meydana gelen metabolitler, esas bileşikten daha toksik olabilirler. Sitokrom P450 enzimlerinin en az dört ailesi (1, 2, 3 ve 4), lipofilik ksenobiyotik bileşiklere maruz kaldıklarında indüklenirler ve ksenobiyotik metabolizmasında yer alırlar. Özellikle, çevresel kirliliğe bağlı olarak indüklenen sitokrom P4501A (Cyp 1A) üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bunun nedenleri; 1- Bu enzim ailesi PAH'a maruziyetin bir sonucu olarak birçok türde indüklenir. 2- Genom dizisi çalışmalarında, *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* gibi diğer omurgasızlarda bu protein için genin kodlandığı ispatlanmıştır. 3- gen transkripsiyonunda kodlanan bu protein klonlanamamasına rağmen, protein benzeri aril hidrokarbonların potansiyel varlığı, antikor yöntemleri kullanılarak ispatlanmıştır. Bütün bu olgular, bu konu hakkında şu an için bazı kuşkular olsa da toprak solucanlarında PAH'a maruziyeti takiben EROD aktivitesinin (Cyp 1A'nın katalitik aktivitesinin ölçülmesi için kullanılır) yükseldiğini gösterir [53].

EROD aktivitesi, endüstride ve tarımda kullanılan PAH'lar, PCB'ler, dioksinler ve pestisitler gibi birçok önemli organik kimyasal tarafından indüklenir ve bu tipteki kirleticilerin organizma üzerindeki etkilerini saptamak için yaygın bir biyobelirteç olarak kullanılır [61, 62].

2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ KAYNAK ÖZETLERİ

Toprak solucanları (*Lumbricus terrestris* L.), üzerine aldikarp ve endosulfanın subletal ve akut etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada (endosulfan, sistemik olmayan organoklorlu bir insektisit olup çeşitli zararlı böceklerin kontrolünde yaygın olarak kullanılırken, aldikarp akarisit ve nematisit olarak da kullanılabilen bir karbamat insektisittir) toprak solucanları 2 , 7 , ve 15 gün süreyle endosulfan ve aldikarp'a maruz bırakılmış ve LC₁₀, LC₂₅ ve LC₅₀ değerleri tanımlanmıştır. Biyobelirteç olarak total protein miktarı ve büyüme oranı kullanılmıştır. Kontrol grubunda ölüm görülmezken, bu iki insektisite maruz bırakılan toprak solucanlarında ise oldukça yüksek ölüm oranı rapor edilmiştir. LC₁₀, LC₂₅ ve LC₅₀ değerleri, her iki insektisit de toprak solucanları için oldukça toksik olduğunu göstermiş ve aldikarp'ın endosulfan'dan daha yüksek bir toksisiteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Toprak solucanlarının büyüme oranları ve protein oranlarında zamana bağlı olarak negatif bir etki gözlemlenmiştir [63].

Klorprifos ve diazinon ile yapılan diğer bir çalışmada, bu iki pestisit in üretkenlik üzerine etkisi toprak solucanı *Aporrectodea caliginosa* 'da araştırılmış ve genç bireyler 4 hafta labotatuvar şartlarında her iki pestisit in subletal konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra organofosfat bulunmayan toprakta 12 hafta boyunca gözlem yapılmıştır. Pestisit uygulama süresince solucanlarda, büyümede bir azalış meydana geldiği rapor edilmiştir. Klorprifos'un en yüksek konsantrasyonu eşeysel olgunlaşma oranını ve üretkenliği negatif bir şekilde etkilerken diazinon her iki konsantrasyonda da herhangi bir etki göstermemiştir [64].

Toprak solucanı *Aporrectodea caliginosa* ile yapılan başka bir çalışmada ise pestisit kontaminasyonunun potansiyel iki biyobelirteç üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, genç toprak solucanları asetilkolinesteraz (AChE) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri üzerine organofosfatlı pestisitler olan kloriprifos ve diazinonun etkilerini gözlemlemek için bu iki pestisit in subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. AChE aktivitesinin uygulamanın birinci gününde diazinon tarafından %72, kloriprifos tarafından ise %87 oranında inhibe edildiği ve pestisite maruz kalmadan sonra iki hafta süresince baskılandığı ifade edilmiştir. GST aktivitesi ise uygulamadan iki hafta sonra kontrol ile karşılaştırıldığında, diazinon tarafından %56, kloriprifos tarafından %148 oranında artmış ve sonuçlar, GST ve AChE enzimlerinin kısa süreli pestisit uygulamasına bağlı olarak potansiyel birer biyobelirteç olduğunu göstermektedir [65].

Ağır metaller gibi antropojenik kirleticiler, toprak ile güçlü bir etkileşim içinde olduklarından dolayı, toprak omurgasızları üzerinde letal ve subletal etkilere neden olabilirler. Çeşitli türdeki toprak solucanları ile yapılan bir çalışmada, toprak solucanlarının hayatta kalma oranları, koza üretimleri, büyümeleri ve seksüel gelişimleri ile metal konsantrasyonları arasında bir doz-yanıt ilişkisi olduğu belirtilmiştir [66, 67].

Tarımda yaygın bir şekilde antifungal olarak kullanılan imidazol bileşiklerin hedef olmayan organizmaların sitokrom P450 enzimleri üzerine etkisinin belirlenmeye çalışıldığı bir çalışmada, Clatrimazole'ün alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*) üzerine etkisinin belirlenmesi için P450-1A (CYP1A) biyobelirteç olarak kullanılmış ve balıklara 50 mg/kg Clatrimazole enjekte edildikten 1 gün sonra hepatik EROD aktivitesini %80 oranında inhibe olduğu belirtilmiştir. İmidazol bileşiklerin sitokrom P450 izoenzimleri üzerine inhibisyon ve indüksiyon etkisi çevredeki diğer bileşiklerin etkinliğinde de rol oynayabilir [20].

Aldikarp, cypermethrin, profenofos, klorofluazuron, atrazin, ve metalaksil'in toksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yetişkin *Aporrectodea caliginosa* türü toprak solucanlarında, bu pestisitlerin LC₂₅ değerlerinin glukoz ile ilişkili olarak büyüme oranı, çözülebilir protein, glutamik-oksaloasetik transaminaz (GOT) aktivitesi, glutamik-piruvik transaminaz (GPT) aktivitesi, asit fosfataz (ACP) aktivitesi ve alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, test edilen pestisitler içinde en toksik olanının aldikarp olduğunu göstermekte ve aldikarpı takiben, sırasıyla cypermethrin, profenofos, chlorfluazuron, atrazine ve metalaksil gelmektedir. Pestisite maruz kalmış bütün toprak solucanlarının, gelişme oranında bir düşüş olduğu belirtilmiştir. Araştırmada, çözünebilir protein miktarında bir azalma gözlemlenmekle beraber, transaminaz ve fosfataz aktivitelerinde bir artış olduğu rapor edilmiştir. Büyüme oranı, protein içeriği, transaminazlar ve fosfatazlar arasındaki ilişkiler, toprak solucanlarındaki biyokimyasal değişikliklerin pestisit kontaminasyonu ile ilgili olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlamaktadırlar. Bu nedenle, toprak solucanları pestisit ile kontamine olmuş topraklarda iyi bir biyoindikatör olarak kullanılabilir [68].

Asetilkolinesteraz aktivitesini, organofosfatlı bileşiklere maruz kalan toprak solucanlarında potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada, *Aporrectodea caliginosa* kloriprifos ve diazinona laboratuvar, alan ve mesokozm çalışmalarında maruz bırakılarak akut ve subletal enzim yanıtları değerlendirildi. Üç deneysel sistemde de pestisitlerin alan uygulamalarında önerilen miktarları için, ölüm ve popülasyonda herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi.

Laboratuar testlerinde, pestisitlerin subletal dozlarına maruz kalan toprak solucanlarında AChE aktivitesi kısmen inhibe oldu. Bununla birlikte, mesokozm veya doğal toprak solucanı populasyonlarında AChE aktivitesi üzerine pestisitlerin hiçbir etkisi bulunamadı [69].

Pestisitlere karşı toprak solucanlarının davranışlarında meydana gelen değişikliklerin bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağına karar vermek amacıyla yapılan bir çalışmada, model pestisit olarak Confidor (imidacloprid) kullanılmış ve farklı ekolojik tipteki iki tür toprak solucanının (anesik *Aporrectodea nocturna* ve endojeik *Allolobophora icterica*) galeri açma davranışları araştırılmıştır. Ayrıca, klasik biyokimyasal belirteçler olan AChE ve GST enzimlerinin aktiviteleri de ölçülmüştür. Imidacloprid'in konsantrasyonu ne olursa olsun (0.01, 0.1 ve 1 ppm) her iki türdeki toprak solucanında AChE ve GST aktiviteleri üzerine etkisi bulunmamıştır. Buna karşılık, Imidacloprid varlığında toprak solucanlarının davranışlarında çarpıcı değişiklikler rapor edilmiştir. İki farklı konsantrasyonda (0,5 ve 1 ppm) pestisite maruz kalan her iki tür toprak solucanı için, uygulamadan bir hafta sonra, çukur uzunluğu ve çukuru tekrar kullanma oranlarının azaldığı rapor edilmektedir [70].

AChE ve insektisitlerle ilgili yapılan bir çalışmada, *Oncorhynchus tshawytscha*' da AChE enzim aktivitesi üzerine organofosforlu (diazinon, chlorpyrifos ve malatyon'un oxon türevleri) ve karbamat insektisitlerin (carbaril ve karbofuran) tek başlarına ve iki yönlü kombinasyonlarının (antikolinesteraz) inhibe edici etkileri araştırılmış ve antikolinesteraz karışımlarının birleşik toksisitesinin, karışımdaki her bir kimyasalın inhibitör potansiyellerinden tahmin edilebileceği saptanmıştır. Bu, organofosforlu ve karbamat insektisitlerin AChE inhibisyonun da birbirleri ile etkileşmediğinin bir göstergesidir. Buna bağlı olarak, düşük bir doz ilavesiyle ortaya çıkan kümülatif nörotoksisiteyi tahmin etmek mümkündür. Organofosfatlar ve karbamatlar doğal maruz kalma şartları altında som balığının sinirsel davranışları üzerine benzer etkilere sahip oldukları için, ekolojik risk değerlendirmeleri her bir kimyasalın ayrı ayrı risk değerlendirmelerinin daha doğru olduğuna dikkat çekmiştir [71].

Bir başka çalışmada, *Eisenia f. fetida* ve *Enchytraeus crypticus*'nın sitokrom P450 sistemleri, monooksijenaz aktivitesi için substrat olarak ethoxy-, pentoxy- ve benzoxyresorufin (EROD, PROD ve BROD) kullanılarak enzim aktiviteleri analiz edilmiştir. *E.f. fetida*'nın tüm vücut mikrozomları, 0.26-1.05 pmol mg/protein/dk PROD aktivitesi ve 0.14-0.30 pmol mg/protein/dk BROD aktivitesi göstermiştir.

Toprağa dört hafta süreyle 100 mg/kg fluoranthene veya benzo[a]pyrene (BaP) uygulamasına bağlı olarak, hayvanların bu maddelere maruz kalması, bu monooksijenazların aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmamıştır. *E. crypticus*'daki EROD aktivitesi, 2.10-6.18 pmol mg/protein/dk ve PROD aktiviteside 1.75-4.18 pmol mg/protein/dk olarak saptanmıştır. Beslenme yolu ile BaP'a kısa süreli maruziyette; EROD aktivitesinde % 45 gibi önemli bir düşüş meydana gelirken PROD aktivitesi etkilenmemiştir. Daha sonra agar-agar ortamında BaP'a uzun süreli (8 hafta) maruziyette ise EROD aktivitesi değişmezken, PROD aktivitesi 0'a kadar düşmüştür [72].

Bir polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) olan pyrene'nin toprak solucanları üzerine etkileri, doğrudan uygulama şeklinde ve toprak testlerinde araştırılmıştır. Üreme ve hayatta kalabilme üzerine toksik etkilerinin yanı sıra EROD ve katalaz aktiviteleri de, toksik stresin muhtemel biyobelirteçleri olarak çalışılmıştır. Hayatta kalma verileri, LC50 değerlerini direk test için 0,0068 mg/ml olarak belirtirken, toprak testi için 283 mg/kg olarak belirtmiştir. Kokon üretim oranı, toprak testinde 160, 640 ve 2560 mg/kg toprakta kontrol ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde düşmüştür. Kontrol kullanılan ön çalışmalarda ve doğrudan uygulama ile maruz kalan hayvanlarda EROD aktivitesi bulunamamıştır. Bu nedenle bu deney, toprak testlerinde kullanılmamıştır. Katalaz aktivitesi, diğer tüm uygulamalarla ve kontrol ile karşılaştırıldığında toprak testinde 640 mg/kg ile önemli düzeyde düşüş göstermiştir. Sonuç olarak toksikolojik verilere göre, diğer toprak omurgasızları ile karşılaştırıldığı zaman, *Lumbricus rubellus* hayatta kalma bakımından orta seviyede duyarlı, üreme bakımından ise düşük seviyede duyarlıdır [53].

Birkaç çalışmada Imidacloprid ve RH-5849 adlı iki pestisit *Eisenia foetida* türü toprak solucanı üzerine akut toksisiteleri, biyokimyasal toksisiteleri ve spermdeki morfolojik bozukluklar üzerine etkileri değerlendirilmiştir. LC₅₀ değerleri bu iki pestisit farklı maruz kalma sistemlerinde farklı etkilere neden olduğunu göstermiştir. Biyokimyasal toksisite testleri, Imidaclopridin (< 0.2 mg/l) ve RH-5849'ın (<25 mg/l) daha düşük konsantrasyonlarının, selülaz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ise belirli bir oranda yükseldiği belirtilmiştir. Bunun haricinde, Imidaclopridin'nin (0.1 mg/l) daha düşük konsantrasyonları SOD aktivitesini baskılamıştır. Biyokimyasal belirtilerin dışında, toprak solucanlarının üremeleri üzerine pestisitlerin potansiyel olumsuz etkilerini belirlemek için sperm bozukluğu testi geliştirilmiştir. Sonuçlar solucanlarda önemli düzeyde sperm bozukluğu meydana

geldiğini ($p<0.01$) ortaya koymuş ve Imidacloprid'in 0.5 mg/kg (kuru toprak)' dan daha yüksek konsantrasyonlarında doz-yanıt ilişkisi ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, RH-5849'maruz kalan grupların sperm bozukluğu sıklığında, doz 100 mg/kg (kuru toprak)'a ulaşana kadar kontrole göre önemli bir farklılık ($p>0.05$) bildirilmemiştir [73].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Pestisitler ve Uygulama

Tez çalışmamızda bir kayısı bahçesinde sezonluk olarak yapılan pestisit uygulaması göz önünde bulundurularak, üç ayrı dönemde pestisit uygulaması yapılmıştır.

Birinci pestisit uygulamasında organofosforlu bir insektisit olan metil paratyon (O,O-dimetil-O-4-nitrofenil fosforotiyoat) ve bir fungusit olan bakır oksiklorür karışımı kullanıldı. Bu pestisitler ayrıca kendi kontrolleri için oluşturulan metil paratyon kontrol alanına sadece metil paratyon, bakır oksiklorür kontrol alanına sadece bakır oksiklorür, metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımı kontrol alanına ise yine metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımı şeklinde de uygulandı. Çalışma alanına adı geçen pestisitler 250 Lt su içerisinde bir dekara sırasıyla, 250 gr ve 1000 gr etkili madde olacak şekilde uygulandı. Kullandığımız metil paratyon, Folidol M500 ticari adı ile Bayer-Türk tarafından, bakır oksiklorür ise OXI-CUP 50 WG ticari adı ile Safa Tarım (Türkiye) tarafından üretilmektedir.

İkinci pestisit uygulamasında ise foliar bir fungusit olan tebukonazol, ((RS) - 1 - p- klorofenil - 4,4-dimetil -3 - (1H - 1, 2, 4-triazol - 1 - ylmetil) pentan - 3 - ol) kullanıldı. Ayrıca, tebukonazol kontrol alanı için yapılan tebukonazol uygulamasının dışında ilk uygulamada kullanılan pestisitlerin kontrol alanlarına da tebukonazol uygulandı. Çalışma alanına adı geçen pestisit, 250 Lt su içerisinde bir dekara 150 gr etkili madde olacak şekilde uygulandı. Kullanılan tebukonazol, Folicur ticari adı ile Bayer-Türk tarafından üretilmektedir.

Üçüncü uygulamada ise, bir ditiokarbamat fungusit olan Thiuram veya thiram (tetrametilthiuram disülfid) ile organofosforlu bir insektisit olan metil paratyon karışımı uygulandı. Yine bu fungusitte, kendi kontrolü için oluşturulan thiram kontrol alanına ayrıca thiram uygulandı. Çalışma alanına adı geçen pestisitler 250 Lt su içerisinde bir dekara sırasıyla, 500gr ve 250 gr etkili madde olacak şekilde uygulandı. Kullanılan thiram (TMTD), Pomarsol Forte 80 WG ticari adı ile Bayer-Türk tarafından üretilmektedir.

3.2. Toprak Solucanı Örneklerinin Sağlanması

İnönü Üniversitesi Yerleşkesi dahilinde bulunan Kayısı Araştırma ve Uygulama Merkezine bağlı kayısı bahçesi, ana uygulama alanı olarak seçildi. Bu ana uygulama alanının dışında, bu bölgenin hemen yanında bulunan kayısı bahçesinde ise fungusit kontrol alanı (150 m²), insektisit kontrol alanı (150 m²), insektisit + fungusit kontrol alanı (150 m²) oluşturuldu. Uygulama alanından, mevsimlik zirai ilaçlama dönemi başlamadan önce kontrol grubunu oluşturacak toprak solucanı örnekleri alındı. İlaçlama döneminden önce alınan bu örnekler, yapılan üç uygulama ve oluşturulan bütün alanlar için ortak bir kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Toplanan toprak solucanları morfolojik özelliklerine göre, tür tayin anahtarları kullanılarak teşhis edildi. Bu tayin anahtarlarına göre, toplanan örneklerin *Lumbricus terrestris* türüne ait olduğu kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, toprak solucanlarında tür düzeyinde yapılan sınıflandırmanın güçlüğü ve yurdumuzda bu tür çalışmaların henüz yapılmamış olması nedeniyle, toplanan örneklerin tür yerine cins düzeyinde ifade edilmesinin daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan toprak solucanları *Lumbricus sp.* olarak ifade edilmiştir.

Üç ayrı pestisit uygulamasından sonra, periyodik olarak (uygulamadan sonraki 1. 2. 3. 5. 7. ve 10. günlerde) her bölgeden istatistiksel olarak analiz yapmaya uygun sayıda olmak üzere 10 adet ve ortalama olarak 1,5 gr ağırlığında toprak solucanı örnekleri toplandı. Toprak solucanı örnekleri, içinde nemli bahçe toprağı bulunan cam kavanozlar içinde oldukça çabuk bir şekilde laboratuvara taşındı. Laboratuvara getirilen örnekler, üzerlerindeki katı partiküller distile su ile uzaklaştırıldıktan sonra tek tek alüminyum folyoya ile sarılarak paketlenildi ve homojenizasyon işlemine kadar – 80 °C’de muhafaza edildi.

3.3. Toprak Solucanı Homojenatlarının Hazırlanması

Toprak solucanları homojenize edilmeden önce, örnekler buz üzerinde çözölmeleri için bırakıldı ve alüminyum folyolardan alınarak tartıldı. Örneklerin tartımından sonra, üzerlerine ağırlıklarının 4 katı hacimde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde; 0.1 M KCl, 0.15 M EDTA, 1 mM DTT, 0.05 mM) eklendi. Bu işlemin ardından örnekler, buz içerisinde politron homojenizatörde (Ika Instruments, Germany) 18.000 rpm devirde 30

sn süre ile parçalandı. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz kutusu içerisinde korundu.

Homojenizasyon sonrası sitozolik enzimlerin (GST, AChE, CE) eldesi amacı ile elde edilen homojenatların 1/10'u alınarak eppendorf tüplerine aktarıldı. Homojenat 4 °C'de 16.000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlar temiz eppendorf tüplerine alınarak enzim aktiviteleri ölçülünceye kadar – 80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Homojenatın geriye kalan kısmı mikrozom eldesi için kullanıldı. Homojenatlar ultrasantrifüj tüplerine alınarak, uygun miktarda potasyum fosfat tamponu eklendikten sonra, ilk aşamada 10,000 rpm'de 4 °C'de 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar başka ultrasantrifüj tüplerine alındı ve yine uygun miktarda potasyum fosfat tamponu eklendikten sonra 30,000 rpm'de 4 °C'de 60 dakika süre ile santrifüj edildi. Daha sonra ise, santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar atılarak, elde edilen pellet tüpün içinde dikkatlice toplandı ve cam-teflon homojenizatörde 30 sn süre ile potasyum fosfat tamponu içerisinde tekrar süspanse edildi. Bu süspansiyon ikinci kez 30,000 rpm'de 4 °C'de 60 dakika süre ile santrifüj edildi. Son olarak elde edilen pellet bir spatula yardımı ile toplandı ve başlangıçtaki gerçek ağırlığı kadar 1/1 (w/v) oranında saklama tamponu (20 ml gliserol + 80 ml homojenizasyon tamponu) kullanılarak süspanse hale getirildi ve mikrozomal EROD aktivitesi ölçülünceye kadar – 80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4. Enzimatik Çalışmalar

Süpernatant örneklerinde sitozolik GST, AChE ve CE enzimleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak UV/Vis mikropilaka okuma sistemi (Molecular Devices, Versamax, USA) yardımı ile 96 çukurlu mikropilakalarda ölçüldü. Aynı cihaz tüm sitozolik ya da mikrozomal örneklerdeki toplam protein miktarlarının tayini amacı için de kullanıldı.

Mikrozomal EROD aktivitesinin tayini için 96 çukurlu mikropilakalarda bir mikropilaka okuyuculu spektrofluorometre kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Tüm enzim aktivitelerinin tayini için her seferinde en az üç tekrarlı okuma yapılarak, okuma değerleri kaydedildi.

Aynı örnekler için elde edilen absorbans değişim değerleri arasında %10'dan daha yüksek korelasyon farkı bulunanlar için okuma işlemi tekrar edildi.

3.4.1. Sitozolik Karboksilesteraz Aktivitesi

Toprak solucanı örneklerinde, sitozolik CE aktivitesini belirlemek amacı ile önerilen spektrofotometrik yöntem mikrolaka okuyucu sisteme uyarlandı. Aktivite tayininde 50 μM %96'lık etanol içinde hazırlanan paranitrofenol asetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı [74,75]. Bu amaçla 5 μL örnek ve 250 μL , 0.05 M Trizma pH 7.4 tamponu kuyucuklara pipetlendi ve 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 3 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 μL *p*-nitrofenolasetat kuyucuklara ilave edildi ve 2 dakika süreyle 405 nm'de OD okuması yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı.

3.4.2. Sitozolik Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi

Toprak solucanı örneklerinde sitozolik GST aktivitesini belirlemek amacı ile mikrolaka okuyucu sistem kullanıldı. Substrat olarak, %96'lık etanol içinde hazırlanan 150 mM 1-kloro 2-4 dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör olarak redükte glutasyon (0,002 M) kullanıldı [76]. Mikrolaka kuyucuklarına sırası ile, 10 μL süpernatant, 100 μL fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4) + 100 μL GSH karışımı ve son olarak 10 μL CDNB pipetlendi. Karışım mikrolaka okuyucu sisteme yerleştirildikten sonra 15 sn süre ile karıştırıldı ve 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk süre ile 344 nm'de absorbans değişimi kaydedildi.

3.4.3. Sitozolik Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Toprak solucanı örneklerinde sitozolik AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Enzim aktivitesi ölçümünde 0.0417 M asetiltiokoliniodid (ACTI) substrat olarak kullanıldı. Meydana gelen renk değişimine bağlı olarak ürün oluşumunun saptanması için, 412 nm'de okuma yapıldı. Toprak solucanı homojenatlarından elde edilen süpernatantlardan mikrolaka çukurlarına 10 μL pipetlendi. DTNB (Aldrich, USA) 0,00404 M olacak şekilde trizma tamponu kullanılarak (pH 8,0; 0,1 M) hazırlandı [77]. Reaksiyon karışımına 200 μL trizma tamponu (0,1 M; pH 8,0) ve son konsantrasyonda $9,39 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde DTNB

pipetlendi. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildi ve 10 saniye karıştırıldıktan sonra 25 °C’de 1 dk süre ile absorbans değişimi kaydedildi.

3.4.4. Mikrozomal Etoksiresorufin-O-deetilaz Aktivitesi

Toprak solucanı örneklerinden elde edilen mikrozom örneklerinde, EROD aktivitesi tayini amacıyla bir flourospektrometre (Molecular Devices Corp., Gemini XS) kullanıldı. Enzim aktivitesinin saptanması için Ex: 530, Em:586 dalga boylarında 10 dk süreyle okuma yapıldı. Okuma işlemlerinde düz tabanlı siyah 96 çukurlu mikrolaka (Grainer, USA) kullanıldı. Bu amaçla, 20 µL örnek üç tekrarlı olarak mikrolakaya pipetlendikten sonra (kör olarak fosfat tamponu kullanıldı), 220 µL 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) pipetlendi. Daha sonra 20 µL 50 µM etoksiresorufin ilave edildi. Son olarak 5 µL 10mM NADPH eklendi ve okuma yapıldı [78,79].

3.4.5. Mikrozomal ve Sitozolik Total Protein Tayini

Toprak solucanı total protein miktarı Bradford yöntemine göre, mikrolaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax) kullanılarak tayin edildi. Supernatant örnekleri 1/20, mikrozom örnekleri ise 1/10 oranında distile su ile sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikrolakalara pipetlendi. Üzerlerine 250 µL Bradford reagent eklendi. Mikrolaka sistemde 15 sn çalkalandıktan sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dk süreyle karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak absorbans değişimi 595 nm dalga boyunda ölçüldü [80]. Her örnek için protein tayini amacıyla okuma üç tekrarlı olarak yapıldı. Elde edilen değerler BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, örneklerdeki total protein değerleri bir paket programı (Slide) kullanılarak hesaplandı. Son olarak sulandırım faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki total protein değerleri hesaplandı. Elde edilen total protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan sitozolik ya da mikrozomal enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerimiz istatistiksel paket program (SPSS for Windows) kullanılarak değerlendirildi. Değişkenlerimiz ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Verilerimizin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro wilk testi ile saptandı ($p < 0.05$). Bu nedenle grupların enzim aktivitesi yönünden karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. Grupların ikili (grup içi) karşılaştırılmasında Bonferroni Mann-Whitney U testi kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Tomurcuk Döneminde Uygulanan metil paratyon ve bakır oksiklorür'ün Toprak Solucanı Üzerine Etkileri

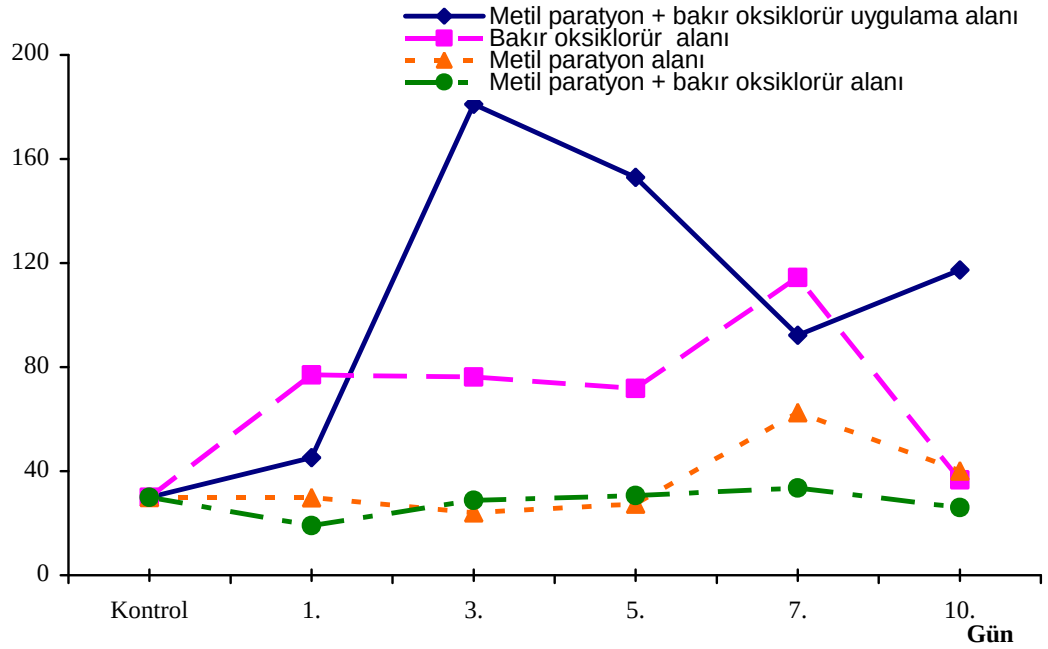
Metil paratyon + bakır oksiklorür uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen AChE enzimi aktivitesinde (Tablo 4.1), özellikle uygulamadan sonraki 3., 5., 7., ve 10. günlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir artış gözlemlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Metil paratyon ve bakır oksiklorür'ün tek başlarına etkisilerini kontrol etmek amacı ile uygulama yapılan alanlarda, bakır oksiklorür için solucanların AChE enzim aktivitesinde bir artış gözlenirken, metil paratyon için 7. gün hariç bir değişim saptanmadı. Bu değişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak 7. günde önemli bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4.1).

Tablo 4.1 Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Uygulama Alanı	Metil paratyon Alanı	Bakır oksiklorür Alanı	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Alanı
Kontrol	30.0±9.1	30.0±9.1	30.0±9.1	30.0±9.1
1.	45.2±14.2	29.8±11.3	77.0±26.5	19.1±1.9
3.	181.0±27.8*	24.0±2.6	76.2±29.4	28.8±1.5
5.	152.9±31.9*	27.4±2.3	71.8±24.4	30.6±4.3
7.	92.2±16.0*	62.5±21.9*	114.4±25.2*	33.5±2.0
10.	117.3±32.9*	40.1±20.4	36.7±10.8	26.0±2.2

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.1 Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında AChE aktivitesi üzerine etkisi

Metil paratyon + bakır oksiklorür uygulanan alandaki toprak solucanı örneklerinde EROD enzim aktivitesinde 1., 3. ve 5. günlerde bir artış gözlemlendi (Tablo 4.2) ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). EROD enzim aktivitesi 5. günden sonra kontrol grubun değerlerine yaklaşan bir eğilim gösterdi.

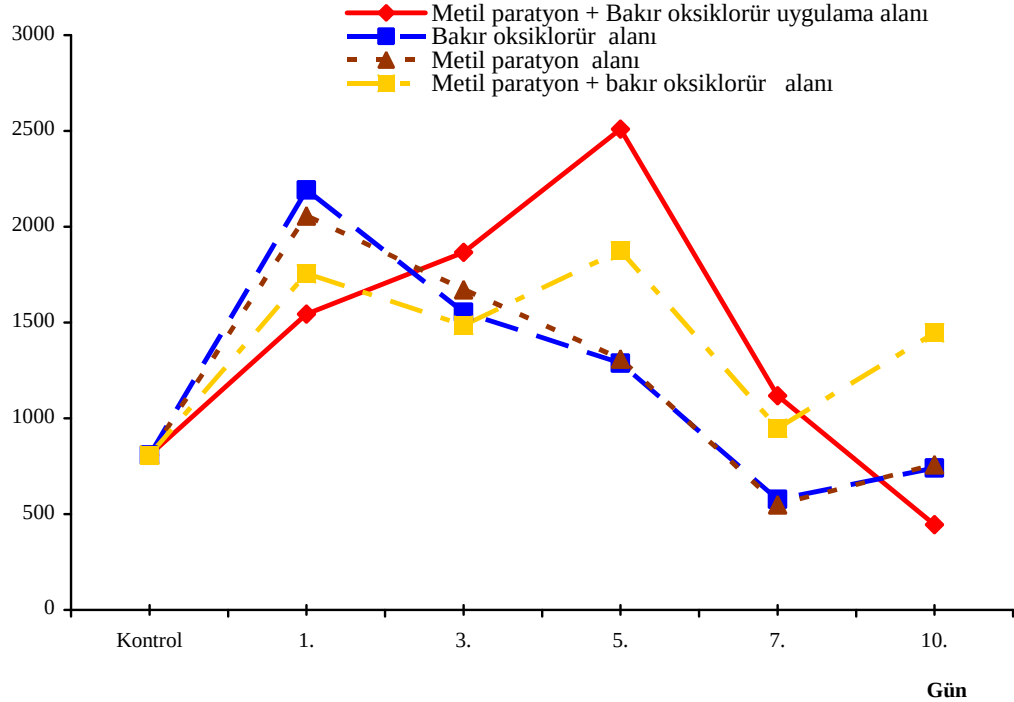
Benzer şekilde kontrol alanlarında da 1., 3. ve 5. günlerde EROD enzim aktivitesinde bir artış gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$). Ancak 7. gündeki enzim aktivitesinde bir düşüş gerçekleştikten sonra, yeniden bir artış gözlemlendi. Özellikle 10. günde metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımı kontrol alanındaki artış istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi, Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.2 Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde (pmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Uygulama Alanı	Metil paratyon Alanı	Bakır oksiklorür Alanı	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Alanı
Kontrol	808.85±49.053	808.85±49.053	808.85±49.053	808.85±49.053
1.	1544.78±114.889*	2056.58±151.298*	2192.51±263.627*	1755.35±207.319*
3.	1866.28±164.678*	1672.14±107.235*	1552.70±81.373*	1485.81±251.314*
5.	2509.41±194.661*	1310.47±135.654*	1287.81±163.657*	1874.10±191.109*
7.	1117.14±114.968	548.28±90.094	577.24±49.177	947.65±123.175
10.	444.19±41.826*	758.28±71.466	740.22±66.761	1445.93±120.495*

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).

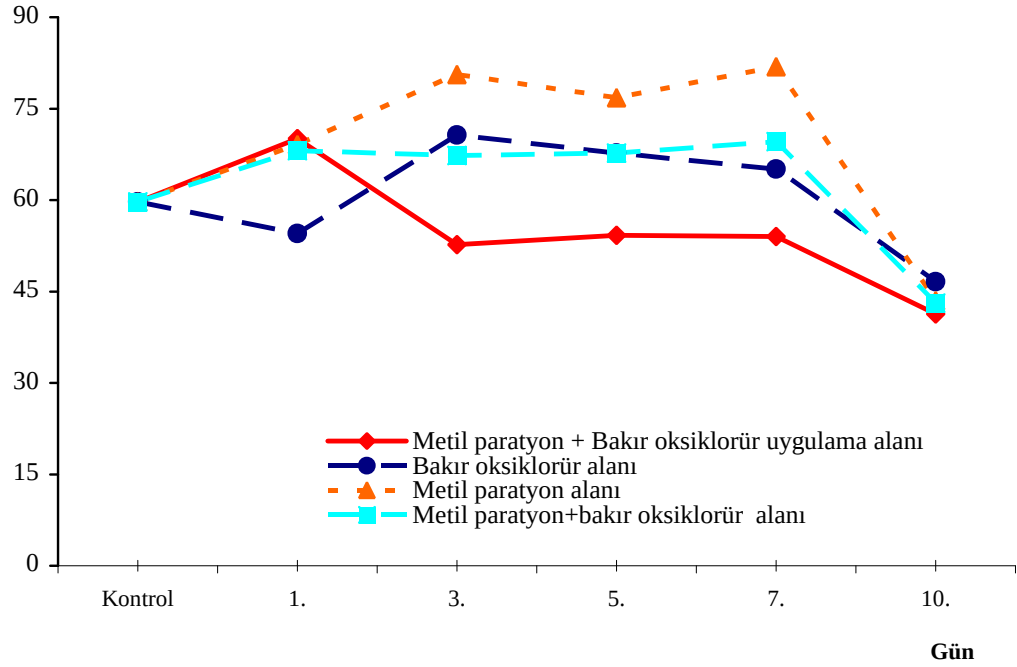


Şekil 4.2 Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında EROD aktivitesi üzerine etkisi

Metil paratyon + bakır oksiklorür çalışma alanına uygulandıktan sonra, uygulamayı takip eden 10 gün süresince, istatistiksel analiz sonuçlarına göre kontrol grubu (0. gün) ile karşılaştırıldığında GST enzim aktivitesinde önemli düzeyde farklılık (Tablo 4.3) olmadığı saptandı ($p>0.01$). Metil paratyon ve bakır oksiklorür'ün GST enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.3' de gösterilmektedir.

Tablo 4.3 Metil paratyon ve bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Uygulama Alanı	Metil paratyon Alanı	Bakır oksiklorür Alanı	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Alanı
Kontrol	59.7±5.3	59.7±5.3	59.7±5.3	59.7±5.3
1.	70.1±6.7	69.1±9.8	46.6±3.7	68.1±6.6
3.	52.7±7.2	80.6±14.7	65.1±4.2	67.3±4.6
5.	54.2±3.4	76.8±15.8	67.7±12.7	67.7±6.7
7.	54.0±14.2	81.9±16.6	70.7±15.4	69.6±4.7
10.	41.3±6.0	43.5±4.7	54.5±7.3	43.1±2.5



Şekil 4.3 Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında GST aktivitesi üzerine etkisi

Metil paratyon + bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen CE enzim aktivitesinde uygulamadan sonraki 3. güne kadar bir artış gözlenirken, 3. günden sonra enzim aktivitesi kontrol grubuna (0. gün) kıyasla yüksek olmasına rağmen, 1.ve 3. günlere göre bir azalma gözlemlendi (Tablo 4.4) ve bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Metil paratyon'un etkisini kontrol etmek amacı ile uygulama yapılan alandaki toprak solucanlarının CE enzim aktivitelerinde bir artış gözlenirken, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak 1. ve 3. günlerdeki farklılıklar önemli bulundu ($p<0.01$).

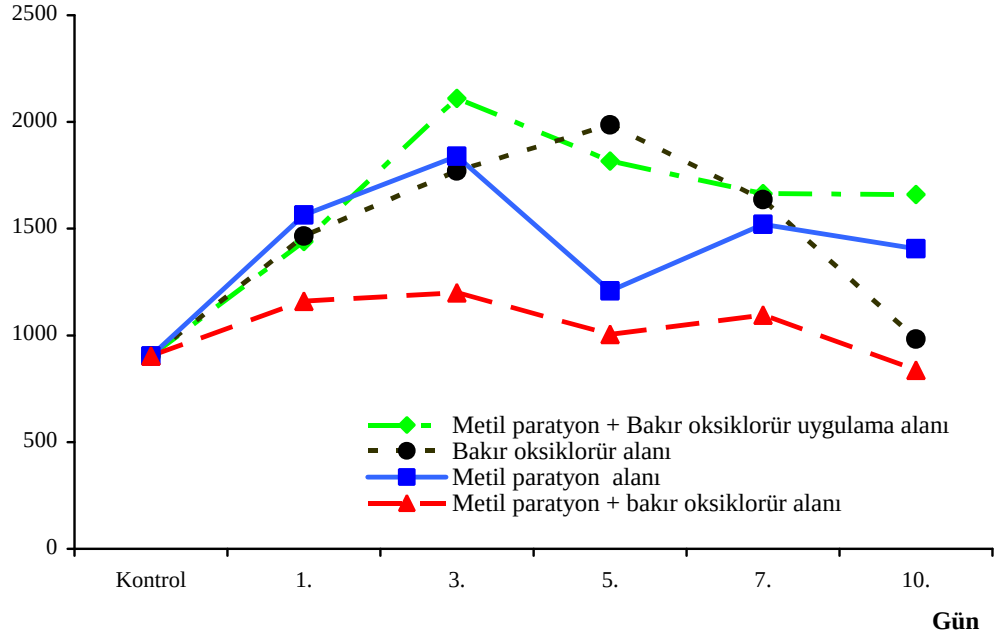
Bakır oksiklorür'ün etkisini kontrol etmek amacı ile uygulama yapılan alanda ise CE enzim aktivitesi bir artış gözlenirken, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak 1., 3., 5. ve 7. günlerdeki farklılıklar önemli bulundu ($p<0.01$).

Bütün kontrol alanlarında ve uygulama alanında 5. günden sonra CE enzim aktivitelerinin kontrol grubuna benzer değerlere ulaştığı saptandı. Bakır oksiklorür uygulanan kontrol alanındaki toprak solucanlarının CE enzim aktivitesindeki günlere bağlı olarak görülen düzenli artış ve daha sonra görülen normale dönüş Şekil 4.4' de gösterilmektedir.

Tablo 4.4 Metil paratyon ve Bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Uygulama Alanı	Metil paratyon Alanı	Bakır oksiklorür Alanı	Metil paratyon + Bakır oksiklorür Alanı
Kontrol	903.4±100.5	903.4±100.5	903.4±100.5	903.4±100.5
1.	1440.0±231.3*	1564.7±72.0*	1465.0±153.1*	1160.7±105.3
3.	2110.1±183.9*	1839.0±143.2*	1769.7±262.0*	1200.1±87.8
5.	1816.6±245.5*	1208.6±92.8	1985.7±271.7*	1005.3±75.8
7.	1665.0±111.8*	1520.0±488.2	1636.6±142.8*	1095.0±85.3
10.	1659.9±252.7*	1406.0±324.0	981.9±154.9	837.1±111.7

*Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.4 Metil paratyon ve bakır oksiklorür karışımının toprak solucanlarında CE aktivitesi üzerine etkisi

4.2. Çiçek Döneminde Uygulanan Tebukonazol'ün Toprak Solucanları Üzerine Etkisi

Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen AChE enzim aktivitesinde (Tablo 4.5) önemli düzeyde bir artış gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm günlerdeki farklılıklar önemli bulundu ($p<0.01$).

Tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek için yapılan uygulamada ise, AChE enzim aktivitesinde özellikle 3. ve 10. günlerde önemli artışlar gözlemlendi ve bu farklılıklar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

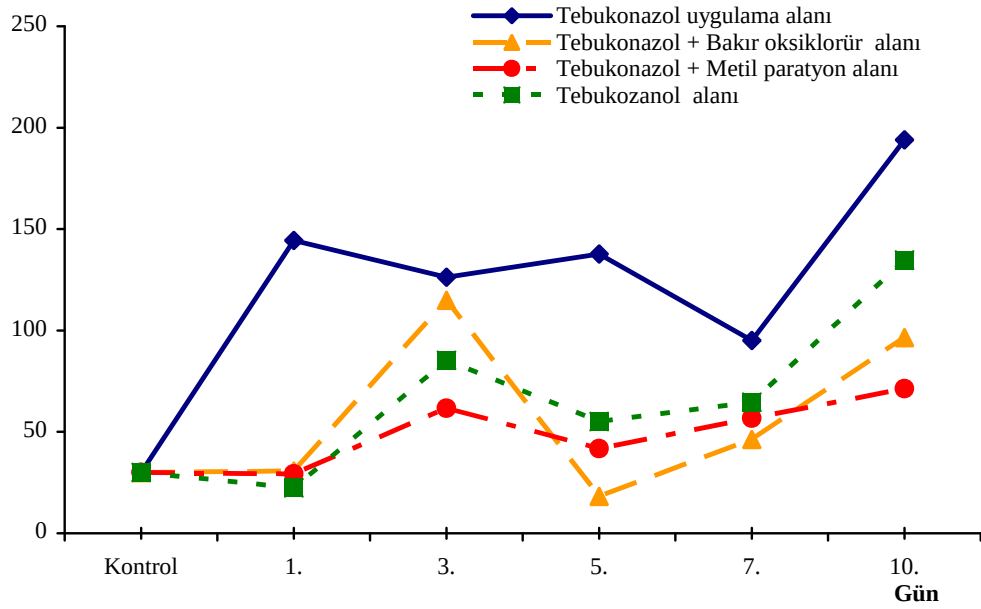
Daha önce sadece bakır oksiklorür uygulanan alanda tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek amacıyla yapılan uygulamada AChE enzim aktivitesinde kontrole kıyasla 3., 5. ve 10. günlerde bir artış gözlenmiş olup, bu artış istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Daha önce sadece metil paratyon uygulanan alanda tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek amacıyla yapılan uygulamada AChE enzim aktivitesinde kontrolle karşılaştırıldığında bir artış gözlenirken, bu artışın istatistiksel olarak 3. günde önemli düzeyde olduğu saptandı ($p<0.01$). Tebukonazol'ün AChE enzim aktivitesi üzerine zamana bağlı etkisi Şekil 4.5' de gösterilmektedir.

Tablo 4.5 Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Tebukonazol Uygulama Alanı	Tebukonazol Alanı	Bakır oksiklorür + Tebukonazol Alanı	Metil paratyon + Tebukonazol Alanı
Kontrol	30.0±9.1	30.0±9.1	30.0±9.1	30.0±9.1
1.	144.4±27.0*	22.5±2.1	30.7±7.7	29.3±4.1
3.	126.3±25.8*	85.3±34.1*	115.0±33.0*	61.7±26.5*
5.	137.7±19.6*	55.1±32.2	18.2±2.5	41.8±21.1
7.	95.1±25.5*	64.6±22.7	46.4±12.0*	56.7±30.2
10.	194.0±7.5*	134.8±41.1*	96.6±27.2*	71.3±34.1

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.5 Tebukonazol'ün toprak solucanlarında AChE aktivitesi üzerine etkisi

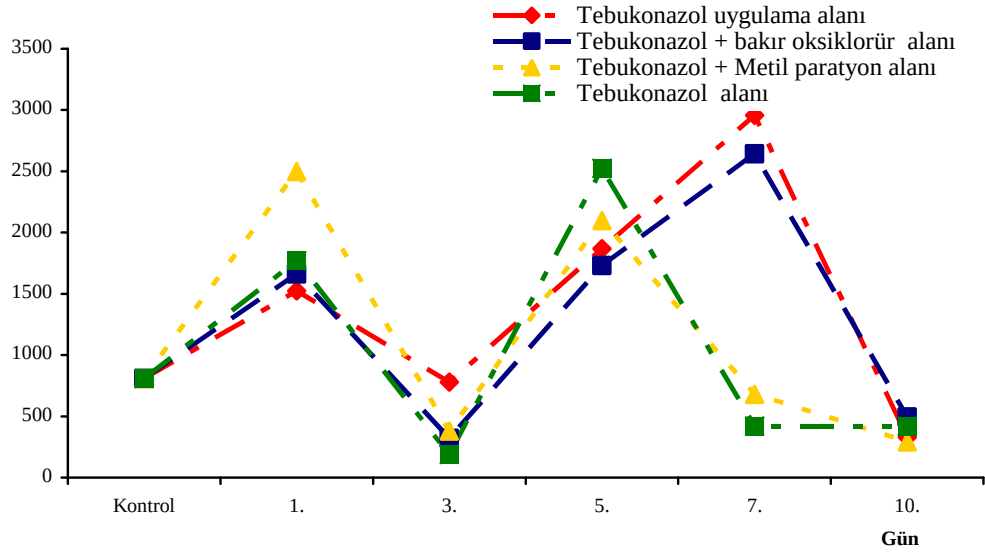
Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanı örneklerinde EROD enzim aktivitesinde 1., 5. ve 7. günlerde önemli artışlar gözlemlendi (Tablo 4.6) ve bu artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Ancak EROD enzim aktivitesinde 3. ve 10. günlerde ise düşüşler gözlemlendi. Enzim aktivitesindeki bu düşüş kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde kontrol alanlarında da 1. ve 5. günlerde EROD aktivitesinde bir artış gözlemlendi ve istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Ancak 7. günde bakır oksiklorür ve tebukonazol kontrol alanında enzim aktivitesinde bir artış gözlenirken, diğer kontrol alanlarında bir düşüş gözlemlendi ve kontrol alanlarındaki bu değişimler istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$).

Tebukonazolün EROD aktivitesi üzerine etkisinin zamana bağlı olarak değişimi Şekil 4.6’ da gösterilmektedir.

Tablo 4.6 Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde (pmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Tebukonazol Uygulama Alanı	Tebukonazol Alanı	Bakır oksiklorür + Tebukonazol Alanı	Metil paratyon + Tebukonazol Alanı
Kontrol	808.85±49.053	808.85±49.053	808.85±49.053	808.85±49.053
1.	1522.92±196.403*	1769.36±225.147*	1661.69±180.765*	2500.30±496.121*
3.	778.65±300.225	188.77±29.183*	319.50±24.034	382.10±64.793
5.	1867.10±132.722*	2525.35±395.048*	1730.10±234.986*	2099.90±123.524*
7.	2957.90±366.660*	419.63±56.146*	2641.62±122.229*	679.74±343.003
10.	329.31±24.234*	421.25±152.352	495.12±146.886	291.79±61.762*

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.6 Tebukonazol'ün toprak solucanlarında EROD aktivitesi üzerine etkisi

Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen GST enzim aktivitesinde (Tablo 4.7) bir düşüş gözlenirken, istatistiksel olarak bu farklılık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1., 5., 7. ve 10. günlerde önemli bulundu ($p<0.01$).

Tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek amacı ile yapılan uygulamada ise GST enzim aktivitesinde bir azalma gözlemlendi ve istatistiksel olarak bu farklılık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5. ve 7. günlerde önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$).

Daha önce sadece bakır oksiklorür uygulanan alan üzerine tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek amacıyla yapılan uygulamada GST enzim aktivitesinde kontrole kıyasla yine bir azalma gözlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak 5., 7., ve 10. günlerde önemli bulundu ($p<0.01$).

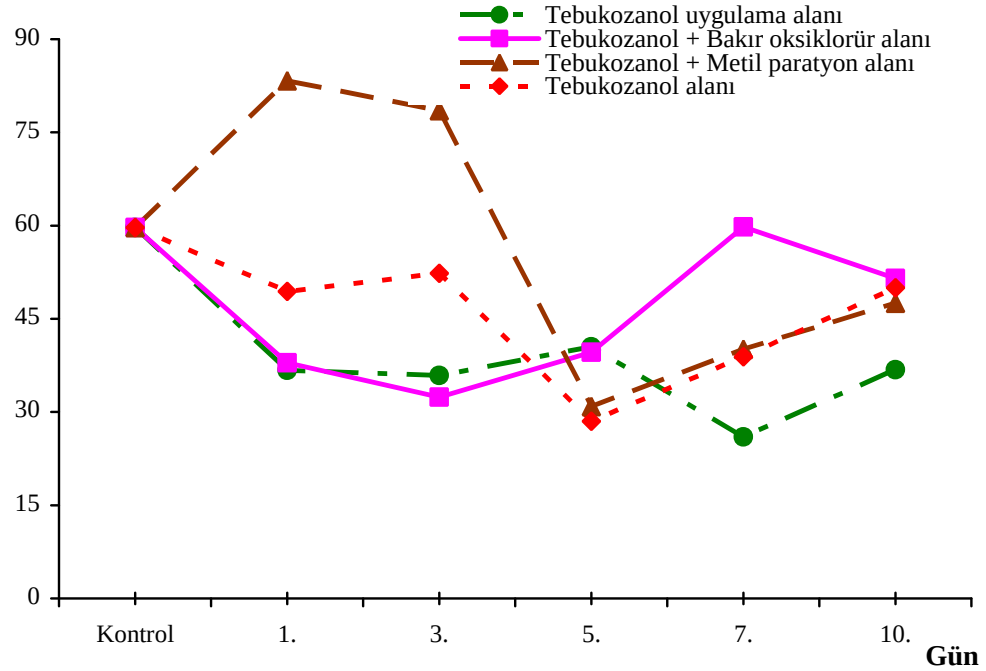
Daha önce sadece metil paratyon uygulanan alanda solucanlar üzerine tebukonazol'ün etkisini kontrol etmek amacıyla yapılan uygulamada, GST enzim aktivitesinde kontrole kıyasla ilk 3 gün içinde bir artış gözlemlendi ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Buna karşılık, 5. günde GST enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenmiştir ve bu düşüş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$).

Tebukonazol ve bakır oksiklorür uygulaması yapılan alanlardaki GST enzim aktivitesinde meydana gelen azalmaya karşılık, tebukonazol ve metil paratyon uygulaması yapılan alandaki GST enzim aktivitesinde artış (Şekil 4.7) saptandı.

Tablo 4.7 Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Tebukonazol Uygulama Alanı	Tebukonazol Alanı	Bakır oksiklorür + Tebukonazol Alanı	Metil paratyon + Tebukonazol Alanı
Kontrol	59.7±5.3	59.7±5.3	59.7±5.3	59.7±5.3
1.	36.7±4.9*	49.4±3.4	51.5±4.1	83.3±16.6
3.	35.9±6.8	52.3±2.4	59.8±2.9	78.5±18.4
5.	40.5±7.0*	28.5±1.6*	39.6±2.3*	30.9±2.2*
7.	26.0±1.6*	38.9±1.7*	32.4±1.4*	40.1±5.8
10.	36.8±3.2*	50.0±8.3	37.9±2.4*	47.5±2.1

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.7 Tebukonazol'un toprak solucanlarında GST aktivitesi üzerine etkisi

Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde ise 1., 3. ve 10. günlerde bir artış gözlenirken, kontrol grubu (0.gün) ile karşılaştırıldığında 10. gündeki artış istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.01$). Enzim aktivitesinde 5. ve 7. günlerde ise bir azalma gözlenmiş ancak bu istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmadı ($p>0.01$) (Tablo 4.8).

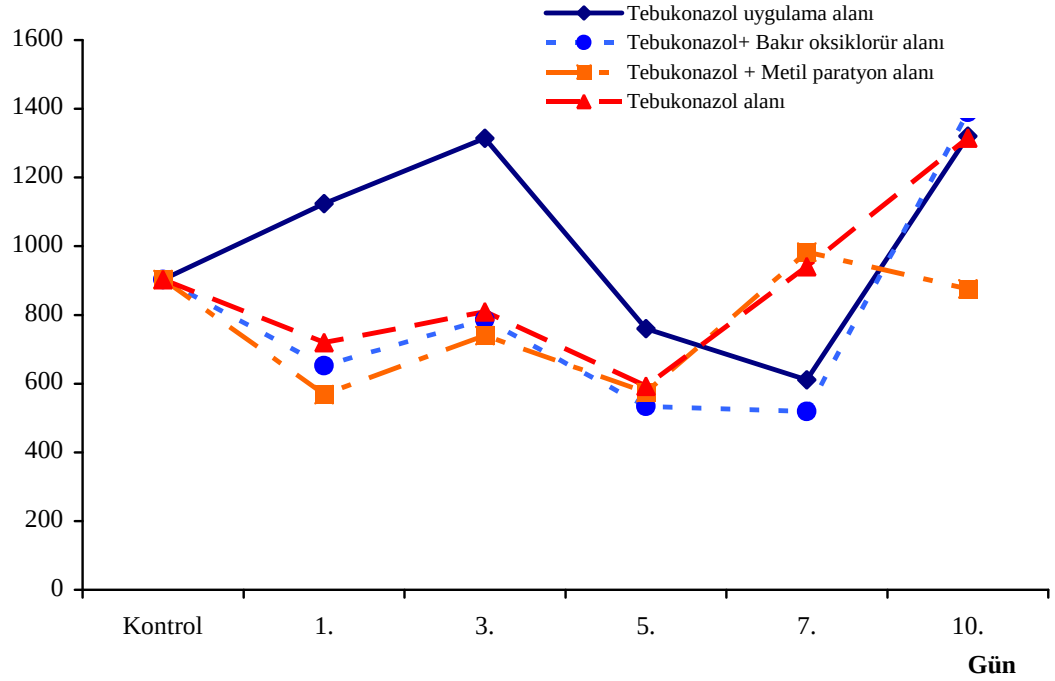
Daha önce sadece bakır oksiklorür uygulanan alan üzerine tebukonazol'un etkisini kontrol etmek amacıyla yapılan uygulamada CE enzim aktivitesinde kontrole kıyasla 10. güne kadar bir azalma gözlenirken, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak 5. ve 7. günlerdeki azalma önemli bulundu ($p<0.01$). CE enzim aktivitesinde 10. günde ise bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0.01$).

Tebukonazol uygulama alanında ilk 3 günde CE enzim aktivitesinde zamana bağlı olarak meydana gelen artış ve kontrol alanlarında meydana gelen enzim aktivitesindeki azalma Şekil 4.8' de verilmektedir.

Tablo 4.8 Tebukonazol uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Tebukonazol Uygulama Alanı	Tebukonazol Alanı	Bakır oksiklorür + Tebukonazol Alanı	Metil paratyon + Tebukonazol Alanı
Kontrol	903.4±100.5	903.4±100.5	903.4±100.5	903.4±100.5
1.	1124.1±175.8	719.6±40.0	652.5±76.1	568.5±117.8
3.	1314.4±206.0	809.1±131.7	786.1±109.9	739.6±130.6
5.	760.0±88.7	592.5±182.4	533.6±40.4*	574.3±82.4
7.	611.0±65.7	940.3±129.0	519.1±92.4*	982.8±193.8
10.	1320.4±110.4*	1315.4±245.7	1389.6±257.2	875.7±192.7

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).



Şekil 4.8 Tebukonazol'un toprak solucanlarında CE aktivitesi üzerine etkisi

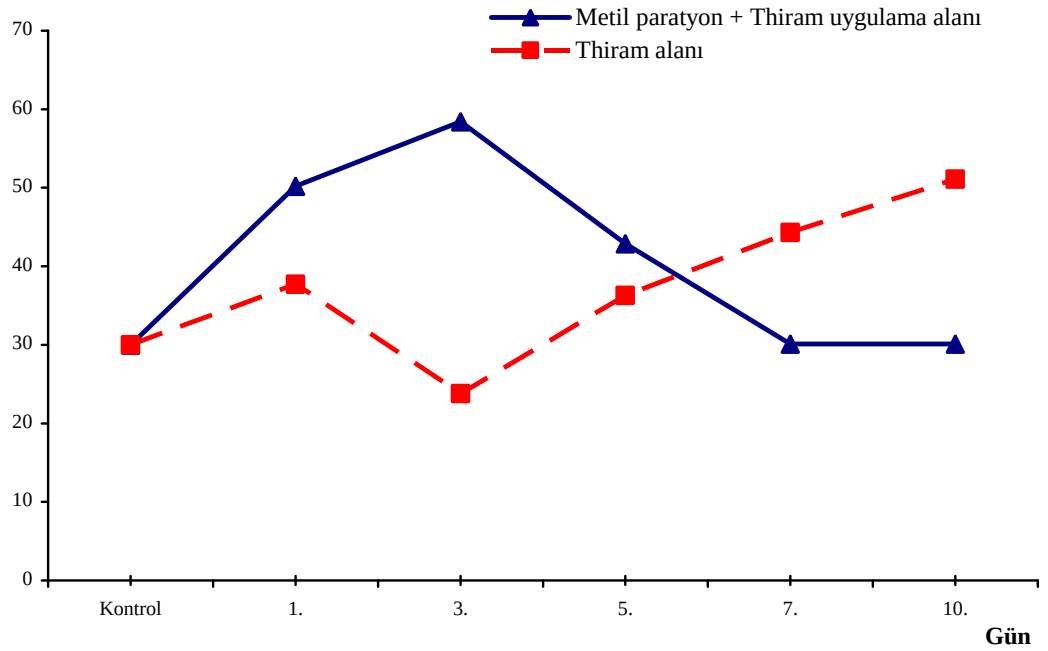
4.3. Meyve Döneminde Uygulanan Thiram ve Metil Paratyon'un Toprak Solucanları Üzerine Etkileri

Hem thiram ve metil paratyon karışımı, hem de sadece thiram uygulanan alanlardaki toprak solucanlarının AChE enzim aktivitelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir artış saptanmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.01$) (Tablo 4.9).

Thiram ve metil paratyonun AChE enzim aktivitesi üzerine etkisinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.9' da gösterilmektedir.

Tablo 4.9 Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında AChE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Thiram + Metil paratyon Uygulama Alanı	Thiram Alanı
Kontrol	30.0±9.1	30.0±9.1
1.	50.2±16.6	37.7±7.1
3.	58.4±15.3	23.8±9.1
5.	42.9±13.2	36.3±5.4
7.	30.1±3.7	44.3±8.6
10.	63.6±14.3	51.1±13.8

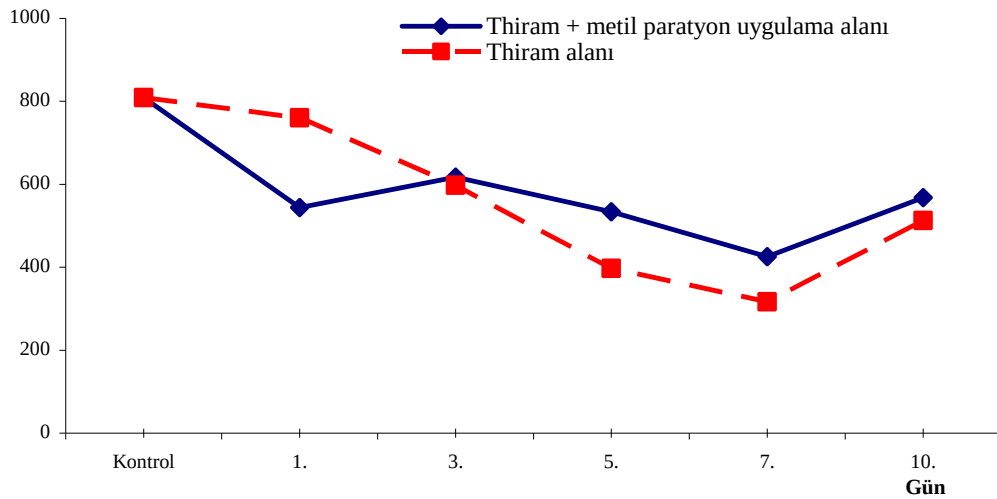


Şekil 4.9 Thiram ve metil paratyonun AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Hem thiram + metil paratyon karışımı uygulanan hem de sadece thiram uygulanan alanlardaki toprak solucanlarının EROD enzim aktivitelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir azalma gözlenmesine rağmen, bu azalış istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0.01$). Thiram ve metil paratyonun EROD enzim aktivitesi üzerine etkisinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.10’ da verilmektedir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında EROD enzim aktivitesinde (pmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Thiram + Metil paratyon Uygulama Alanı	Thiram Alanı
Kontrol	808.85±49.053	808.85±49.053
1.	544.23±63.197	760.17±218.695
3.	617.11±61.807	597.53±81.500
5.	533.44±81.319	397.54±83.676
7.	425.42±116.608	316.81±82.342
10.	568.14±109.404	512.82±195.103



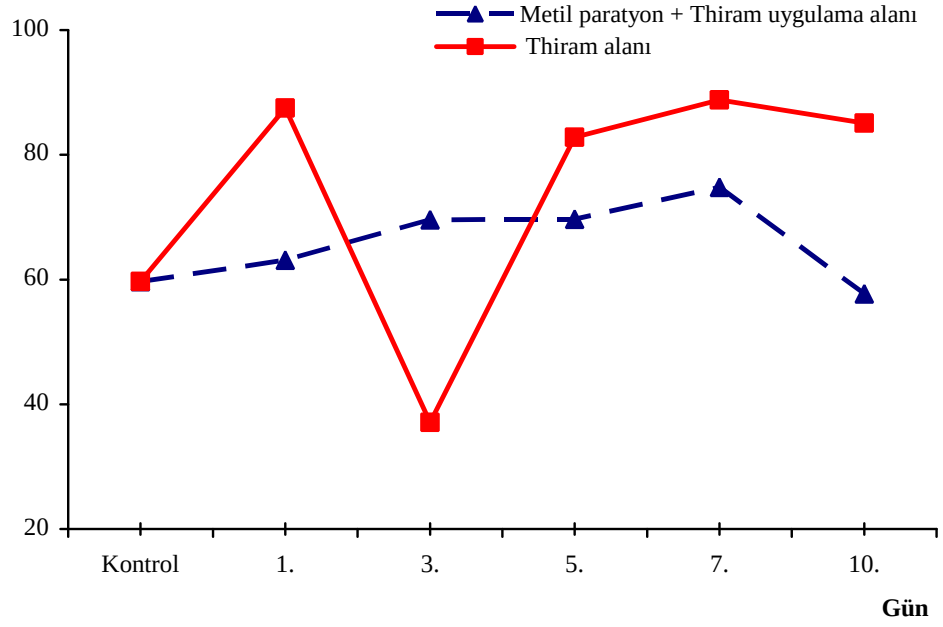
Şekil 4.10 Thiram ve metil paratyonun EROD enzim aktivitesi üzerine etkisi

Thiram ve metil paratyon karışımı uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen GST enzim aktivitesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir (Tablo 4.11). Sadece thiram'ın etkisini gözlemek amacı ile oluşturulan thiram kontrol uygulaması alanındaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7. günde artış gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4.11).

Tablo 4.11 Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında GST enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Thiram + Metil paratyon Uygulama Alanı	Thiram Alanı
Kontrol	59.7±5.3	59.7±5.3
1.	63.1±13.8	87.5±14.0
3.	69.6±18.2	37.1±14.0
5.	69.7±13.6	82.8±11.5
7.	74.8±8.5	88.8±4.3*
10.	57.7±11.5	85.1±9.3

* Kontrol grubu ile uygulamanın diğer günleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulundu ($p<0.01$).

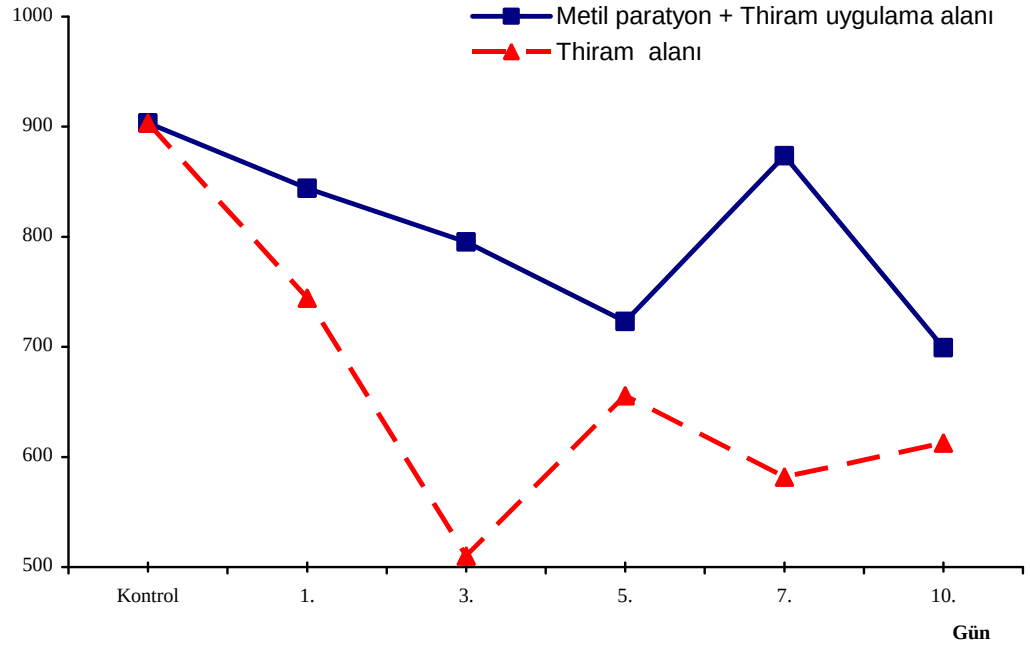


Şekil 4.11 Thiram ve metil paratyonun GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

Hem thiram + metil paratyon karışımı, hem de sadece thiram uygulanan alanlardaki toprak solucanlarının CE enzim aktivitelerinde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir azalma gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.01$) (Tablo 4.12) (Şekil 4.12).

Tablo 4.12 Thiram ve metil paratyon uygulanan alandaki toprak solucanlarında CE enzim aktivitesinde (nmol/dk/mg protein) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	Thiram + Metil paratyon Uygulama Alanı	Thiram Alanı
Kontrol	903.4±101.0	903.4±101.0
1.	844.1±89.9	744.5±103.8
3.	795.3±97.9	510.1±133.1
5.	723.0±81.8	655.7±113.8
7.	873.7±119.1	581.9±48.3
10.	699.2±95.7	612.8±53.3



Şekil 4.12 Thiram ve metil paratyonun CE enzimi aktivitesi üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farklı kimyasal bileşimlere sahip binlerce pestisit, günümüzde dünyanın her yerinde tarım ürünlerini zarar veren böceklere, funguslara, yabancı otlara ve diğer zararlılara karşı kullanılmaktadır [9]. Tarımda kullanılan bu pestisitlere, kaçınılmaz olarak hedef olmayan organizmaların da maruz kalması nedeniyle, birçok faydalı tür üzerinde olumsuz etkiler ve onların aktivitelerinde istenmeyen sonuçlar meydana gelebilir [10]. Tarımsal mücadelede yaygın olarak kullanılan çeşitli pestisitlerin, karasal ekosistem üzerine olumsuz etkilerinden dolayı, son dönemlerde bu etkileri göstermeyi amaçlayan ekotoksikite çalışmaları da giderek önem kazanmıştır. Pestisitlerin toprak organizmaları üzerine etkileriyle ilgilenen ekotoksikoloji araştırmaları, pestisitlerin toksisitesini ve karasal ekosistem üzerine bu çevresel kirleticilerin potansiyel riskini değerlendirebilmemiz için gereklidir [12]. Bu bağlamda ilk kez pestisitlerin çevresel etkilerini vurgulayan Rachel Carson, ekotoksikolojik araştırmaların da başlatıcısı olarak kabul edilebilir [81].

Bu çalışmamızda biyoindikatör organizma olarak kullandığımız toprak solucanları, hem toprağın verimliliğinde hem de besin zincirindeki rolleri nedeniyle, pestisitlerden önemli düzeyde etkilenen toprak canlıları arasındadır. Birçok çalışma, toprak solucanlarının yaşaması, gelişmesi, üremesi, metabolizması, enzim aktiviteleri ve sinir sistemi üzerine organofosforlu, organoklorlu ve karbamat pestisitlerin olumsuz etkilerini göstermektedir [19, 53, 63, 73].

Kayısı yetiştiriciliğinde yöremizde en fazla tercih edilen ve bu nedenle çalışmamızda da kullandığımız pestisitler, insektisit ya da fungusit olarak kullanılan kimyasal ajanlardır. Bu amaçla seçilmiş olan metil paratyon, bakır oksiklorür, tebukonazol ve thiram'ın toprak solucanlarının GST, AChE, CE ve EROD enzim aktiviteleri üzerinde farklı uygulama şekillerine göre, toksik etkilere neden oldukları bu çalışma ile saptandı.

Pestisitlerin uygulama alanına başka pestisitlerle ya da tek tek uygulanmasının, biyobelirteç olarak seçilen enzim aktiviteleri üzerinde farklı etkilere neden olduğu gözlemlendi. Çalışmalar erken bahar aylarından itibaren başladığından, her pestisit uygulaması yağışsız bir havada yapılmasına rağmen, uygulamadan sonraki 24-48 saatlik zaman dilimlerinde bölgede gözlenen yağışlar, pestisitlerin yıkanma sonucunda toprağa daha hızlı karışmasına ya da topraktan yıkanarak uzaklaşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda kullanılan pestisitlerin gözlenen etkisinin beklenen

sonuçlardan daha farklı olduğunu ifade edebiliriz. Bununla birlikte, özellikle fungusitlerle birlikte kullanılan OP insektisitler için çoğunlukla beklenen etkilerin, yani karakteristik AChE inhibe edici etkilerin ortaya çıkmadığı saptandı.

Ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir detoksifikasyon enzimi olan GST aktivitesinin, metil paratyon+bakır oksiklorür uygulanan alanlardaki toprak solucanlarında indüklenmesi beklenirken, düşük düzeyde artışlar gözlemlendi ve istatistiksel olarak da önemli bir artış saptanmadı. Yapılan bazı çalışmalarda da pestisitlere karşı GST enzim aktivitesinin mesokozm ve laboratuvar çalışmalarına kıyasla, alan çalışmalarında daha az indüklendiği bildirilmektedir [69, 70]. Literatürde ifade edilen bu sonuçlar, bizim çalışmamızda gözlediğimiz sonuçlar ile de uyumaktadır. Tebukonazol uygulamasında ise, GST enzim aktivitesinde kısmi inhibisyon saptanmasına rağmen, bunun tebukonazolün Sitokrom P450 enzimlerine daha yüksek affinite göstermesi [36] ve hava şartlarındaki farklılıklardan meydana geldiği tahmin edilmektedir. Thiram ve metil paratyon uygulamasında ise GST enzim aktivitesinde yine düşük düzeyde artışlar gözlenmesine rağmen, istatistiksel değerlendirmeler de bu artışların 7. gün hariç önemli bir düzeyde olmadığı saptanmıştır.

AChE, özellikle organofosforlu (OP) ve karbamat pestisit toksisitesinin uyarılarını hızlı bir şekilde gösterdiği için, yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir [52]. Buna karşılık, çeşitli çalışmalarda kullanılan pestisitlerin arazi koşullarında AChE enzim aktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir [69]. Çalışmamızda ise metil paratyon + bakır oksiklorür uygulaması sonucunda AChE enzim aktivitesinde bir indüksiyon saptandı. Ancak metil paratyonun ve bakır oksiklorürün ayrı ayrı uygulanması sonucunda ise, sadece insektisit kullanılan alanda düşük düzeyde bir inhibisyon saptanmasına rağmen, yaygın kullanılan bu pestisitlerin AChE enzim aktivitesi üzerine önemli bir etkisi saptanmadı. Tebukonazol, thiram ve metil paratyon uygulamaları sonucunda ise AChE enzim aktivitesinde artışlar saptandı. Literatür bilgilerine göre, bakırın organizmalarda AChE enzim aktivitesini artırıcı olduğu bilinmektedir [82]. Buna bağlı olarak, bakır bileşimli fungusit ile birlikte kullanılan insektisit ya da sadece bakırlı fungusit uygulamasının yapıldığı alanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AChE aktivitesindeki artış, bakırın bu etkisine bağlanabilir. Bu verilerimiz literatür verileri ile uyumakta olup, bu durumun toksisiteyi azaltıcı bir etki olarak değerlendirilmemesi gerekir.

Faz I detoksifikasyon enzimlerinden olan CE aktivitesinde metil paratyon + bakır oksiklorür uygulaması sonucunda, bir artış meydana geldiği saptanmıştır. Aynı

şekilde tebukonazol uygulaması sonucunda da önemli bir artış saptanmıştır. Ancak, metil paratyon ve thiram uygulaması sonucunda CE enzim aktivitesinde bir baskılanma saptanmıştır. Bu aktivite baskılanmasının sebebinin, pestisitlerin CE enzimi için alternatif fosforilizasyon alanları olabileceğini akla getirmektedir. Literatürde de pestisitler için alternatif fosforilizasyon alanları olduklarından dolayı, CE'lerin veya B-esterazların inhibisyonunun, kolin esterazlardan daha hızlı olduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle CE enziminin pestisit maruziyetine karşı kolin esterazlardan daha duyarlı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği de bildirilmektedir [57]. Araştırmanın sonucunda elde edilen bulgulara bu çalışma için CE aktivitesinde gözlenen değişimlerin iyi bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

Sitokrom P450 enzim sistemi içerisinde yer alan ve Faz I detoksifikasyon enzimi olan EROD (Sitokrom P4501A) aktivitesi, endüstride ve tarımda kullanılan PAH'lar, PCB'ler, dioksinler ve pestisitler gibi birçok önemli organik kimyasal tarafından indüklenir ve bu tipteki kirleticiler için bir biyobelirteç olarak kullanılırlar [61, 62]. Çalışmamızda da literatüre paralel olarak, metil paratyon + bakır oksiklorür karışımı uygulaması ve tebukonazol uygulaması sonucunda, bu pestisitlerin EROD enzim aktivitesi üzerinde önemli düzeyde indükleyici etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak metil paratyon ve thiram karışımı uygulaması sonucunda, kısmen inhibisyon gözlenmesine rağmen, EROD aktivitesi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki saptanmadı.

Çalışma esnasında farklı pestisit uygulamalarına bağlı olarak, seçilen enzim aktivitelerinde gözlenen değişimlerin bir nedenin de çalışma alanına uygulama döneminden bir önceki sonbahar aylarında uygulanmış olan sentetik gübreleme olduğu düşünülmektedir. Alanda kullanılan bu gübrenin de kullanılan pestisitler ile birlikte, toprak solucanları üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çevremizde tarımsal amaçlarla kullanılan birçok kimyasal madde, ekosistemde çeşitli olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu etkiler kullanılan ajanların yapısına, uygulama şekline, doza ve hedeflenen türlere göre değişebilir. Sonuçta bu kimyasallar çeşitli türleri olumsuz etkileyerek ekosistem dengelerinin, insan ve çevre sağlığının bozulmasına yol açabilirler. Karasal ekosistemin önemli organizmalarından biri olan toprak solucanları üzerinde ortaya çıkabilecek bu olumsuz etkiler, birçok canlının da bundan olumsuz etkilenmesine ve bu organizmaların asıl işlevlerini yerine getirememesi sonucunda, zaman içinde tarımsal verimin de azalmasına yol açacaktır. Bu etkilerin ortaya konulması bakımından bu çalışmanın bir model olarak değerlendirilebileceğini de düşünebiliriz.

6. KAYNAKLAR

- [1] Toprak Kirliliğinin Önemi, [http:// www. rshm saglik.gov.tr](http://www.rshm.saglik.gov.tr).
- [2] Tan, K.H. Environmental Soil Science, 1995, Marcel Dekker, Inc. New York, United States.
- [3] C.D. Klaassen (Ed), 8th Edition, *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*, McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2001, 1236p.,
- [4] Kolankaya, D., *Organochlorine pesticides, residues and their toxic effects on the environment and organisms in Turkey*, **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, 2006, Vol. 86, No: 1-2, pp. 147-160(14)
- [5] Agrichemical Pesticides, <http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/gwprimer/gw-pest/pest.html>
- [6] Ecological Effects, [http://www.extoxnet.orst.edu /tibs/ecologic.htm](http://www.extoxnet.orst.edu/tibs/ecologic.htm)
- [7] Kocataş, A., **Ekoloji ve Çevre Biyolojisi**, E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi yayınları ders kitapları dizisi No:20, 2006, 9.baskı
- [8] Pimental, D., Levitan, L., *Pesticides; amount applied and amount reaching pests*. **Bioscience** 1986, 36: 86-91
- [9] Panda S., Sahu, S.K., *Recovery of acetylcholine esterase activity of *Drawida willsi* (*Oligochaeta*) following application of three pesticides to soil*, **Chemosphere**, 2004, 55: 283–290
- [10] Yu, Y.L., Wu, X.M., Li, S.N, Fang, H., Tan, Y.J., Yu, J.Q., *Bioavailability of butachlor and myclobutanil residues in soil to earthworms*. **Chemosphere**, 2005, (IN PRESS).
- [11] Panda, S., Sahu, S.K., *Effects of malathion on growth and reproduction of *Drawida willsi* (*Oligochaeta*) following application of three pesticide under laboratory conditions*. **Soil Biol. Biochem.**, 1999, 31, 363-366.
- [12] Zhu, X.L., Han, D.G., Han, Z.G., Feng, W.Z., *Initial study of controlling trips in rice seedling by imidacloprid*, **Pesticides**, 1996, 35, 42-43.
- [13] Baker G. H., *The ecology, management and benefits of earthworms in agricultural soils, with particular reference to southern Australia*. In "Earthworm Ecology", 1998
- [14] Sims, R. W. and Gerard, B. M., *Earthworms*, 1999.
- [15] Bouche, M.B., *Earthworm species and ecotoxicological studies*. In Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ and Heimbach eds., *Ecotoxicology of earthworms*, 1992, Intercept, Andover, UK pp.20

- [16] Viswanathan, R., *Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms*, **Chemosphere**, 1997, Vol. 35: 323-337
- [17] Luo, Y., Zang, Y., Zhong, Y., Kong, Z., *Toxicological study of two novel pesticides on earthworm Eisenia Foetida*, **Chemosphere**, 1999, 39: 2347-2356
- [18] Lee, K.E., *Earthworms: their ecology and relationship with soils and land use*. **Acad pres, Australia**, 1985, pp.278-292.
- [19] Tarrant, K. A., Field, S. A., Langton S. D. and Hart, A. D. M., *Effects On Earthworm Populations Of Reducing Pesticide Use In Arable Crop Rotations*, **Soil Biol. Biochem**, 1997, 29 (314): 657-661
- [20] Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulaen, P. E., *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*, **Environ. Toxicol. and Pharmacol.**, 2003, 13: 57-149
- [21] What is a Pesticide?, <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>
- [22] Römbke J., Moltmann j. F., **Applied Ecotoxicology**, 1996, 45-49
- [23] Rao, P.S.C. and Hornsby, A.G., Behavior of Pesticides in Soils and Water, Soil Science Fact Sheet SL40, May 1993, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida
- [24] Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W., Burt, J.P., *The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making.*, **Rew. Environ.Contam.Toxicol.**, 1992, 123:1-155.
- [25] Pesticides, <http://www.ecifm.rdg.ac.uk/pesticides.htm>
- [26] Classified Lists of Pesticides, http://www.hclrss.demon.co.uk/class_pesticides.html
- [27] About pesticides, General Information, http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/a_3.htm
- [28] Ramesh, P.T., *Impact Assessment Of Pesticides To Non Target Organisms : Earthworms*, Department of Environmental Sciences Tamil Nadu Agricultural University Coimbatore – 641 003
- [29] Tsoukali, H., Theodoridis, G., Raikos N. and Grigoratou, I., *Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples*, **Journal of Chromatography B**, 2005, 822; 194–200
- [30] Kolosova, A. Y., Park, J., Eremin, S. A., et.al., *Comparative study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesticide parathion-methyl in real samples*, **Analytica Chimica Acta**, 2004, 511: 323–331

- [31] Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., Chovelon, J., *Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors*, **Analytica Chimica Acta**, 2002, 459:33–41
- [32] Teraokaa, H., Urakawaa, S., Nanbaa, S., Nagaia, Y., Donga, W., Imagawac, T., Tanguayd, L. R., Svobodae, K., Handley-Goldstonef, M. H., Stegemanf, J. J., Hiragaa, T., *Muscular contractions in the zebrafish embryo are necessary to reveal thiuram-induced notochord distortions*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2006, 212: 24 – 34
- [33] Zhao, Y., Zheng, X., Huang, Z., Yan, M., *Voltammetric study on the complex of thiram–copper(II) and its application*, **Analytica Chimica Acta**, 2003, 482: 29–36
- [34] Dalvi, P.S., Wilder-Kofie, T., Mares, B., Dalvi, R.R. and Billups, L.H., *Toxicologic implications of the metabolism of thiram, dimethyldithiocarbamate and carbon disulfide mediated by hepatic cytochrome P450 isozymes in rats*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2003, 74: 85–90
- [35] Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Hollomon D. W. and Kelly, S. L., *Expression, purification, reconstitution and inhibition of Ustilago maydis sterol 14 α -demethylase (CYP51; P450_{14DM})*, **FEMS Microbiology Letters**, 1998, 169(2): 369-373
- [36] Lamb, D. C., Cannieux, M., Warrilow, A. G. S., Bak, S., Kahn, R. A., Manning, N. J., Kelly, D. E. and Kelly¹, S. L., *Plant Sterol 14 α -Demethylase Affinity for Azole Fungicides*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001, 284:845–849
- [37] Copper oxychloride, <http://www.barmac.com.au/coppoxy.html>
- [38] Helling, B., Reinecke, S. A. and Reinecke, A. J., *Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of Eisenia fetida (Oligochaeta)*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2000, 46:108 - 116
- [39] Paoletti, M. G., *The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators*, **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 1999, 74 :137–155
- [40] 6th International Symposium on Earthworm Ecology, 1998. In: **Pedobiologia: International Journal of Soil Biology**, 1999, 6 Vol. 43; 481 - 906
- [41] Boşgelmez A., Boşgelmez İ. İ., Savaşçı S., Paşlı N., **EKOLOJİ-II “TOPRAK”**, 2001, s;890-895
- [42] Demirsoy A., **Yaşamın Temel Kuralları**, Omurgasızlar=İnvertebrate, Böcekler dışında, Cilt II/Kısım I, 1999, 3. baskı, s; 665-682

- [43] Edwards, C.A. and Bohlen, P.J., *Biology and Ecology of Earthworms*, 1996, (3rd ed.), Chapman and Hall.
- [44] Baker, G.H., Thumler, T., Meisel, L.S., Carter, P.J., Kilpin, G.P.
"Earthworms Downunder": a survey of the earthworm fauna of urban and agricultural soils in Australia, **Soil Biology & Biochemistry**, 1997, 29(3/4): 589-597.
- [45] Alan D. Tomlin, *Earthworm Biology*, Pest Management Research Center Agriculture & Agri-Food Canada, 2006
- [46] Species Identification, <http://www.nurturingnature.co.uk/pages/subpages>
- [47] Schwert, D. P., *Oligochaeta: Lumbricidae, Soil Biology Guide*, in D. L. Dindal editor, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990, P. 341- 356
- [48] Bineli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., *New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (Dreissena polymorpha)*, **Chemosphere**, 2006, 62:510–519
- [49] Shapira M., Seidman S., Livni N., Soreq H.,. *In vivo and in vitro resistance to multiple anticholinesterases in Xenopus laevis tadpoles*, **Toxicology Letters**, 1998, Vol. 102-103, 205-209.
- [50] Bukowska, B., Hutnik, K., *2,4-D and MCPA and their derivatives: Effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro)*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2006, (IN PRESS)
- [51] Senger, M. B., Rosemberg, D.B., et.al., *In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebra fish (Danio rerio) brain*, **Toxicology in Vitro**, 2006, (IN PRESS)
- [52] Rao, J. W., *Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, Oreochromis mossambicu,*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2006, (IN PRESS)
- [53] Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Hankard, P.K., *Toxicological and biochemical responses of the earthworm Lumbricus rubellus to pyrene, a non carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon*, **Chemosphere**, 2004, 57: 1675–1681
- [54] Park, Y., Choi, S. Y., Lee, H., *A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus P1; purification, characterization, and expression*, **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, 1760: 820–828

- [55] Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C., Potter, P. M., *Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases*, **B i o c h e m i c a l Pharmacology**, 2 0 0 6 , 7 1: 6 5 7–6 6 9
- [56] Gilman, A.P., Vardanis, A., *Carbofuran. Comparative toxicity and metabolism in the worms Lumbricus terrestris L. and Eisenia foetida S.*, **J Agric. Food Chem.**, 1974, 22(4):625-8.
- [57] Küster, E., *Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (Danio rerio) and their potential use for insecticide hazard assessment*, **Aquatic Toxicology**, 2005, 75: 76–85
- [58] Satoh, T., *Toxicological implications of esterases—From molecular structures to functions, a review*, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2005, 207:11 – 18
- [59] Maqbool, Q., Johri, S., Rasool, S., et.al., *Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from Bacillus subtilis (RRL BB1)*, **Journal of Biotechnology**, 2006, (IN PRESS)
- [60] Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., Ranson, H., *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2004, 34: 653–665
- [61] Camus, L., Aas, E., Borseth, J. F., *Ethoxyresorofin-o-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (Scophthalmus maximus L.) Exposed to a Dispersed Topped Crude Oil in a Continuous Flow System*, **Marine Environ. Research**, 1998, 46:29-32
- [62] Agradi, E., Baga, R., Cillo, F., Ceradini, S., Heltai, D., *Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water*, **Chemosphere**, 2000, 41:1555-1562
- [63] Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Vernet, G., *Acute and Sublethal Effects of Two Insecticides on Earthworms (Lumbricus terrestris L.) under Laboratory Conditions*, **Environ. Toxicol.** 2003, 18: 1–8
- [64] Booth, L.H., Heppelthwaite, V.J., O'halloran, K., *Growth, Development and Fecundity of the Earthworm Aporectodea caliginosa After Exposure to Two Organophosphates*, **New Zealand Plant Protection**, 2000, 53:221-225
- [65] Booth, L.H., Heppelthwaite V., and Eason, C.T., *Cholinesterase and Glutathione S-Transferase In The Earthworm Aporectodea caliginosa As Biomarkers of Organophosphate Exposure*, **Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf:** 1998, 138-142

- [66] Nahmani, J., Lavelle, P., Lapied, E. and van Oort, F., *Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France*, **Pedobiologia**, 2003, 47: 663–669
- [67] Spurgeon, D. J., Svendsen, C., Rimmer, V. R., Hopkin, S. P, Weeks, J. M., *Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc*. **Environmental Toxicology and Chemistry** , 2000, 19: 1800–1808.
- [68] Mosleh, Y. Y., Ismail, S. M. M., Ahmed, M. T., Ahmed, Y. M., *Comparative Toxicity and Biochemical Responses of Certain Pesticides to the Mature Earthworm *Aporrectodea caliginosa* under Laboratory Conditions*, **Environ. Toxicol.**, 2003, 18: 338–346
- [69] Booth, L.H., Hodge, S., O'Halloran, K., *Use of Cholinesterase in *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Lumbricidae) to Detect Organophosphate Contamination: Comparison of Laboratory Tests, Mesocosms, and Field Studies*, **Environ. Toxicol. and Chemistry**, 2000,19: 417-42
- [70] Capowiez Y., Rault M., Mazzia C., Belzunces L., *Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid*, **Pedobiologia**, 2004, 47(5-6): 542-547
- [71] Scholz, Nathaniel L., Truelove, Nathan K., Labenia, Jana S., Baldwin, David H., Collier, Tracy K., *Dose-Additive inhibition of chinook salmon acetylcholinesterase activity by mixtures of organophosphate and carbamate insecticides*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2005, 25 (5): 1200-1207
- [72] Achazi, R.K., Flenner, C., Livingstone, D.R., Peters, L.D., et.al., *Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids*, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 1998, 121: 339–350
- [73] Luo Y., Zang Y., Zhong Y., Kong Z., *Tokxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia Foetida**, **Chesmosphere**, 1999, 39: 2347-2356
- [74] Nousiainen, U., and Torronen, R., *Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in rat liver by in vivo and in vitro inhibition*. **Gen. Pharmacol.**, 1984, 15, pp. 223–227.
- [75] Santhoshkumar, P., and Shivanandappa, T., *In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver*, 1999, **Chemico-Biological Interactions**, Vol.;119-120,Pages277-282
- [76] Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B., *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, 1974, **J. Biol. Chem.**, 249, pp. 7130–7139.

- [77] Ellman, G.L., Coutney, K.D., Anders Jr. V. and Featherstone, R.M., *A new and rapid colourimetric determination of acetylcholinesterase activity*, **Biochem. Pharmacol.**, 1961, 7 pp. 85–95.
- [78] Mayer, B. and Mayer, R.T., *Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene*, **Drug Metab. Dispos.**, 1974, pp. 583–588.
- [79] Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. and Tillitt, D.E., *Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure*, **Crit. Rev. Toxicol.**, 2000, 30, pp. 347–570.
- [80] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding*, **Anal. Biochem.**, 1976, 72, pp. 248–254.
- [81] Carson, R., *Sessiz Bahar*, Çağatay GÜLER (Çev.), Palme yayıncılık, 2004, Ankara
- [82] Romani, R., Antognelli C., Baldracchini F., et. al., *Increased acetylcholinesterase activities in specimens of Sparus auratus exposed to sublethal copper concentrations*, **Chemico-Biological Interactions**, 2003, 145: 321- 329

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ertan YOLOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya – 26.02.1982
Mesleği ve Ünvanı : Biyolog

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : İnönü Üniversitesi Kampüs İlköğretim Okulu
(Malatya, 1988-1993)
Ortaokul : Atatürk İlk Öğretim Okulu (Malatya, 1993-1996)
Lise : Hacı Ahmet Akıncı Lisesi (Malatya, 1996-2000)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, (Malatya, 2000-2004)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, (Malatya, 2004-2006)

Bilimsel faaliyetler

- 1- *Bir Kayısı Bahçesinde Pestisit Uygulamasının Toprak Solucanlarına (Lumbricus Terrestris) Etkisi*, XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası/AYDIN. (Poster sunumu).
- 2- XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2002, İnönü Üniversitesi, MALATYA (Görevli).