



**BENTAZONE ve CHLORİDAZON HERBİSİTLERİNİN  
*Eisenia hortensis* TÜRÜ ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neşe TUNA

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK  
ANABİLİM DALI

Haziran, 2017

Bu tez çalışması 15.FEN.BİL.44 numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BENTAZONE ve CHLORİDAZON HERBİSİTLERİNİN *Eisenia hortensis* TÜRÜ ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Neşe TUNA**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**Haziran, 2017**

## TEZ ONAY SAYFASI

Neşe TUNA tarafından hazırlanan “Bentazone ve Chloridazon Herbisitlerinin *Eisenia hortensis* Türü Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK

**Başkan** : Doç. Dr. Recep LİMAN  
Uşak Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fak.

**Üye** : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
Afyon Kocatepe Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK  
Afyon Kocatepe Üniv., Şuhut M. Y. O.

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

.....  
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR  
Enstitü Müdürü

**BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI**  
**Afyon Kocatepe Üniversitesi**

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

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

**beyan ederim.**

**16/06/2017**

**Neşe TUNA**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BENTAZONE ve CHLORİDAZON HERBİSİTLERİNİN *Eisenia hortensis* TÜRÜ ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Neşe TUNA

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK

Bu araştırmada, Bentazone ve Chloridazone herbisitlerinin *Eisenia hortensis* türü üzerine olan genotoksik etkileri incelenmiştir. *E. hortensis* türü Afyonkarahisar ilindeki doğal yaşam alanlarından toplanmıştır. Toksikite çalışmalarında Bentazon herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 236 ppm ve Chloridazon herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 76,6 ppm olarak belirlenmiştir. *E.hortensis* sölomositlerinde DNA hasarını belirlemek için komet ve mikronükleus test yöntemleri yapılmıştır. Bentazone ve Chloridazon herbisitlerinin LD<sub>50</sub>/2, LD<sub>50</sub> ve 2XLD<sub>50</sub> konsantrasyonları, 48 saat süreyle *E. hortensis*' lere uygulanmıştır.

Sonuç olarak Chloridazone ve Bentazone herbisitlerinin *E. hortensis* sölomositleri ile yapılan çalışmalarda uygulanan konsantrasyonlarının, mikronükleus ve komet parametrelerinde istatistiksel olarak önemli artışlara sebep olduğu ve DNA hasarını arttırdığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bentazon, Chloridazon, *E.hortensis*, Genotoksosite, Alkali Komet Yöntemi

2017, ix + 42 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc Thesis

### INVESTIGATING THE GENOTOXIC AFFECTS OF BENTAZONE and CHLORİDAZON HERBICIDES ON *Eisenia hortensis*

Neşe TUNA

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics Department

**Supervisor:** Assit. Prof. Sevgi ULUKÜTÜK

In this research the genotoxic effects of Bentazone and Chloridazone herbicides on *Eisenia hortensis* species was investigated. The species of *E. hortensis* were collected from the natural habitats in Afyonkarahisar. During the toxicity studies, the LD<sub>50</sub> value of Bentazone herbicides was noted 236 ppm, while the LD<sub>50</sub> value of Chloridazon was 76.6 ppm. To determine the DNA damage on *E. hortensis* coelomocytes, comet and micronucleus test methods were used LD<sub>50/2</sub>, LD<sub>50</sub> and 2XLD<sub>50</sub> concentrations of Bentazone and Chloridazon herbicides were applied to *E. hortensis* for 48 hours.

As a result, it was determined that the concentrations of chloridazone and bentazone herbicides applied within *E.hortensis* coelomocytes studies, caused statistically significant increases in micronucleus and komet parameters and increased DNA damage.

**Key Words:** Bentazone, Chloridazon, *E.hortensis*, Genotoxicity, Comet assay

**2017, ix + 42 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel alışmaların ynlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK'e,

Araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında laboratuvar desteğini sağlayan Sayın Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye,

Tez yazımında fikir ve önerilerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Recep LİMAN'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Muhammad MUDDASSİR ALİ'ye, şöhret YÜKSEK KAYGISIZ'a, Halil TURHAN'a ve Tuba TAŐCAN'a,

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme,

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine 15.FEN.BİL.44 numaralı projemi desteklemelerinden dolayı teşekkür ederim.

Neşe TUNA

AFYONKARAHİSAR, 2017

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|  | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET .....   | i     |
| ABSTRACT .....   | ii    |
| TEŞEKKÜR .....   | iii   |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....  | iv    |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....   | vi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....  | vii   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | viii  |
| RESİMLER DİZİNİ .....  | ix    |
| 1. GİRİŞ.....  | 1     |
| 1.1 Araştırmanın Amacı .....   | 1     |
| 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....   | 2     |
| 2.1 Solucanlar İle İlgili Genel Bilgiler .....   | 2     |
| 2.1.1 <i>Eisenia hortensis</i> (Michaelson, 1890) (= <i>Dendrobaena veneta</i> ) ..... | 4     |
| 2.2 Pestisitlerin Genel Özellikleri .....  | 5     |
| 2.3 Herbisitler.....   | 6     |
| 2.3.1 Bentazon .....   | 6     |
| 2.3.2 Chloridazon.....   | 7     |
| 2.4 Genotoksisite ve Genotoksisitenin İzlenmesi .....                                  | 7     |
| 2.5 Toprak Solucanlarının Morfolojisi.....   | 10    |
| 3. MATERYAL ve METOT .....   | 15    |
| 3.1 Chloridazon .....  | 15    |
| 3.2 Bentazone .....  | 15    |
| 3.3 <i>Eisenia hortensis</i> Tür Teşhisi ve Muhafaza Etme Yöntemi.....                 | 15    |
| 3.4 Komet Yöntemi Yapım Aşamaları.....   | 17    |
| 3.5 Mikronükleus Testi Yapım Aşamaları .....   | 20    |
| 4. BULGULAR .....  | 22    |
| 4.1 Komet Değerlendirme .....  | 22    |
| 4.1.1 Chloridazon Herbisiti İçin Değerlendirme .....                                   | 22    |
| 4.1.2 Bentazone Herbisiti İçin Değerlendirme .....                                     | 23    |
| 4.2 Mikronükleus Testi Değerlendirme .....   | 24    |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.1 Chloridazon Herbisiti İçin Değerlendirme ..... | 24 |
| 4.2.2 Bentazone Herbisiti İçin Değerlendirme .....   | 25 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                           | 27 |
| 6. KAYNAKLAR.....                                    | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ.....  | 42 |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

|                   |            |
|-------------------|------------|
| dH <sub>2</sub> O | Distile su |
| μM                | Mikromolar |
| mM                | Milimolar  |
| μg                | Mikrogram  |
| μL                | Mikrolitre |
| ml                | Mililitre  |
| gr                | Gram       |

### Kısaltmalar

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| dH <sub>2</sub> O | Distile su  |
| DMSO              | Dimetilsülfoksit                                    |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                              |
| EDTA              | Etilen diamin tetra asetik asit                     |
| EMS               | Etil metan sulfonat                                 |
| EtBr              | Etidyum bromür                                      |
| HMA               | High melting agarose (Yüksek kaynama dereceli agar) |
| KKD               | Kardeş kromatid değişimi                            |
| LMA               | Low melting agarose (Düşük kaynama dereceli agar)   |
| MN                | Mikronukleus  |
| NaCl              | Sodyum klorür                                       |
| NaOH              | Sodyum hidroksit                                    |
| PBS               | Fosfat tamponu                                      |
| Tris-HCl          | Tris hidroklorik asit                               |
| UV                | Ultraviyole   |
| IARC              | Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı            |
| OECD              | Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü              |
| FAO               | Gıda ve Tarım Örgütü                                |

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

|   |   |
|---|---|
| Şekil 2.1 Bentazon herbisitinin kimyasal yapısı .....   | 6 |
| Şekil 2.2 Chloridazon herbisitinin kimyasal yapısı..... | 7 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 4.1</b> Chloridazon herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomositlerinde Komet testi ile DNA hasarının .....  | 23 |
| <b>Çizelge 4.2</b> Bentazone herbisitinin <i>E. hortensis</i> sölomositlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti .....  | 24 |
| <b>Çizelge 4.3</b> Chloridazon herbisitinin farklı konsantrasyon uygulamalarının <i>E. hortensis</i> sölomositlerinde mikronükleus ve binükleer hücre yüzdeleri ..... | 25 |
| <b>Çizelge 4.4</b> Bentazone herbisitinin farklı konsantrasyon uygulamalarının <i>E. hortensis</i> sölomositlerinde mikronükleus ve binükleer hücre yüzdeleri .....   | 25 |

## RESİMLER DİZİNİ

|   | Sayfa |
|---|-------|
| <b>Resim 2.1</b> <i>Eisenia hortensis</i> (= <i>Dendrobaena veneta</i> ) .....  | 5     |
| <b>Resim 2.2</b> <i>Dendrobaena sp.</i> dış morfoloji .....   | 10    |
| <b>Resim 3.1</b> <i>E. hortensis</i> Binoküler Stereo mikroskopta görüntüsü (Orjinal) .....                                       | 17    |
| <b>Resim 3.2</b> Havalandırmalı petri kap içerisinde Bentazon herbisiti ile muamele edilmiş<br><i>E. hortensis</i> örnekleri..... | 17    |
| <b>Resim 3.3</b> <i>E. hortensis</i> türünde ekstrüzyon buffer ile sölomosit sağımı.....  | 18    |
| <b>Resim 3.4</b> Santrifüj sonrası <i>E. hortensis</i> sölomositleri .....  | 18    |
| <b>Resim 3.5</b> Herbisit ile muamele edilen sölomosit hücrelerinin nükleus DNA'sı .....  | 20    |
| <b>Resim 3.6</b> <i>E. hortensis</i> sölomosit hücrelerinde mikronükleus.....   | 21    |

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Araştırmanın Amacı

Dünyamızda nüfus artışı ve gıda ihtiyacı paralellik göstermektedir. Gıda endüstrisinde yüksek verim yakalayabilmek için tarım çalışmalarında pestisitler sıkça kullanılmaktadır. Pestisit kullanımı, tarımsal ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararlarından koruyabilmek, kaliteli üretimi güvence altına alabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup 1940'lı yıllardan beri üretimi arttıran önemli bir bileşendir. Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir. Pestisit arzu edilmeyen hayvansal, bitkisel veya mikrobiyal organizmaların yok edilmesinde kullanılan her türlü anorganik, doğal veya sentetik organik kimyasal bileşiklere verilen genel isimdir. Pestisitlerin ideal olarak seçici özellikte olması, yani hedef organizmaya etkili, diğer organizmalara ise etkisiz olması istenir. Ancak günümüzde kullanılan pestisitlerin çok az bir kısmı bu özelliği taşımakta ve uygulama alanındaki organizmalarla birlikte, çevredeki flora ve faunayı da önemli şekilde etkilemektedir. Pestisitler; yabancı ot öldürücü (herbisit), böcek öldürücü (insektisit), küf öldürücü (fungisit), rat ve fare öldürücü (rodentisit), kene öldürücü (akarasit), bakteri öldürücü (bakterisit), kuş öldürücü (avisit), yuvarlak kurt öldürücü (nematosit) olarak da kullanılmaktadır (Harte *et al.* 1991).

Pestisitlerin bilinçsizce kullanımı, uygulamayı yapanların eksik bilgiye sahip olmalarından kaynaklanmakla birlikte canlılara ve çevremize büyük miktarda zararlar vermektedir. Pestisitlerin ekolojik dengeye verdiği zarar geçen zamanla etkisini gözler önüne sermektedir ve zirai ilaçlara karşı yapılan mücadele çalışmaları yetersiz kalmaktadır.

Afyonkarahisar tarım alanlarında bulunan *E. hortensis*'in toprak içerisinde yaşayan bir organizma olarak ortamda bulunabilecek pestisitlerden etkilenebileceği düşünülmektedir. Afyonkarahisar tarım ürünlerinden olan soğan için Bentazone ve pancar için Chloridazon herbisidi tercih edilmiştir. Çalışmanın kapsamı, Bentazone ve Chloridazon herbisitlerinin *E.hortensis* 'te Alkali Komet yöntemi ve Mikronükleus test sistemleriyle genotoksisite yönünden etkilerinin belirlenmesini içermektedir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1 Solucanlar İle İlgili Genel Bilgiler

Solucanlar ılık ve tropikal topraklarda baskın olarak bulunan toprak ekosisteminde lumbricidae ailesinde yer alan omurgasız canlılardır. En önemli toprak makroorganizmalarıdır. Solucanlar vücudundan geçen materyalleri sindirim enzimleri yardımıyla öğütülürler. Her gün kendi vücut ağırlıklarına eşit miktarda materyali vücutlarından geçirmektedirler (Lee 1985).

Genelde omurgalı hayvanlar için varlığından söz edilen immün sistem aslında omurgasız hayvanlarda da bulunmaktadır. Temel işlevi kendine yabancı olanı tanıyıp zararsız hale getirmek olan bu sistemin basit yapıları canlılardan gelişmiş organizasyonlu canlılara kadar nasıl bir gelişim izlediğinin bilinmesi önemlidir. Evrim sırasında sadece fiziksel olarak değil, savunma mekanizmaları ile de güçlü olan canlılar hayatta kalabilmiştir. Bu da patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarının evrimin basamaklarında taşındığı ve daha da geliştirildiği şeklinde yorumlanabilir. Bu noktada omurgasız immünolojisi önem kazanmaktadır. Omurgasız immünolojisinde özellikle toprak solucanları ilgi çekici canlılardır. Bu hayvanların yüksek mikrobiyal kirliliğin hakim olduğu bir ortamda 700 milyon yıldır canlılar alemindeki yerlerini koruyabildikleri düşünülürse, gerçekten etkili bir immün sisteme sahip olduklarına karar vermek hiç de zor değildir (Evans *et al.* 1973, Cho *et al.* 1998, Cooper 2002, Cooper and Roch 2003).

Toprak solucanları kendi yaşam ortamlarının kimyasal madde birikimlerini ortaya koymak ve bunların diğer canlılar üzerine olası etkilerinin belirlenmesinde indikatör (belirteç) canlılardır (OECD, 1984). *Eisenia fetida* organik madde bakımından zengin topraklarda bol bulunan ve ağır metaller için biyolojik belirteç/ayraç olarak kullanılan bir toprak solucanı türüdür (OECD 1984, Aly and Schröder 2008).

Toprakta bulunan herhangi bir ağır metal belirli bir seviyenin üzerine ulaştığında, toprak solucanının öncelikle deri ve barsağı üzerinde histopatolojik etkiye neden olur (Lukkari *et al.* 2004). Bu etkiler *Eisenia fetida* türünde patolojik olarak kendini çabuk

gösterir. Ayrıca, bu türün kolay elde edilebilir olması ekotoksikolojik çalışmalarda daha fazla kullanılır olmasını sağlamaktadır (Reddy and Rao 2008).

Toprak solucanlarına duyulan ilginin bir başka nedeni de çevresel kirleticilere karşı çoğu organizmadan daha dirençli olmalarıdır. Solucanların atık elementleri biriktirmelerine rağmen hayatta kalabildikleri gözlenmiştir (Sauve and Fournier 2003). Diğer taraftan organoklorinlerin ya da metal kalıntılarının bulunduğu ortamlardaki yetişkin solucanlarda immün sistemin baskılandığı da belirtilmektedir. Bu nedenle solucanlar çevresel kirliliğin incelenmesinde ve toksikolojik deneylerde model hayvan olarak kullanılmaktadır.

Toprak solucanı sölom sıvısı bakteriyostatik, proteolitik, sitolitik, mitojenik ve hemaglutinik aktiviteler içeren farklı biyolojik fonksiyonlar göstermektedir. Toprak solucanları ayrıca yüksek rejenerasyon kabiliyetlerini de savunma sistemlerinin önemli bir unsuru olarak kullanmaktadırlar. Bazı karsinojenlere karşı bağışıklırlar ve vücuttan, enjekte edilmiş karsinojenleri temizleyebilirler.

Annelida filumunun bir parçası olarak, *E. hortensis*, sölomik boşlukta bulunan ve patojenik mikroplara karşı bağışıklık tepkilerini gerçekleştirmek üzere işlev gören, sölomasitler olarak adlandırılan lökosit benzeri hücrelere sahiptirler (Cooper *et al.* 2003).

Amebositler serbest radikalleri antimikrobiyal özelliklerle sentezleme kapasitesine sahiptir. Annelidlerde, patojenik bir mikrop ana fagosit tarafından tanınıp sindirildiğinde, lizozomal enzimler sırasıyla hidrojen peroksit ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen ara ürünlerini (ROI'ler) ve reaktif azot ara ürünlerini (RNIs) sentezlemeye başlarlar. Bu metabolitler daha sonra oksijen ve oksijenle ilişkili ara maddeler ile reaksiyona girerek nihai olarak DNA'ya zarar veren ve enzimatik özelliklere sahip toksik türler oluşturabilir (Shery and Fuller-Espie 2015).

Toprak solucanı popülasyonlarına en büyük zararı veren etkenler ise toprağın işlenmesi, ormanların tahrip olması, böcek öldürücü ve yabancı ot öldürücü ilaçların kullanılması, doğal yaşam ortamlarının bozulmasıdır.

### **2.1.1 *Eisenia hortensis* (Michaelsen, 1890) (=Dendrobaena veneta)**

**Dış Özellikler:** Uzunluk 15-50 mm, genişlik 2-3 mm. Segment sayısı 50-120. Klitellum 27'den 33. segmente kadar. Pigmentasyon solgun renkte. Prostomium epilobik veya tanilobik-açık. Dorsal porlar 5/6 segmentler arası bölgede. Setalar aralı çift, klitellumdan sonra ab:bc:cd=5:9:5. Seta c ve d 11. segmentte, a ve b 16. segmentte, 23-26. segmentler arası bölgede ve bazı klitellum segmentlerinde yer alır. Erkek açıklıkları 15. segmentte, seta b'de ekvatoryal yarıklar halinde ve bezlerle çevrili. Dişi açıklıkları ufak, 14. segmentte seta b'nin lateralinde. Eşeyssel tüberküller tepecik şeklinde 30 ve 31. segmentlerde.

**İç Özellikler:** Septa sadece 13/14, 14/15'de kalınlaşmış veya hiç kalınlaşma yok. Tohum keseleri 3 çift (9, 11, 12. segmentlerde). İki çift spermateka ampul şeklinde ve 9/10, 10/11 segmentler arasından dışarı açılır ve dorsal çizgiye yakındır. Yumurtalıklar 13. segmentte, küçük. Kalpler 7-11'de. Taşlık 17. segmentte. Kalker bezleri 11-13. segmentlerde. Boyuna kaslar demet tipinde.

**Yayılış:** Arnavutluk, Avusturya, Bulgaristan, İngiltere, Almanya, Çek Cumhuriyeti, Finlandiya, Macaristan, İzlanda, İrlanda, Rusya (Merkezi, Güney, Kuzeybatı, Doğu), İran, Irak, Azerbaycan, İsrail, Türkiye, Ermenistan.

Palearktik bölgede, Güney ve Kuzey Amerika'da, Afrika'da ve Özellikle Avrupa'da geniş yayılış gösterir. Kosmopolittir. Dünyanın birçok bölgesine vermikompost üretimi nedeniyle yayılmıştır.



**Resim 2.1** *Eisenia hortensis* (= *Dendrobaena veneta*)

## 2.2 Pestisitlerin Genel Özellikleri

Doğada insan, bitki ya da hayvanlara zarar veren varlıkların etkilerini önleme, yok etme, azaltma ya da bu varlıkları geri püskürtme amacıyla kullanılan kimyasal madde veya madde karışımlarına “pestisit” adı verilmektedir. Kimyasal maddeler, çok etkili olmaları, gerektiği zaman kullanılabilmesi, geniş alanlara uygulanabilmesi nedeni ile bu kadar yaygın kullanılmaktadırlar. Pestisitler yalnız ileri tarım ülkelerinde değil artık tüm dünyada yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. En kolay ve en ucuz yöntem olan pestisit kullanımı tarımsal savaşta en çok tercih edilen yöntemdir. Günümüzde pestisit olarak kullanılan pek çok kimyasal madde vardır. Bu kimyasallar; yabancı otlar gibi istenmeyen bitkilere karşı kullanıldıklarında herbisit, böcekleri öldürmek amacıyla kullanıldıklarında insektisit, küf ve mantar gibi hastalık zararlıları öldürmek amacıyla kullanıldıklarında fungisit gibi isimler alırlar. İçerdikleri etken maddelere göre ise pestisitler kimyasal pestisitler ve biyo-pestisitler olarak iki grupta incelenmektedir. Bunlardan kimyasal pestisitler, hastalık ve zararlıları engellemeye ya da öldürmeye yönelik olarak sentezlenen kimyasal maddeleri içerirler.

Pestisitler genellikle belli bir organizmaya karşı kullanılmaktadır. İdeal durum, pestisitlerin yalnızca hedef alınan organizmayı zehirleyip diğerlerine zarar vermemesidir. Seçiciliği yüksek maddeler, belli bir derişimde istenmeyen canlıyı öldürürken diğer organizmaları fazla etkilememekle birlikte tam bir seçicilik mümkün değildir. Özellikle geniş spektrumlu pestisitler yalnız zararlıya yani hastalık etmeni olan organizmalara değil, aynı zamanda hedef dışındaki canlılara da zarar vermektedir. Dünyanın birçok tarım bölgesindeki yeraltı ve yüzey sularında pestisitlerin tespit edilmesinden dolayı, pestisit kullanımının çevresel boyutu günümüzde tartışılan önemli bir konudur (Hermosin *et al.* 2001).

## 2.3 Herbisitler

### 2.3.1 Bentazon

**Eş anlamlıları :** 3-Isopropyl-d7-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide

**Formül :** C<sub>10</sub>D<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

**Molekül ağırlığı :** 247,32 g/mol

**CAS-No. :** 131842-77-8

**Form:** çözelti, sıvı

**Renk:** sarımsı

**Koku:** zayıf kendine özgü

**pH değeri:** 7,5 – 9 (seyreltilmemiş madde ile ölçülmüş)

**Kristalizasyon sıcaklığı:** -11 °C

**Toksikolojik etkileri hakkında bilgi**

**Akut toksisite**

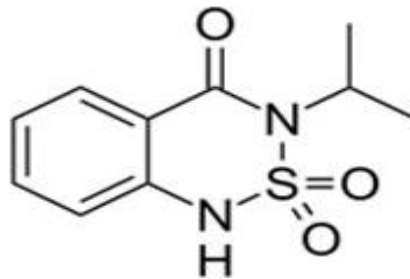
LD50 Oral - sıçan - 1.100 mg/kg

LC50 Solunması halinde - sıçan - 4 h - 5.100 mg/m<sup>3</sup>

LD50 Dermal - sıçan - 2.500 mg/kg

**Kansere neden olabilirlik**

IARC: % 0.1 ya da daha büyük oranda bulunan bu ürünün hiçbir içeriği IARC tarafından muhtemel, olası veya onaylanmış kanserojen olarak tanımlanmamıştır.



**Şekil 2.1** Bentazon herbisitinin kimyasal yapısı

### 2.3.2 Chloridazon

**Eş anlamlıları :** Pyrazon

**Formül :** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O

**Molekül ağırlığı :** 221,64 g/mol

**Toksikolojik etkileri hakkında bilgi**

**Akut toksisite**

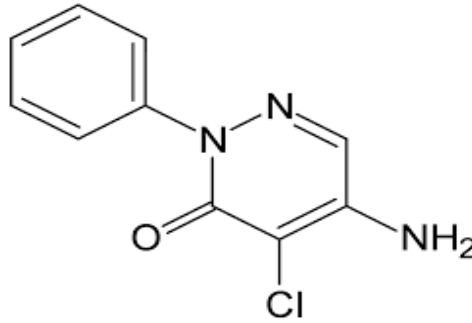
LD50 Oral - sıçan - 647 mg/kg

LC50 Solunum - sıçan - 4 h - > 30.800 mg/m<sup>3</sup>

LD50 Dermal - tavşan - 2.500 mg/kg

**Kansere neden olabilirlik**

IARC: % 0.1 ya da daha büyük oranda bulunan bu ürünün hiçbir içeriği IARC tarafından muhtemel,olası veya onaylanmış kanserojen olarak tanımlanmamıştır.



**Şekil 2.2** Chloridazon herbisitinin kimyasal yapısı

### 2.4 Genotoksisite ve Genotoksisitenin İzlenmesi

Genotoksisite, hücrenin genetik materyal bütünlüğünü etkileyen zarar verici bir etkiyi tanımlamaktadır. Genotoksik etmenler hücre DNA'sında hasara veya genetik mutasyonlara neden olan mutajenik veya kanserojenik olarak bilinmektedir. Bazı kimyasallar ve belirli tip radyasyonlar genotoksik özellikli olan etkenlerdir. Çevresel kirleticilerin bir kısmı organizmaların genomu seviyesinde tahribatlar yaparak genom bütünlüğüne zarar vermektedirler. Çevresel kimyasalların hücre yapısı veya fonksiyonunda hasar oluşturan (sitotoksik), normal kromozom davranışlarını bozan (sitogenetik) ve DNA molekülünde genetik bilginin değişmesi anlamında mutasyonlara neden olan hasarların oluşması (mutajenik) gibi sonuçların izlenmesinde ve

araştırılmasında bitkiler ve balıkların da içinde bulunduğu pek çok farklı organizma kullanılabilir.

Genotoksik ajanların canlılar üzerinde oluşturdukları etkilerin belirlenmesinde kromozomal değişimler, gen mutasyonları ve DNA hasarları gibi parametreler kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak genotoksisite çalışmalarında sıklıkla Mikronükleus testi, Ames testi, Kardeş kromatid değişimi ve günümüzde önemi giderek artmakta olan Komet tekniği gibi testler kullanılmaktadır.

Alkali komet yöntemi daha ucuz olması ve kısa sürede güvenilir sonuçlar alınabilmesi nedeniyle sitogenetik analizlere alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. İlk olarak 1978'de Rydberg ve Johanson tarafından tanımlanan yöntemi, Singh ve arkadaşları 1988'de modifiye ederek alkali komet yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntem temel olarak çalışılacak dokudan izole edilen DNA'nın elektroforezi prensibine dayanmaktadır. DNA'nın pozitif kutba hareketi kuyruklu yıldız benzeyen bir şekle ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ethidium bromid ile boyandıktan sonra DNA'daki hasar floresan mikroskobu ile incelenmektedir. Kuyruk uzunluğu, DNA hasarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Singh *et al.* 1988, Sasaki *et al.* 2000).

Mikronükleus (MN), hücre sitoplazması içinde ana nükleusların yanında, nükleus ile aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel bir yapıdır. Mikronükleuslar boyanma özellikleri açısından nükleusa benzemekle birlikte; büyüklük açısından değişiklik gösterebilmektedirler. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nükleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşmaktadır. Bu nedenle MN, kromozomal fragment veya tam bir kromozom içerebilmektedir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Canlılar yaşam süreleri boyunca farklı biyotik ve abiyotik stres etmenleriyle karşılaşmaya kalmaktadırlar. Organizmaları bu stres etmenlerinden korumak ve kurtarmak amacıyla çeşitli kimyasallar ve özellikle pestisitler, kullanım kolaylıkları ve etkilerinin kısa sürede ortaya çıkması gibi nedenlerden dolayı sıklıkla tercih

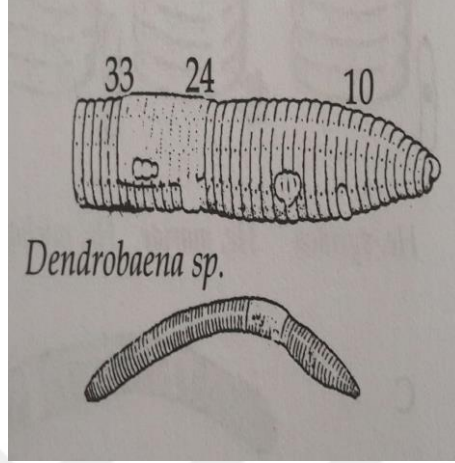
edilmektedir. Artan bu pestisit kullanımına bağı olarak hem hedef organizma hem de hedef olmayan farklı canlılar üzerinde fizyolojik, biyokimyasal, morfolojik ve moleküler olarak tespit edilebilen farklı toksik etkiler oluşabilmektedir (Gichner *et al.* 2009). DNA hasarı ve varsa hasar derecesinin belirlenmesi genotoksik etkilerin ortaya konması açısından önemlidir. Son yıllarda, genotoksik etkilerin ortaya çıkarılmasında “komet tekniğı” veya “tek tip hücre jel elektroforezi” adında giderek daha fazla ilgi ve kabul gören yeni bir moleküler test sistemi geliştirilmiştir. Günümüzde comet tekniğinin, yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda uygulamaları vardır (Martin *et al.* 1993).

Geleneksel sitogenetik yöntemlerden birisi de Fenech ve Marleyn tarafından 1985 yılında tanımlanan MN yöntemidir. MN, hücre sitoplazması içinde ana nükleusların yanında, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliğı gösteren küçük küresel bir yapıdır. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nükleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşmaktadır. Bu nedenle MN, kromozomal fragment veya tüm bir kromozom içerebilmektedir. MN yönteminde preparatların hazırlanması ve sonuçların değerlendirilmesi, CA ve SCE yöntemlerine göre daha hızlı ve kolaydır. Bu yöntemde kültürde birkez bölünme geçirmiş olan hücrelerde sitokalsin kullanılarak sitokinez bloke edilmektedir. Hazırlanan preparatlarda binukleat hücrelerde MN frekansı saptanmaktadır (Kirsch-Volders 1997, Albertini *et al.* 2000).

Comet tekniğinin temel amacı, genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, tek tek hücrelerin nükleuslarını inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen nükleus içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine sabitlenir ve elektroforetik ortamda yürütülmektedir. Genotoksik ajanların etkisiyle DNA’da tek veya çift zincir kırıkları oluşabilir ve buna bağı olarak ortaya çıkan farklı ağırlık ve elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Elektroforez sonunda etidyum bromür gibi DNA’ya özgü boyalar kullanılır ve hasarın derecesine göre dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar değışen derecelerde ortaya çıkan DNA görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir. Elde edilen görüntülerin “kuyruklu yıldız” şekline benzemesi nedeniyle bu yöntem

İngilizce’de bu anlama gelen “komet” adı verilmiştir.

## 2.5 Toprak Solucanlarının Morfolojisi



**Resim 2.2** *Dendrobaena sp.* dış morfoloji

Baş, solucan dinlenme halindeyken ağzı kapatan bir kapak görevi görmektedir. Duyusal organ ve dokunaç bulunmayan baş farklı tiplerde olabilir. Posterior olarak peristomiumla devam ediyorsa zigolobik, peristomiumla arasında basit bir ayrım varsa prolobik, posterior kısmında dil şeklinde küçük bir çıkıntı içeriyorsa epilobik, eğer dil şeklindeki bu uzantı ilk sırt oyuğuna kadar uzanıyor ve peristomiumu sırt kısmında ikiye bölünüyorsa tanilobik adını almaktadır.

Başı, birçok segmentten oluşmuş gövde izlemektedir. Vücudun son segmenti anal segment ya da kuyruk adını almaktadır. Anal segment orta hat üzerinde genellikle kısa, dikey yarıklar şeklinde anüsü taşımaktadır. Yeni segmentler anal segmentten meydana gelmektedir. Buna göre en eski segment başın arkasındaki, en yeni segmentte anal segmentten önceki segmenttir.

Kıllar doğrudan doğruya deri çukurlarından çıkarlar. İlk ve son segment dışında her gövde segmentinde, çiftler oluşturacak şekilde 4 demet kıl bulunur “ (Oligochaeta; Yun:oligo=az, chaeta=kıl). Bu kıllar (setalar), “S” şeklinde kıvrık, kitinden oluşmuş iğneler ya da bükülmez dikenler şeklindedir. Boyları türden türe, aynı türün üyeleri

arasında ve hatta aynı bireyde, ön ya da arka bölgede bulunuşuna göre değişmektedir. Dip kısımları, deriden oluşmuş seta folikülü denen bir kesenin içinde bulunur. Bu kesenin içinde, setaları salgılayan belirli sayıda büyük yapılı seta hücresi bulunmaktadır. Keseye bağlı kasların işleviyle bu keseler herhangi bir yöne hareket ettirilebilir, daha derinlere çekilebilir ya da yüzeye doğru itilebilir. Böylece setalar hareket sırasında çapa gibi segmentlerin tutunmasına hizmet etmektedir.

Bazı segmentlerdeki karın seta çiftleri üreme işine hizmet etmek üzere değişikliğe uğramıştır ve bunlar teker teker ya da çiftler halinde küçük, bezsi yapıda bezler üzerinde taşınmaktadır. Mikroskop altında boyuna oluklar şeklinde görülen bu setaların kavuşma sırasında eşini uyarmak ve tutmak işlevini yaptıkları sanılmaktadır.

Toprak solucanlarının tipik dış görünüşlerine ait diğer bir özellik de, genellikle eşeyssel olgunlaşma sırasında, eşeyssel açıklıklar civarındaki bir ya da daha fazla segmentte, epidermin çok bezli ve şişkin durum almasıdır. Vücudu halka ya da semer gibi saran bu şişkin kısma klitellum denir. Kavuşmaya ve kokon kılıflarının oluşumuna hizmet eden bu bölgede bulunan farklı yapıdaki bez hücreleri proteince zengin bir sıvı salgılamaktadır. Bu sıvı galari yapımında ve kavuşma sırasında bireylerin yapışmasında kullanılır. Klitellumdaki segmentlerarası boğumlar ve kıllar ya belirsiz bir şekil alırlar ya da tamamen kaybolurlar.

Toprak solucanları başlıca besinleri ot, yaprak vs. gibi çürümüş bitkisel (organik) maddelerdir. Galeri açma sırasında topraktaki organik besinlerden de yararlanırlar. Toprak solucanları, toprağın humus kısmını yerler, besinleri doğrudan doğruya ağızlarıyla almaktadırlar. Bu materyallerin bir kısmını sindirir ve soğururlar. Fakat büyük bir kısmı vücuttan dışarı atmaktadırlar.

Dışarı atılan bu materyalin önemli bir miktarını toprak yüzeyi üzerine taşımaktadırlar. Bunları toprak yüzeyine küçük kümeler halinde bırakırlar. Bu taşınım, toprak çevrimi için çok önemlidir.

Dolaşım sistemleri kapalıdır. Kan, damarlar içinde yer alır ve kan ile vücut dokuları

arasındaki tüm değişimler damar çeperinden yapılmaktadır. Boyuna uzanan bir sırt damarı, bir karın damarı ve bağırsak damarı bulunmaktadır. Sırt ve karın damarlarını birleştiren halka damarlar yalnız ön kısımlarındaki segmentlerde bulunmaktadır. Bu damarların eşeyssel segmentlere rastlayan 5 tanesi kasılıgandır ve toprak solucanlarında kalp görevi görmektedir.

Toprak solucanlarının organize solunum sistemleri yoktur. Deri solunumu görölmektedir. Derileri gaz değişimine adapte olacak şekilde ince ve nemlidir. Kılcal damarlardaki kan, hücre duvarının nemli kütikulasında oksijen almakta, CO<sub>2</sub> vermektedir.

Boşaltım organları, nefridyumlardır ve vücudun hemen hemen bütün segmentlerinde tekrarlanır. Nefridyumlar su ve tuz için düzenleyici bir rol oynarken, diğer yandan sölom sıvısının su içeriğini düzenleme işine de hizmet etmektedirler. Boşaltım ürünleri amonyak, üre ve kreatindir. Bunlar vücut ve bağırsak duvarı ile kan ve sölom sıvısında oluşmaktadır.

Sinir sistemi ip merdiveni şeklindedir. Başın sırt tarafında iki loblu bir beyin (serebral gangliyon, yutaküstü gangliyonu) taşımaktadır. Epidermiste birçok duyu organları vardır ve bunlar özel destekleyici hücrelerle çevrili duyu hücresi grupları şeklindedir. Her bir duyu hücresi kıl gibi, kütikulada üzerindeki porlardan dışarı çıkan uca sahiptir ve bir duyu sinir ipliği bunu hücre tabanına bağlamaktadır. Sinir lifleri muhtemelen gerçek ışık reseptörleridir ve duyu sinirlerini bağlar. Işık reseptörleri üzerindeki uyarılar toprak solucanının gün ışığını ve karanlığı ayırdetmesini sağlamaktadır.

Zoocoğrafik önemleri, dünyanın oluşumundan günümüze kadar hayvan gruplarının yeryüzündeki dağılışları inceleyen Zoocoğrafya bilimi açısından da toprak solucanları önemli bir gruptur. Pangea varken ortaya çıkmış ve günümüze kadar yapısı çok az değişmiş gruplardan biri olan toprak solucanlarının her kıtada, yalıtılmış bölgeler halinde olsa da kozmopolit bir yayılış göstermesi bu devirdeki fauna ve flora birliğinin kanıtı kabul edilmektedir. Toprak solucanları toprak içinde ve taşların altında yaşadıkları için mutasyon oluşturan etkilerden büyük ölçüde korunmuş canlılardır.

Toprak solucanları ekolojileri, humuslu, bol nemli ve su süzme yeteneği fazla

topraklarda oldukça bol bulunurlarken, asidik, kumlu ya da kurak topraklarda az bulunmaktadırlar. Galerileri üst kısımda hemen hemen dikeydir, aşağıya doğru dallanırlar. Bazıları 2 m ya da daha derinlere kadar uzanabilir. Karada yaşayabilmek için organel olarak pek az değişikliğe uğramışlardır. Vücudun ıslak kalması için her segmentin arasındaki sırt açıklığından çıkan mukus ve sölom sıvılarıyla vücut nemlendirilmesi sağlanmaktadır. Bu salgılar aynı zamanda bakteriyel işlevlerin de önlenmesini sağlamaktadır. İçgüdüsel davranışlar ile de bu kuruma önlenir (su bulma, neme kaçma gibi). Çok zayıf ışık dışında tüm ışıklardan kaçmaktadırlar. Bu nedenle gün boyu gizlenmektedirler ve kırmızı ışığı tolere edebilmektedirler. Havadaki ses titreşimlerini duyamazlar, ancak topraktaki mekanik titreşimlere duyarlıdırlar. Bunun dışında havada hoş olmayan, rahatsız edici kimyasal buharlar galerilerine geri kaçmalarına neden olmaktadır.

Bunun yanında toprak solucanı yoğunluk ve biyokütelleri toprak tekstürüne ve toprak parametrelerine bağlı olarak değişmektedir. Yüksek kil ve düşük silt içeren topraklarda daha yüksek bolluğa sahip oldukları bildirilmiştir. Ayrıca toprak solucanı yoğunluğunun kum içeriğiyle negatif, organik madde ve elde edilebilir K ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Diğer yandan, tarım ve toprağın işlenmesi toprak solucanı yoğunluğunu azaltıcı etkiye sahiptir.

Karayollarının yakınlarında görülen trafik yoğunluğu ve egzoz gazları nedeniyle yoğunluk ve biyokütle göreceli olarak azalmaktadır.

Toprak solucanları, OECD ve FAO gibi bazı uluslar arası kuruluşlar tarafından, kimyasal maddelerin çevresel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla seçilen indikatör organizmalardan biridir. Ayrıca, yaygın ve iyi bilinen toprak solucanı *Lumbiricus terrestris* son yıllarda önemli bir kirlilik biyomonitörü olarak kabul edilmektedir. Özellikle, kirlenici maddelerin, kuşlara ve diğer kara omurgalılarına taşınmasındaki rolleri nedeniyle dikkatleri üzerlerine çekmişlerdir.

Toprak solucanları, metabolizmalarının N içeren ürünlerini, ölü dokulardaki protein, atık maddeler (ürin), vücut yüzeyini yağlamak ve hareketi kolaylaştırmak için epidermal bezlerden salgılanan mukoprotein şeklinde toprağa geri döndürerek topraktaki azot

çevriminde önemli rol oynamaktadırlar.

Düşmanları, toprak solucanı popülasyonlarına en büyük zarar, ormanların tahrip olması, toprağın işlenmesi, böcek öldürücü ilaçların kullanımı, şehirleşme amacıyla doğal biyotopların bozulması gibi nedenlerle insanlar tarafından verilmektedir. Çeşitli mantar öldürücü, bitki öldürücü ve böcek öldürücü ile yapılan laboratuvar deneylerinde tüm bu maddelerin düşük oranlarda, topraksolucanlarında büyümeyi yavaşlattığı ve eşeyssel olgunluğa ulaşmayı geciktirdiği, yüksek dozlarda ise ölümlerine neden oldukları görülmüştür. Yine bazı biyositlerin kokon ve yumurtadan çıkan genç birey sayısında azalmaya neden oldukları bilinmektedir.



### **3. MATERYAL ve METOT**

Bu tez çalışmasında zirai mücadelede kullanılan Bentazone ve Chloridazone herbisitlerinin solucanlardaki genotoksik etkisini incelemek üzere *E. hortensis* deney materyali olarak seçilmiştir.

#### **3.1 Chloridazon**

Bu tez çalışmasında kullanılan ve sıvı formülasyonda litrede 520 g Chloridazon içeren Pyramin Super pestisiti ticari olarak temin edilmiştir. *E. hortensis* için literatür araştırmaları doğrultusunda dozlar belirlenerek havalandırmalı petri kabı içerisinde örneklere 48 saat süreyle pestisit ile muamele etmesi sağlanmıştır.

#### **3.2 Bentazone**

Çalışmada kullanılan sıvı formülasyonu litrede 480 g Bentazon içeren Basagran pestisiti ticari olarak temin edilmiştir. Temin edilen pestisit literatür bilgileriyle ölümcül olmayan farklı dozlar belirlenmiş ve belirlenmiş olan dozlar örneklere havalandırmalı petri kabı içerisinde 48 saat süreyle uygulanmıştır.

#### **3.3 *Eisenia hortensis* Tür Teşhisi ve Muhafaza Etme Yöntemi**

Bu tez çalışmasında kullanılan Bentazon ve Chloridazon herbisitlerinin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla model organizma olarak solucan (*E. hortensis*) kullanılmıştır.

Tür teşhisleri daha çok eşeyssel organları gelişmiş ve klitelluma sahip ergin bireyler üzerinde yapılmıştır.

Sistematik teşhislerinde en çok kullanılan özellikler prostomium tipleri, klitellum ve eşeyssel tüberkülün bulunduğu segment aralığı ve sayısı, seta düzeni ve pigmentasyon varlığı ya da yokluğu ile belirlenmiştir.

*Dendrobaena veneta*, vücudun tamamında setalar bulunmaktadır. Setalar arasındaki

uzaklıkların gerçekleri şu şekildedir:  $ab > cd$ ,  $aa = bc = 2 ab$  ve  $dd > 5.5 ab$  (Valovirta and Terhivuo 1976).

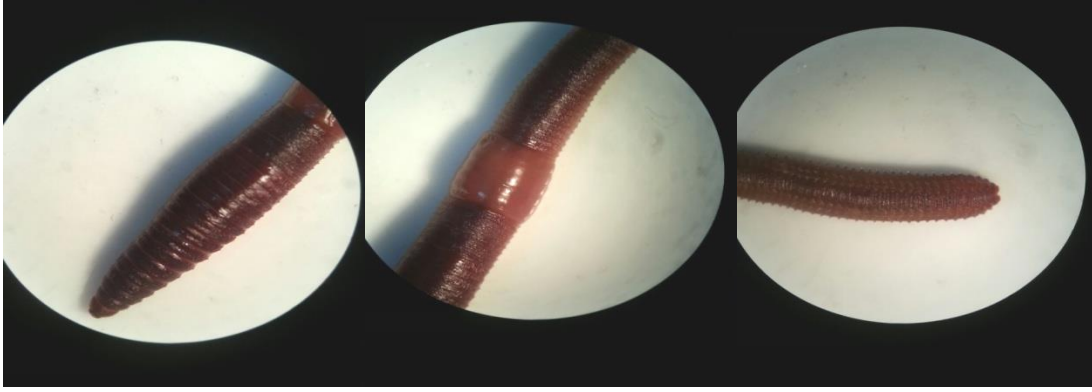
Eyer şeklindeki klitorel bölümler 26, 27, 28-32, 33 ve 30 ve 31'de iki çift olarak bulunan tüberküla pubertatis üzerinde veya 30-31'de bir çift oval, az ya da çok saydam bantlar halinde kademeli olmaktadır 29 ve 32'de kaybolmaktadır. Vücut uzunluğu 25-50 mm ve segment sayısı 40-130, genellikle 95-105 (Valovirta and Terhivuo 1976).

Genotoksik çalışmalarda kullanılan solucanın sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

|             |                |
|-------------|----------------|
| Alem:       | ANIMALIA       |
| Üst şube:   | LOPHOTROCHOZOA |
| Şube:       | ANNELIDA       |
| Altşube:    | CLITELLATA     |
| Sınıf:      | OLIGOCHAETA    |
| Takım:      | HAPLOTAXIDA    |
| Altakım:    | LUMBRICINA     |
| Üstfamilya: | LUMBRICOIDEA   |
| Familya:    | LUMBIRICIDAE   |

Toprak solucanlarının saklanması % 4'lük formaldehid ya da % 70-80'lik alkol kullanılmıştır. Fakat formaldehid içinde uzun süre saklanmaları toprak solucanlarını sert ve gevrek hale getirmiştir ve bu durumdaki örneklerin diseksiyonu zorlaşmıştır.

Eğer toprak solucanları uzun sürecek taksonomik çalışmalar için saklanacaksa şöyle bir yol izlenebilir: Örnekler önce % 5-10'luk alkolde bayıltılır ve kasılmaları duruncaya kadar bu şekilde yaklaşık 15 dakika bekletilir. Bu uygulamayla toprak solucanlarının, daha sonraki çalışmaları için düz durmaları sağlanır. Daha sonra % 4'lük formaldehide alınarak 1 ya da 2 gün bekletilir ve son olarak % 70-80'lik alkolde saklanır.



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

### 3.4 Komet Yöntemi Yapım Aşamaları

- 1- Tür tayini yapılmış toprak solucanları 5 adet havalandırılmalı petri kap içerisine 8'erli gruplar halinde konulmuştur. Literatür araştırması doğrultusunda dozlar belirlenmiştir ve belirlenmiş dozların toprak solucanları ile 48 saat maruz kalması sağlanmıştır. 48 saat sonunda toprak solucanlarının baş kısmına tahta çubuk ile 5 kez dokunulmuş canlılık kontrolü yapılmıştır. Sonuçlar Probit Analiz yöntemiyle değerlendirilmiş ve letal doz belirlenmiştir.
- 2- Havalandırılmalı petri kap içerisinde 48 saat süreyle  $LD_{50/2}$ ,  $LD_{50}$  ve  $2XLD_{50}$  dozlarındaki herbisit ile muamele edilmiş toprak solucanı örnekleri petri kap içerisinden alınıp ependorf tüpüne konulmuştur.



**Resim 3.2** Havalandırılmalı petri kap içerisinde Bentazon herbisiti ile muamele edilmiş *E. hortensis* örnekleri

- 3- Çalışması yapılacak örnekler ependorf tüpüne konulmuş ve üzerine 1 ml ekstrüzyon (sağım) buffer eklenerek 10 dk boyunca sölomositlerin sağımı gerçekleştirilmiş ve sölomositlerin tampon çözeltiye çıkması beklenmiştir.



**Resim 3.3** *E. hortensis* türünde ekstrüzyon buffer ile sölomosit sağımı

- 4- Solucan için ekstrüzyon tampon: (1 litre için pH:12)

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| NaCl .....                 | 4.161 gr |
| EDTA.....                  | 1.091 gr |
| Guaiacolgliseroleter ..... | 9.09 gr  |
| dH <sub>2</sub> O.....     | 950 ml   |
| Etanol.....                | 50 ml    |

- 5- Süre sonunda ependorf tüp içerisindeki solucanlar çıkartılarak ve sölomositler 1400 rpm 4 dk santrifüj edilmiştir.



**Resim 3.4** Santrifüj sonrası *E. hortensis* sölomositleri

6- Alkali komet yönteminde kullanılacak tüm mikroskop lamaları 50 °C hazırlanmış % 1'lik NMA ile kalpalarak düz bir yüzey üzerinde ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

PBS (50 ml için 1x stok): NaCl.....4 gr  
KCl.....0.1gr  
KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>.....0.1gr  
Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>.....0.1gr  
TrisHCl.....1.6 gr

NOT:Çalışmada 10x lik kullanılmıştır.

NMA (% 1'lik): 0.03 g NMA+3 ml 10x PBS

LMA (% 0.8'lik): 0.016 g LMA + 2 ml 10x PBS

7- 37 °C % 0,8'lik LMA hazırlanmıştır. Mikropipet yardımı ile 100 µL LMA ve 5 µL (10<sup>6</sup> hücre) izole sölomasit süspansiyonun ependorf tüp içerisinde karışımı sağlanmıştır.

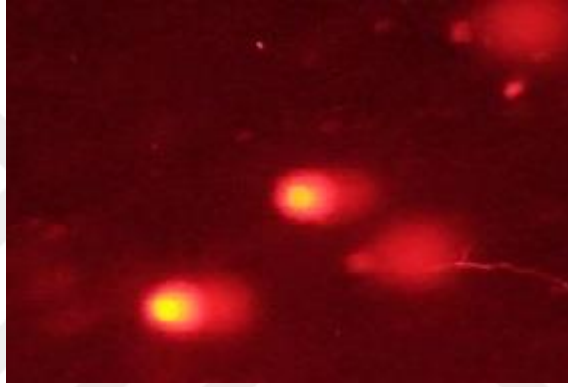
8- Bu karışım lam üzerinde mevcut olan NMA katmanı üzerine damlatıldıktan sonra yayılmıştır. Preparatlar yayma işleminden sonra lamel ile kapatılmış buz kasetlerinin üzerine konularak katılaşmaları sağlanmıştır.

9- 2-3 dk buz kasetlerinin üzerinde duran preparatlardan katılaşmış olan jele zarar vermeden lamel yavaşça çekilmiştir.

10- Lizis solüsyonu (100 ml, pH:10): 2.5 M NaCl.....14.7 gr  
100 mM Trisma Base.....0.12 gr  
100 mM EDTA.....3.72 gr

Elektroforez için tampon çözelti (pH>13, 500ml): 100 mM NaOH.....6 gr  
1 mM Na<sub>2</sub> EDTA.....0.18 gr

- 11- Preparatlar lizis solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir ve ardından yatay jel elektroforez tankında 20 dk hazırlık evresi olarak bekletilmiştir. Hazırlık evresi bitiminde 20 dk elektroforeze tabi tutulmuştur.
- 12- Elektroforez sonrası, lamalar üç kez distile su ile nötralize edildikten sonra 70 µL EtBr (Etidyum Bromür) ile boyanmıştır.
- 13- Nükleus DNA'sı UV ışık kaynağı ile desteklenmiş olan floresan mikroskop altında incelenmiştir.

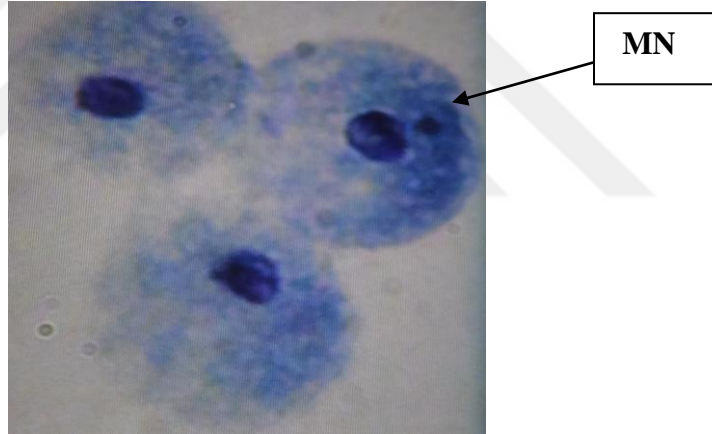


**Resim 3.5** Herbisit ile muamele edilen sölomosit hücrelerinin nükleus DNA'sı

### **3.5 Mikronükleus Testi Yapım Aşamaları**

- 1- Örneklerden alınmış olan izole sölomositlere 1 ml % 0,4 molar KCl eklenip izole sölomosit hücrelerinin şişmesi için 5 dk beklenmiştir.
- 2- Fiksatif I : 50 ml fiksatif 2+50 ml % 0.09 NaCl
- 3- Fiksatif II : 40 ml glacial asit+200 ml metanol
- 4- Süre bitiminde 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj bitiminde ependorf tüpteki süpernatant kısım dökülmüştür ve pellet kısım homojen hale getirilmiştir.
- 5- Fiksatif I ve Fiksatif II çözeltileri hazırlanmıştır.

- 6- Örneklerin yayılacağı lamellar 30-45 dk öncesinden şaleye dizilmiştir ve üzeri Nitroz asit ile doldurulmuştur lamalar Nitroz asitten alınıp içerisinde distile su bulunan şaleye yerleştirilmiştir.
- 7- Distile sudan çıkarılan lam üzerine örnekler mikropipet ile yayılmış 24 saat kurumaları beklenmiştir.
- 8- Kurumuş preparatlar 12 dk Giemsa boyası ile muamele edilmiştir.
- 9- 12 dk sonunda lameller üç seri sudan geçirilmiştir ve Entellan ile kapatılmıştır.
- 10- Işık mikroskopunda incelenmiştir.



**Resim 3.6** *E. hortensis* sölomosit hücrelerinde mikronükleus

## 4. BULGULAR

Bu araştırmada, kullanılan toprak solucanları Afyonkarahisar tarım alanlarından toplanmıştır. Tür teşhisi sonunda *E. hortensis* olarak belirlenmiş olanlar üzerinde çalışmalar yrtlmştır. Deneyi yapılacak toprak solucanları 5 adet plastik petriye 8'erli gruplar halinde konulmuş belirlenen Bentazone ve Chloridazon konsantrasyonlarında 48 saat bekletilmiştir. 48 saat sonunda toprak solucanlarının her birinin baş kısmına tahta çubuk ile 5 kez dokunulmuş canlılık kontrolü yapılmıştır. Canlılık kontrol sonuçlarına göre Probit analiz yöntemiyle LD<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Probit analizi sonucunda Bentazone herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 236 ppm ve Chloridazon herbisitinin LD<sub>50</sub> değeri 76,6 ppm olarak belirlenmiştir.

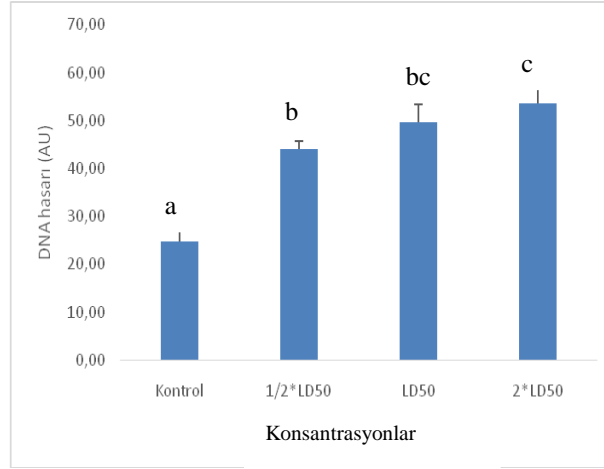
### 4.1 Komet Değerlendirme

#### 4.1.1 Chloridazon Herbisiti İçin Değerlendirme

Çalışmamızda, Chloridazon herbisiti için belirlenmiş olan LD<sub>50</sub> dozu 76.6 ppm olup komet testinde 38.3 ppm, 76.6 ppm ve 153.2 ppm konsantrasyonlarının 48 saatlik uygulamaları çalışılmıştır.

48 saatlik uygulamada DNA hasar skorları kontrol grubunda 24,67±4,73 olarak, 38.3 ppm'lik konsantrasyonda 44.00±1.73 ppm olarak, 76.6 ppm'lik konsantrasyonda 49.67±3.79 ve 153.2 ppm'lik konsantrasyonda 53.67±6.66 olarak bulunmuştur (izelge 4.1).Konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki artış istatistiksel açıdan önemli grlmştir ( p<0,05).

**Çizelge 4.1** Chloridazon herbisitinin *E. hortensis* sölomositlerinde Komet testi ile DNA hasarının



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

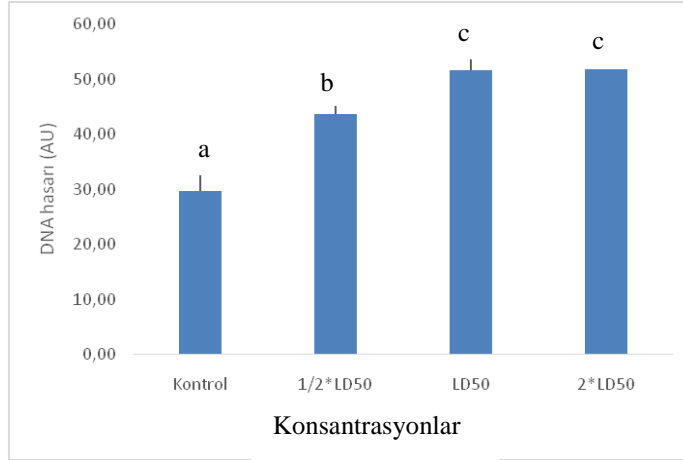
#### 4.1.2 Bentazone Herbisiti İçin Değerlendirme

Bentazone herbisiti için belirlenmiş olan LD50 değeri 236 ppm olup komet testinde 118 ppm, 236 ppm ve 472 ppm konsantrasyonları 48 saat uygulanarak çalışılmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır.

48 saatlik uygulamada DNA hasar skorları kontrol grubunda  $29.67 \pm 4.50$  olarak, 118 ppm'de  $43.67 \pm 2.51$  olarak, 236ppm'de  $51.67 \pm 3.05$  ve 472 ppm'de de  $55.33 \pm 1.52$  olarak bulunmuştur ( Çizelge 4.2)

Konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki artış istatistiksel açıdan önemli görülmüştür (  $p < 0,05$ ).

**Çizelge 4.2** Bentazone herbisitinin *E. hortensis* sölomositlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti



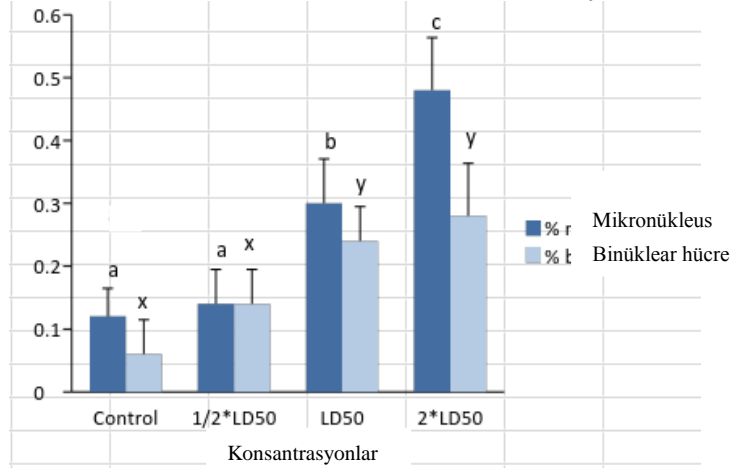
\* Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli.

## 4.2 Mikronükleus Testi Değerlendirme

### 4.2.1 Chloridazon Herbisiti İçin Değerlendirme

Mironükleus testi çalışmasında, Chloridazon herbisitinde kontrole göre tüm herbisit konsantrasyonlarında artma belirlenmiştir. Buna karşılık kontrol ve 38.8 ppm konsantrasyonları arasındaki fark önemsizken 76.6 ppm ve 153.2 ppm'deki artma önemli düzeydedir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3** Chloridazon herbisitinin farklı konsantrasyon uygulamalarının *E. hortensis* sölomositlerinde mikronükleus ve binüklear hücre yüzdeleri

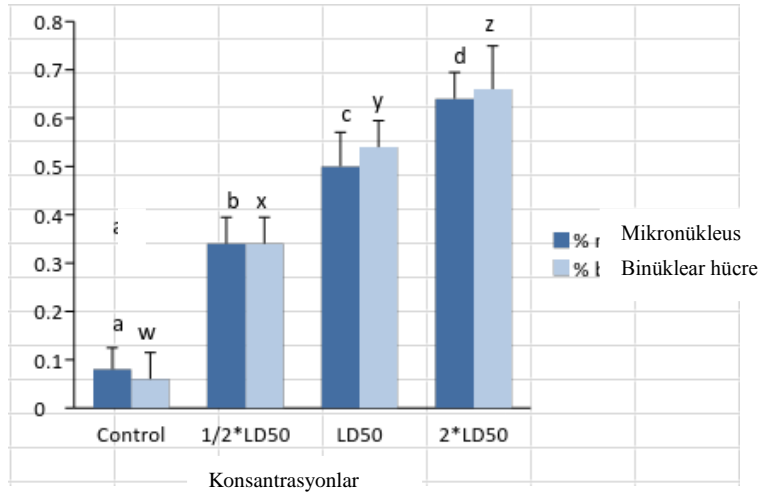


\*Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli.

#### 4.2.2 Bentazone Herbisiti İçin Değerlendirme

Mikronükleus test çalışmasında Bentazone herbisitinde kontrole göre tüm herbisit konsantrasyonlarında (118 ppm, 236ppm, 472 ppm) önemli düzeyde artış görülmüştür (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4** Bentazone herbisitinin farklı konsantrasyon uygulamalarının *E. hortensis* sölomositlerinde mikronükleus ve binüklear hücre yüzdeleri



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

Sonuç olarak Chloridazon ve Bentazone herbisitlerinin *E. hortensis* sölomositlerine yapılan çalışmalarda uygulanan konsantrasyonların çekirdek bölünme oranlarını düşürüp, mikronükleus frekanslarında ve komet parametrelerinde istatistiksel olarak önemli artışa sebep olduğu ve DNA hasarını arttırdığı belirlenmiştir.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Afyonkarahisar tarım alanlarında yetiştirilen pancar ve soğan tarım ürünlerinin üretilmesi esnasında Choridazon ve Bentazone herbisiteri yaygın olarak kullanılmaktadır. Solucanlar faydalı model organizmalardır ve farklı türleri toprak kirliliğini izlemek için kullanılır (Ciğerci 2016). Solucanlarda Bentazone ve Chloridazon herbisitlerinin genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle Bentazon ve Choridozone herbisitlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, *E. hortensis* sölomositeri üzerindeki genotoksisite Komet ve Mikronükleus testi ile belirlenmiştir.

Toprağın doğal yapısı içerisinde canlı organizmalar önemli bir yere sahiptir. Toprak verimliliği açısından büyük öneme sahip olan toprak organizmalarının dünyası, yani edafon, toprak florası ve toprak faunasından oluşmaktadır. Toprak florası yani bitkisel canlılar etkinlik yönünden birinci sırada yer almaktadır. Bu grup içerisinde; bakteriler, mantarlar, aktinomisetler ve algler yer almaktadır. Toprak faunası, yani toprak hayvanları içerisinde; protozoalar, nematodlar, toprak solucanları ve diğer hayvanlar yer almaktadır. Toprakların üretkenliği açısından bunların her birinin farklı yararları bulunmaktadır (Karaçal 2008).

Toprak solucanları, çevresel kirliliğin kontrolünde indikator organizma olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, besin siklusunun düzenlenmesinde anahtar organizmalardır. Toprak ekosistemlerindeki bir başka önemi, organik maddenin bağlanması ve ayrıştırılmasının devamını sağlamaktır. Toprağın organik maddesi ise toprak mikroflorasına enerji kaynağı olmasının yanında toprak yapısının oluşumunu da desteklemektedir. Toksik bileşiklerin çevre kirliliğine yol açması, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizin de en önemli problemleri arasında yer almaktadır. Ekolojik olarak, tarım alanlarında gübre ve pestisitlerin kullanımıyla bozulan çevre kirliliğinden dolayı özellikle hedef olmayan canlı türlerinin zarar görmesi söz konusu olmaktadır (Aydın 2006).

Toprak solucanları, toprak ekosistemlerinde toprağın fiziksel özelliklerini düzeltmek, azotlaşmayı (nitratlaşma) gerçekleştirmek, humus oluşumuna yardımcı olmak, organik maddelerin ayrıştırılması ve bağlanması yanında kazdıkları tüneller yardımıyla toprağın havalandırılmasını sağlamak yoluyla özellikle kullanılan ve önemli rol oynayan canlılardır. Toprak solucanları fonksiyonları aracılığıyla mikrobiyal aktiviteyi doğrudan etkilemekte ve toprakta bulunan mikroorganizmalar da azot, karbon ve diğer minerallerin döngüsüne yardımcı olmak suretiyle birlikte ekolojik sistemlerin işleyişine önemli oranda katkı sağlamaktadırlar. Ekotoksikolojik açıdan toprak solucanlarının bir başka önemi, omurgalı hayvanlarda besin kaynağı olmaları nedeniyle kirliliği bu hayvanlara, dolayısıyla besin zincirindeki tüm canlılara taşımaları sebebiyledir (Aydın 2006).

Toprak solucanları kirleticileri başlıca deri ve mide-barsak kanalı olmak üzere iki yolla alır. Toprak özelliklerine bağlı durumlarla ilgili olarak çözünebilir nitelikteki kirleticiler mide-barsak kanalı yoluyla toprak solucanlarında birikime neden olur. Lukkari ve ark. yaptıkları çalışmada metallerin (Cu ve Zn gibi) karbonat ve diğer çözünebilir kısımlarındaki iyonlara bağlanarak toprak solucanlarının sindirim materyallerinde ve dışkılarında bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Epigeik türler yüzeye yakın; endojeik türler daha altta, mineral toprak katmanında ve anesik türler ise daha derin toprak katmanında yaşarlar. Epigeik türler genellikle yüzeydeki bitki artıklarıyla beslendiklerinden; kirleticiler endojeik türlerde epigeik türlere göre daha yoğun düzeyde bulunur. Bu nedenle, topraktaki kirliliğin bu canlılara göre değerlendirilmesinde ekolojik kategorilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Bentazone tiyadiazin grubunun üyesidir. Bir çift aromatik halka yapısından oluşan nitrojen ve sülfür atomları içeren bir heterosiklik halkadır. 1975 yılında tescil edilmiştir ve birçok geniş yapraklı yabancı ot ve sedgesi başta olmak üzere seçici bir çıkış sonrası herbisit olarak kullanılmaktadır. Temas eylemiyle WHO / IPCS ve DPR tarafından oluşturulan genotoksisite verilerine göre Bentazone, hem in vitro hem de in vivo sistemlerdeki gen mutasyonları, kromozom etkileri ve birincil DNA hasarı ve onarımı

için çeşitli testlerde olumsuz bir yanıt göstermiştir. Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde nokta mutasyonu (HGPRT lokusu) ve düşük maruziyete sahip CHO hücrelerinde bazı klastojenik potansiyel endikasyonlar için sadece zayıf olumlu bir yanıt bildirilmiştir (Kaya 2004).

Bentazon ve dikamba karışımının hematolojik etkileri, erkek ve dişi sıçanlarda hemoglobin, hematokrit ve eritrosit indekslerinde dozla ilişkili düşüşleri içermektedir. Zayıf anemi erkeklerde dişilerden daha belirgindir (Brkić *et al.* 2011).

Sıçanlarda, bentazone ve dikamba karışımının düşük subakut ve subkronik toksisiteye neden olduğunu ortaya koymuştur. Erkek sıçanların karışım toksisitesine karşı dişi sıçanlara kıyasla daha hassas oldukları bulunmuştur. Bentazonun içeriği olarak predominate etkilerinin dikamba içeriğinden 3.5 kat fazla olması beklenirken, bu bu çalışmada ispatlanmamıştır. Bir karışımın etkileri, çoğu durumda, tek tek maddelerin etkilerinden farklıdır. Albümin, A/G oranı ve sodyum seviyesi durumunda, Bentazonun baskın olduğu belirlenmiştir, dikamba etkileri ALT, AST ve ALP enzimleri aktivitesi ve fosfat serum seviyesinde hüküm sürmüştür. Karışım, basit IA veya basit benzer olmayan eylem kavramına uygun hareket etmiştir (Brkić *et al.* 2015).

Araştırmada, zamana bağlı bentazon konsantrasyon artışı altınbalığı embriyolarına karşı gelişme anormalliklerinin artmasını sağlamıştır. (Kimmel *et al.* 1995). En hassas embriyotoksikolojik son nokta ve baş çevresinde kanamanın yol açtığı kan dolaşımı bozulduğu (EFSA 2015) tarafından rapor edildiği gibi kanın pıhtılaşma süresinin uzamasına ve hematokrit ve hemoglobin içeriğinin azalmasına neden olmuştur. Başka bir hassas son nokta belirgin yolk kesesi rezorpsiyonu ile birlikte belirgin ödemler görülmüştür. Sıklıkla bu iki anormallik FAO / WHO (2012) ve Tu ve arkadaşları tarafından belirtildiği gibi, rahatsız edici embriyolarda birlikte görünür (2013). Bunların oluşumu, metabolik bozuklukları gösterir. Embriyo, sarısında depolanan enerjinin normal kullanımını engelleyen ve perikardiyal boşlukta anormal bir sıvı birikmesine neden olmuştur (Miyares *et al.* 2014, Tu *et al.* 2013). Basagran® ayrıca larvalarda yüzme aktivitesini düşürmüş ve denge kaybına neden olmuştur. Bentazonun, altınbalığı yavrularında neden olduğu benzer bir davranış kaydedilmiştir (Saglio *et al.* 2001).

Literatürdeki kısa bir rapordan chloridazon herbisitinin, interkalasyon modu vasıtasıyla DNA ile etkileşime girebilmektedir, bu nedenle bu çalışmada chloridazonun DNA'ya UV/vis, floresan, termal denatürasyon, siklik voltmetre, katodik ve anodik diferansiyel puls voltametriyumuyla etkileşimi ve iki kat ONIOM yöntemi tamamen incelenmiştir. Chloridazon'un DNA'ya bağlanması, bir dizi elektrokimyasal davranış ve spektrum özelliklerinde değişiklikler meydana getirmiştir. DNA'ya bağlandıktan sonra, DNA'nın adsorpsiyon spektrumu, renk koyultan kayma ile bir hiperkromik etki göstermiştir ve DNA-EB'nin floresan emisyonu etkili bir şekilde söndürülmüştür. Bu araştırmalar, spektroskopi teknikleriyle birleştirilmiş CDPV ve ADPV'nin, DNA'ya bağlanan chloridazonun bağlanma modu ve etkileşim mekanizmasını karakterize etmek için uygun bir yol sağlayabileceğini göstermiştir. Ek olarak hangi baz çiftlerinin chloridazon ile etkileşime girme eğiliminde olduklarını saptamak için, AT veya CG baz çiftleri arasındaki etkileşim enerjilerini hesaplamak için ab initio mekanik kuantum kullanılarak tutarlı bir teorik araştırmalar seti sunulmuştur. Sonuçlar, bu etkileşimin görüldüğünü ortaya koymuştur. Chloridazon'un temel sekansa bağlanmış olduğu ve DNA'da GC baz dizisi yoluyla daha fazla etkileşime girdiğini göstermiştir (Ahmadi 2011).

*Unio sp.* için, Fluoranten, Benzo (a) piren, Benzo (b) floranten, Benzo (k) floranten ve Benzo (g, h) içindeki Chloridazon ve Oksazepamın DNA hasarı ve konsantrasyonları arasında anlamlı korelasyonlar tespit edilmiştir. 1. sediman içinde asılı parçacık halindeki madde ve benzo (b) floranten, 2378-TCDD (Tetraklorodibenzo-p-dioksin) ve 12378-PeCDD (1,2,3,7,8 Pentaklorodibenzo-p-dioksin) konsantrasyonlarındaki verilen *S. woodiana* için, DNA hasarı seviyesi, yalnızca konsantrasyon ile anlamlı derecede korelasyon göstermiştir ( $R = 0.58$ ,  $N = 15$ ) (Kolarević 2015).

Kızılkaya (2005), farklı organik atıklar kullandığı çalışmasında toprağa ilave ettiği Zn dozlarının (0, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mg kg<sup>-1</sup>) toprak solucanı dokularında Zn akümülyasyon miktarı ve toprak solucanı dışısındaki Zn miktarı üzerine etkisini araştırdığı çalışma sonucunda; organik atıklar uygulandıktan 21 gün sonra toprak solucanı dokusu ve dışısındaki en yüksek Zn miktarını belirlemiştir. Zn ilave edilen topraklarda toprak solucanı doku ve dışısında uygulama yapılmamış topraklardan önemli derecede daha yüksek Zn miktarı saptandığı, en yüksek Zn miktarının tüm Zn

dozlarında, yüksek C/N oranına sahip organik atıklarla (saman ve fındık zurufu) uygulama yapılmış topraklardaki toprak solucanlarında olduğunu belirlemiştir.

Azizi vd. (2013) tarafından, arıtma çamurlarındaki ağır metal gideriminde *Lumbricus rubellus* kullanılan araştırma sonucunda, *Lumbricus rubellus*, arıtma çamuru ve mantar kompostu içeren varyantlarda, uygulamadan 10 hafta sonra arıtma çamurunda bulunan ağır metallere Cr, Cd ve Pb ilk miktarlarından % 90-98.7 daha düşük değerlere ulaşıldığı belirlenir iken, Cu ve Zn'nun ilk miktarlarından daha yüksek değerde olduğu ortaya konmuştur.

Suthar *et al.* (2014) tarafından, inek gübresi ile *E. fetida* kullanılarak kağıt fabrikasının atıksu arıtma çamurundan ağır metal gideriminin araştırıldığı çalışmada, inek gübresi (100/100), arıtma çamuru: inek gübresi (1: 3), arıtma çamuru: inek gübresi (1: 2), arıtma çamuru: inek gübresi (1: 2), arıtma çamuru: inek gübresi (1: 1), arıtma çamuru: inek gübresi (100 /100 ), arıtma çamuru: inek gübresi (3: 1), arıtma çamuru: inek gübresi (2: 1) varyantları hazırlanarak 60 gün süresince kimyasal parametrelerdeki değişikliklerin araştırıldığı çalışma sonucunda; Cd (% 32-37), Cr (% 47.3-80.9), Cu (% 68.8-88.4) ve Pb(%9 5.3-97.5) miktarlarında azalma, toplam-N, alınabilir P ve K seviyelerinde önemli derecede artış meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, en iyi giderimin sağlandığı atık karışım oranı olarak, arıtma çamuru: inek gübresi (2: 1 ve/veya 3: 1) olarak belirlenmiş olup, toprak solucanlarının dokularındaki metallere birikimlerinin; mgkg-1 kuru biyokütlede Pb (8.81-9.69), Cd (2.31-2.71), Cr (20.7-35.9) ve Cu (9.94-11.6 ) olduğu belirlenmiştir.

Li *et al.* (2010), tarafından domuz gübresi ile beslenen *E. fetida* türü toprak solucanlarında Cu, Zn, Pb ve Cd un biyoakümülyasyonları ve bu elementlerin domuz gübresindeki biyoyararlanılabilirliğinin araştırıldığı çalışmada, *E. fetida* biyoakümülyasyon faktörleri; Cd ( $2749 \pm 0.441$ ), Zn ( $0.594 \pm 0,200$  ), Pb ( $0.274 \pm 0.101$ ) ve Cu (  $0.076 \pm 0.030$ ) olarak belirlenmiştir. Ayrıca Cu, değiştirilebilir Fe-Mn bağlı oksitlerin fraksiyonlarının konsantrasyonları ile açıklanırken, *E. fetida* nın Pb ve Cd konsantrasyonlarındaki değişiklikler, değiştirilebilir fraksiyonların konsantrasyonu ile açıklanmıştır. *E. fetida*'daki Zn'nun konsantrasyonunun, değiştirilebilir. Fe-Mn bağlı

oksitler ve bağı karbonatların konsantrasyonuna bağı olduğu, doğrusal olmayan regresyon analizi domuz gübresinin değiştirilebilir metal konsantrasyonu ve BAF arasında pozitif logaritmik ilişki olduğu sonucuna varılmıştır.

Solucanlarda, sölomositler, dolaşımdaki lökositlerdir ve bağışık savunmada önemli rol oynamaktadır. Sölomasitler ağır metallerin etkisini incelemek için kullanılmıştır. Metalik genotoksikantlar, örneğin nikel (Ni) ve kadmiyum (Cd) (Reinecke and Reinecke 2004).

*E. hortensis* solucanlarındaki sapmalar CoCl<sub>2</sub>, DNA hasarına, sitokinez yetmezliğine ve kromozomal hasara neden olmuştur. En düşük CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonları bile, solucan sölomositlerinde hem DNA hem de kromozom hasarına neden olmuştur. Dolayısıyla, Komet testi ve Mikronükleus testi kombine uygulaması, karasal ekosistemlerde çevresel kirleticiler tarafından bu omurgasız hayvanlarda ortaya çıkan genotoksik etkilerin gösterilmesini ifade etmiştir (Ciğerci 2015).

Sheryl L. Fuller-Espie (2010), dış ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye (8.4 - 67.6 mM) in vitro maruz kalma sonucu *E. hortensis*'in sölomositlerinde bir apoptotik hücre ölümünü destekleyen verilere ulaşılmıştır.

İdeal bir pestisit "sadece hedef organizmayı etkileyen, kalıcı ve çevresel toksisiteden yoksun kimyasal maddeler" olarak tanımlanmaktadır. Oysa ki, günümüzde pestisitler, toprak, su ve hava yoluyla hedef dışı organizmalara doğrudan veya kalıntıları ile ulaşarak önemli derecede toksikolojik risk oluşturmaktadırlar.

Pestisitler, doğal çevreye verdikleri zarar ile ekosistem dengesinin bozulmasına yol açarak dünyanın en önemli problemlerinden biri durumuna gelmiştir. Bunun nedeni, ilaçların bilinçsizce kullanımları ve henüz ilaçlama tekniklerinde istenilen düzeye ulaşılamamış olmaktan kaynaklanmaktadır. İlaçlamada atılan ilacın % 0,015- % 6.0'sı hedef canlıya ulaşarak etkin sonuç alınmakta, geriye kalan % 94- 99,9'luk kısım hedef olmayan kitleye ulaşarak ekotoksikolojik açıdan risk oluşturduğu kaydedilmektedir.

Herbisitler, genelde akut toksisitelerine oranla kronik toksisiteleri önemli bileşiklerdir (Anonymous 1987). Herbisitler içinde olduğu gibi, tüm pestisitler içinde de ülkemizde en yoğun tüketilen etkili maddelerden biri 2,4-D'dir. Bu etkili maddenin sentezlenme aşamasında dioksinlerle bulaşabilme tehlikesi vardır. Bilindiği gibi dioksinler hem çok zehirli ve hem de kanser yapıcılık riski olan bileşiklerdir (Blair 2002). Bu sorun nedeniyle bir çok ülke, örneğin ABD, ülkelerinde tüketilecek 2,4-D'li preparatların dioksinlerden arındırılmış olma koşulunu getirmişlerdir (Ware 1994). Ancak Türkiye'de böyle bir koşul yoktur. Yapılan bir çalışmadan elde edilen sonuçlar, ülkemizde tüketilen 2,4-D'li preparatlarda dioksin kirlenmesi olabileceği kuşkusunu akla getirmektedir (Alpöz vd. 2001).

Pestisitlerin gerek çevre, gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan getirebilecekleri olumsuzluklar gelişmiş ülkelerde gayet iyi bilinmektedir. Bunun için, başta AB olmak üzere, tüm gelişmiş ülkelerde tüketilecek tarım ürünleri çevre ve sağlık açısından sürekli denetlenmektedir. Bu denetimlerde sivil toplum örgütlerinin de payının ve baskısının olması konuyu daha da ciddi hale sokmuştur. Bunun için de, örneğin AB Ülkeleri Perakendecileri Tarım Ürünleri Çalışma Grubu, İyi Tarım Uygulamaları Protokolü (EUREPGAP)'nü 1 Ocak 2004'te yürürlüğe koymuşlardır. Bu protokol ile AB perakendecileri, raflarına koydukları ürünlerin müşterilerine zararlı olmayacağına dair garanti ve güvence vermektedirler. EUREPGAP Sertifikası, yabancı perakendecilerin üreticinin ürünü satın alması açısından bir garantidir (Anonymous 2004).

Komet tekniği, düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, fazla donanım gerektirmemesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre ve doku grupları ile çalışılabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilmesi ve değerlendirilmesi, güvenli ve ekonomik olması nedeniyle biyomonitöring çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Komet tekniği ile DNA hasarının tespitinde gözle değerlendirme yapılabilmeyle birlikte, comet görüntü analiz programlarını kullanmak suretiyle kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi ile ilgili parametreler belirlenebilir (Collins 2003). Komet görüntü analiz programları kullanılarak kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi veya sonuçların

gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre konsantrasyon-yanıt ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir.

Birçok karsinojen ve mutajen madde DNA hasarına yol açar, ya da DNA'nın düzgün olarak eşlenmesini önler. DNA hasarlarının genotoksik sonuçları DNA eşlenmesi gerçekleşinceye kadar ve hücre döngüsü tamamlanıncaya kadar görülmez. Genotoksik madde etkisini göstermeden önce hasarların tamirini sağlamak üzere işleyen çeşitli biyokimyasal basamaklar vardır.

Mikronükleuslar ya asentrik kromozom fragmentlerinin ya da anafaz sonrasında ana nükleus içinde yer alamayan tüm kromozomun kondensasyonu sonucu oluşur. Başka bir ifade ile doğrudan DNA'da ya da iğ ipliğinde meydana gelen hasar ile hücre bölünmesi sonunda ana nükleusa dahil olmayan kırık kromozom fragmentlerinden ya da tüm kromozomun kromatin haline dönüşmesi ile oluşur. Bir hücrede görülen mikronükleus o hücredeki sayısal veya yapısal bir genetik hasarı işaret eder.

Mikronükleus Testi, genotoksisite testinde ve birkaç nükleer anomaliyi tespit etmek için insan biyolojik izleminde iyi bilinen bir testtir. Sölomositlerde Mikronükleus ve Binükleer frekanslarını, kromozomal bozuklukları ve sitokinez inhibisyonunu gösterir. Hem Mikronükleus Testi hem de Komet Testi, DNA hasarının biyolojik belirteçleri olarak önerildi. Komet Testi, solucanlar gibi çeşitli organizmalardaki DNA hasarını ölçmek için hassas bir araç olarak kullanılmıştır. Genotoksisite değerlendirmesi için Tek hücre jel elektroforezi düşük düzeyde DNA hasarını bile tespit etmeyi sağlar (Zhan 2012).

Sonuç olarak, Afyonkarahisar tarım alanlarında soğan ekimi çıkış sonrası, bitkilerin 1-3 yapraklı döneminde ve yabancı otların erken çıkış sonrası dönemlerinde Bentazon herbisiti, pancar ekiminin öncesinde ve sonrasında Chloridazon herbisiti yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *E. hortensis* sölomosit hücreleri üzerine genotoksik etki yaparak mikronükleus test frekanslarında ve komet parametrelerinde istatistiksel olarak önemli artışlara neden olduğu ve DNA hasarını arttırdığı tespit edilmiştir. Bentazone ve Chloridazon herbisitlerinin kullanımı deneyimli kişiler tarafından uygun dozlarda yapılmalı ve genotoksik etkileri diğer test sistemleri ile araştırılmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adamowicz, A. and Wojtaszek, J. (2001). Morphology and Phagocytotic Activity of Coelomocytes in *Dendrobaena Venata* (LUMBRICIDAE) Department of Animal Physiology, Zoological Institute, University of Wroclaw, Cybulskiego, **30**: 50-205.
- Ahmadi, F., Jamali, N., Jahangard-Yekta, S., Jafari, S., Nouri, S., Najafi, F. and Rahimi-Nasrabadi, M. (2011). The experimental and theoretical QM/MM study of interaction of chloridazon herbicide with ds-DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1011**: 1004-1012.
- Akan, T. (2012). Organofosforlu Pestisitlerin Arpa Bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) ve Zebra Balığı (*Danio rerio*) Üzerindeki *in vitro* Genotoksik Etkilerinin Komet Testi İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aksakal, S. (2014). Gümüş ve Kobalt Nanopartiküllerinin İyonik Formlarının Genotoksik Potansiyellerinin Komet Yöntemi İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Alpöz, A.R., Tosun, N., Eronat, C. (2001). Effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid dimethyl amine salt on dental hard tissue formation in rats. *Environment International*, **26** (3): 137-142.
- Aly, M.A.S., Schröder, P. (2008). Effect of Herbicides on Glutathione S-transferases in the Earthworm. *Eisenia fetida*. *Env Sci Pollut Res*, **15** (2) 143–149
- Arslan, E.Ö. (2005). Çeşitli Solucan Türlerinde Vücut Sıvısının Antibakteriyel ve Hemoliz Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Aydın, H. (2001). Tarım Alanlarında Kullanılan Herbisit Grubu İlaçların Kalıntılarının Toprakta ve Oligochaeta Sınıfı Toprak Solucanlarında Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Aydın, H. (2006). Toprak solucanlarının Çevre Toksikolojisi Yönünden Değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **32**: 75-79.
- Aydilek, S. (2005). Toprak Solucanlarından Elde Edilen Sölm Sıvılarının Çeşitli Hücreler Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Aymak, C. (2010). Mersin Bölgesinde Yaşayan Rana Ridibunda Pallas, 1771 (RANIDAE, AMPHIBIA)'nın Mikronükleus Test Yöntemi İle Genotoksik Etkilerinin ve Ağır Metal Kirliliğinin Tespit Edilmesi. Doktora Tezi, Mersin Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
- Azizi, A.B., Lim, M.P.M. and Abdullah, N. (2013). Vermiremoval of heavy metal in sewage sludge by utilising *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **90**: 13-20.
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D. and Brun, J.J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, **64**: 161–182.
- Brkic, D., Szakonyne-Pasics, I., Gasic, S., Teodorovic, I., Raskovic, B., Brkic, N. and Neskovic, N. (2015). Subacute and subchronic toxicity of Avalonregd mixture (bentazone+dicamba) to rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 1-30.

- Çavas, T. (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chemical Toxicology*, **49** (6) 1431–1435.
- Ciğerci, İ., Ali, M.M., Yüksek, Ş., Liman, R. (2015). Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, **755**: 754-757.
- Collins, A., Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S. Burlinson, B. and Clay, P. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, **18** (1): 45-51.
- Cooper, E.L., Roch, P. (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology. *Pedobiologia*, **47** (5–6) 676-688).
- Delen, N., Durmuşoğlu, E. and Güncan, A. (2005). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre, 629-648.
- Deveci, A. (2012). Bazı Pestisitlerin Soya (*Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Dindar, E. (2008). Arıtma Çamuru Verilen Tarım Topraklarında Solucan Aktivitesinin Azot Formlarına ve Toprak Enzim Aktivitelerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Durmuşoğlu, E. Tiryaki, O., Canhilal, R. (2010). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı **2**: 589-607.

- Evans, A.C. (1947). A Method for studying the burrowing activities of earthworms. *Annals and Magazine of Natural History*, **11**: 643–650.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C. (1991). Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards. University of California Press.
- Hermosin, M.C., Carrizosa, M.J. and Koskinen, W.C. (2001). Dicamba adsorption–desorption on organoclays. *Applied Clay Science*, **18** (5-6): 223-231.
- Karaca, İ., Ay, R., Karaca, G. (2003). Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri. *Hasad*, **2**: 86-89.
- Kaya, B., Marcos, R., Yanikoğlu, A. and Creus, A. (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, **55**: 53-62.
- Kızılaslan, N., Yaşa, Ö. (2011). Türkiye’deki Tarımsal Mücadele Üretim Tüketim Ve Dış Ticaretinin Avrupa Birliği Uyum Sürecinde Gelişim Seyri, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 103-116.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D. and Wakata, A. (2000). Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**: 167–172.
- Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a Validation of The Micronucleus Test. *Mutation Research*, **392**: 1-4.
- Kolarević, S. (2015). Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of the Total Environment*, No of Pages 9.

- Köşker, Y. (2005). Toprakaltı Zararlılarına Karşı Kullanılan Farklı Gruplardan İnsektisitlerin Toprak Faunasına Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Lee, K.E. (1985). Earthworms, Their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, 411 s. Sydney.
- Li, M., Hu, C.W., Cui, Y.B. and Li, D. S. (2010). Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, **42** (4): 586-591.
- Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P. and Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **288** (1): 47–63.
- Massicotte, R., Robidoux, P.Y., Sauvé, S., Flipo, D., Fournier, M. and Trottier, B. (2003). Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *Journal of Environmental Monitoring*, **5**: 774-779.
- Mısırlıoğlu, M. (2011). Topraksolucanarı Biyolojieri, Ekolojieri ve Türkiye Türleri. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Oliveira, M.M.J. (2016). Basagran® induces developmental malformations and changes the bacterial community of zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, **5**: 1-12.
- Reddy, N.C. and Rao, J.V. (2008). Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **71** (2) : 574-582.

- Reinecke, S. A. and Reinecke, A.J. (2004). The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. *Environmental Contamination and Toxicology*, **46** (2): 208–215.
- Sasaki, Y.F., Agurell, E., Burlinson, B., Hartmann, A., Miyamae, Y. and Kobayashi, H. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, (35) 3: 206–221
- Shery, L. and Fuller-Espie. (2015). Nitric oxide production in celomocytes of the earthworm *Eisenia hortensis* following bacterial challenge. *Science Department, Cabrini College*, **12**: 46-65.
- Sheryl, L. and Fuller-Espie. (2010). The effect of oxidative stress on phagocytosis and apoptosis in the earthworm *Eisenia hortensis*. *Science Department, Cabrini College*, **7**: 89-106.
- Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A Simple Technique for Quantitation for Low Levels of DNA Damage in Individual Cell. *Experimental Cell Research*, **175**: 184-191.
- Tacıroğlu, B., Kara E.E., Sak, T. (2016). Toprakta Ağır Metal Giderimin de Solucanların Kullanımı. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilim Dergisi*, **19** (2): 201-207.
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, **26** (2): 154-169.
- Turgak, Ö. (2011). Bazı Bor Bileşiklerinin Toprak Solucanlarında Doku ve Enzim Aktivitesi Üzerine Olası Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yeşilbaş, S. (2010). Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Soğan (*Allium cepa* L.) Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi.

Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F., Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, **75** (7): 934-938.

Valovirta, I. and Terhivuo, J. (1976). *Dendrobaena veneta* (Rosa) ssp. *hortensis* (Michaelsen, 1890) (Oligochaeta, Lumbricidae) found in Finland. *Annales Zoologici Fennici*, Vol. 13, No. 1, pp. 81-83.

Yüksek, Ş. (2011). *Nigella sativa* Sulu Ekstresinin Oksitatif DNA Hasarına Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

Zhan, Yan. (2012). Effects of silver nanoparticles on bacteria and earthworms. Lincoln University,

Wakabayashi, K. and Böger, P. (2004). Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): Amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides, *Weed Biology and Management*.

### **İnternet Kaynakları**

1. [http://www.agro.basf.com.tr/agroportal/tr/media/migrated/product\\_files/msds/Basagran\\_TR\\_MSDS.pdf](http://www.agro.basf.com.tr/agroportal/tr/media/migrated/product_files/msds/Basagran_TR_MSDS.pdf) 26.10.2015

2. [http://www.agro.basf.com.tr/agroportal/tr/media/migrated/product\\_files/msds/Pyramin\\_Super\\_AU.pdf](http://www.agro.basf.com.tr/agroportal/tr/media/migrated/product_files/msds/Pyramin_Super_AU.pdf) 26.10.2015

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neşe TUNA  
Doğum Yeri ve Tarihi : EDİRNE 21/05/1990  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) : 541 482 95 25 / tunanese22@gmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : BEYKENT ANADOLU LİSESİ, 2008  
Lisans : AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ, 2013  
Yüksek Lisans :

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Yayımları (SCI ve diğer) :

Diğer konular