



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

ACETAMIPRID'İN (NEONİKOTİNOİD İNSEKTİSİT)
Xenopus laevis (ANURA; PIPIDAE) EMBRİYO VE
LARVALARI ÜZERİNDEKİ TERATOJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlknur DÜLGER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 07/02/2018

Bornova-İZMİR

2018

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ACETAMIPRID'İN (NEONİKOTİNOİD İNSEKTİSİT)
***Xenopus laevis* (ANURA; PIPIDAE) EMBRİYO VE**
LARVALARI ÜZERİNDEKİ TERATOJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlknur DÜLGER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 07/02/2018

Bornova-İZMİR

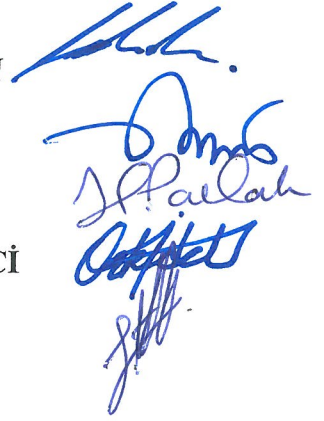
2018

İlknur DÜLGER tarafından **Doktora Tezi** olarak sunulan “**Acetamiprid’in (Neonikotinoid İnektisit) *Xenopus laevis* (Anura; Pipidae) Embriyo ve Larvaları Üzerindeki Teratojenik Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **07.02.2018** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN
Raportör Üye : Prof. Dr. Dinçer AYAZ
Üye : Prof. Dr. Hatice PARLAK
Üye : Yrd. Doç. Dr. Orkide MİNARECİ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Fatma KOÇBAŞ

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Acetamiprid’in (Neonikotinoid İnektisit) *Xenopus laevis* (Anura; Pipidae) Embriyo ve Larvaları Üzerindeki Teratojenik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07/02/2018

İmzası



İlknur DÜLGER

ÖZET**ACETAMIPRID'İN (NEONİKOTİNOİD İNSEKTİSİT) *Xenopus laevis*
(ANURA; PIPIDAE) EMBRİYO VE LARVALARI ÜZERİNDEKİ
TERATOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DÜLGER, İlknur

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN
Şubat 2018, 75 sayfa

Bu çalışmada neonikotinoid bir insektisit olan Acetamiprid'in *Xenopus laevis* türünün embriyo ve larvaları üzerindeki toksik ve teratojenik etkileri araştırılmıştır. Uygun laboratuvar koşullarında FETAX test prosedüründen yararlanılarak gerçekleştirilen akut toksisite testleri sonunda Acetamiprid'in *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerindeki LC10, LC50, LC90 ve TI değerleri belirlenmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen kronik toksisite testleriyle maddenin uzun süreli etkileri de tesbit edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 20 (SPSS Inc., USA) istatistik programı aracılığıyla Probit Regresyon Analizi, One Way ANOVA varyans analizi ve Kruskal Wallis analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

96 saatlik akut testlerin sonuçlarına göre Acetamiprid'in *X. laevis* embriyo ve larvaları için toksik ve teratojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Akut toksisite testlerinde kullanılan larvalarda büyümede gerileme ve çeşitli malformasyonlar gözlenmiştir. Gerçekleştirilen kronik toksisite testlerinin sonucunda ise Acetamiprid'in düşük konsantrasyonlarının *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerinde muhtemel bir hormetik etkiye yol açarak büyümeyi indüklediği ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: FETAX, *Xenopus laevis*, Acetamiprid, teratojenik etki, akut toksisite, kronik toksisite, hormetik etki.

ABSTRACT**TERATOGENIC EFFECTS OF ACETAMIPRID (NEONICOTINOID
INSECTICIDE) ON THE EMBRYOS AND LARVAE OF *Xenopus laevis*
(ANURA; PIPIDAE)**

DÜLGER, İlknur

PhD thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN

February 2018, 75 pages

In this study, the toxic and teratogenic effects of Acetamiprid, a neonicotinoid insecticide, on embryos and larvae of *Xenopus laevis* were investigated. LC10, LC50, LC90 and TI values of Acetamiprid on *X. laevis* embryos and larvae were determined by acute toxicity tests using FETAX test procedure under appropriate laboratory conditions. In addition, long-term effects of the substance were also detected by chronic toxicity tests.

Statistical assessment of the obtained data was performed using Probit Regression Analysis, One Way ANOVA variance analysis and Kruskal Wallis analysis via SPSS 20 (SPSS Inc., USA) statistical program.

According to the results of the 96 hours of acute tests, Acetamiprid was found to have toxic and teratogenic effects for *X. laevis* embryos and larvae. Decrease in growth and various malformations were observed in larvae used in acute toxicity tests. As a result of the chronic toxicity tests, it was shown that low concentrations of Acetamiprid affect growth positively by causing a possible hormetic effect on *X. laevis* embryos and larvae.

Keywords: FETAX, *Xenopus laevis*, Acetamiprid, teratogenic effect, acute toxicity, chronic toxicity, hormetic effect.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve birikimiyle bana destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ferah SAYIM ÖZKAN'a, değerli fikirleriyle her zaman yol gösteren Tez İzleme Komitesi hocalarım Prof. Dr. Hatice PARLAK ve Prof. Dr. Dinçer AYZAZ'a,

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde kullanılan deney hayvanlarının temininde ve çalışma süresince danışmak istediğim her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen Malatya İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Murat ÖZMEN ve Doç Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye, çalışmanın istatistiksel analizlerinde yardımcı olan Doç. Dr. Kerim ÇİÇEK'e,

Bu teze "2013 Fen 053" numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan "Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü"ne ve Fen Fakültesi Dekanlığı'na,

Bu uzun süreçte yanımda olarak beni motive eden arkadaşlarıma ve maddi manevi her anlamda beni sürekli destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisitler ve Toksikite Testleri	8
1.2. FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) Testi	16
1.3. Acetamiprid (Neonikotinoid insektisit)	17
2. MATERYAL VE METOT	20
2.1. Materyal	20
2.1.1. <i>Xenopus laevis</i> Türünün Genel ve Biyolojik Özellikleri	20
2.1.2. Laboratuvar Şartları	22
2.1.3. Denemelerde Kullanılan Solüsyonlar	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	23
2.1.5. Embriyo Eldesi.....	24
2.2. Metot.....	25
2.2.1. <i>Xenopus laevis</i> Embriyoları ile Yapılan Denemeler	25
2.2.2. <i>Xenopus laevis</i> Larvaları ile Yapılan Denemeler.....	28
2.2.3. Solüsyon pH'larının Belirlenmesi.....	30
2.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	30
3. BULGULAR.....	32
3.1. Denemeler Sonucu Gözlenen Ölüm Oranları	32
3.1.1. Akut Embriyo Testi.....	32
3.1.2. Akut Larva Testi	33
3.2. Akut Toksikite Testleri Sonucu Hesaplanan LC10, LC50, LC90, EC50 ve Teratojenik İndeks (TI) Değerleri	33
3.3. Denemeler Sonucu Hayatta Kalan Bireylerde Ölçülen Vücut Uzunlukları.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.3.1. Akut Embriyo Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları.....	36
3.3.2. Akut Larva Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları....	37
3.3.3. Kronik Embriyo Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları.....	38
3.3.4. Kronik Larva Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları.....	40
3.4. Solüsyon pH'larının Karşılaştırılması	41
3.5. Acetamiprid'in Neden Olduğu Malformasyon Tipleri ve Oranları	42
3.5.1. Akut Embriyo Testi Sonucu Gözlenen Anomaliler.....	42
3.5.2. Akut Larva Testi Sonucu Gözlenen Anomaliler	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR DİZİNİ	62
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Pestisitlerin doğada izlediği yol	3
1.2. Neonikotinoid insektisitlerin sinirsel iletim üzerindeki etkisi	5
2.1. <i>Xenopus laevis</i> türünde amplexus ve yumurta bırakımı	25
2.2. Blastula evresindeki <i>Xenopus laevis</i> embriyoları	26
2.3. Toksikite test düzeneği	28
2.4. 46. evredeki <i>Xenopus laevis</i> larvası	28
3.1. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.....	35
3.2. Akut larva testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.....	35
3.3. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları	37
3.4. Akut larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları.....	38
3.5. Kronik embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları	39
3.6. Kronik larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları	41
3.7. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ölüm ve malformasyon yüzdeleri.....	44
3.8. Akut embriyo testi sonunda konsantrasyon gruplarına göre malformasyon tipi dağılımı	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar.....	46
3.10. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar.....	47
3.11. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar.....	48
3.12. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar.....	49
3.13. Akut larva testi sonunda konsantrasyon gruplarına göre malformasyon tipi dağılımı.....	50
3.14. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz kalan larvalarda gözlenen bazı anomaliler	51
3.15. Acetamiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz kalan larvalarda gözlenen bazı anomaliler	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Pestisitlerin hedef alınan organizmaya göre sınıflandırılması	10
1.2. Pestisitlerin zararlının biyolojik dönemine göre sınıflandırılması.....	10
1.3. Pestisitlerin etken maddesine göre sınıflandırılması.....	11
1.4. Pestisitlerin fiziksel haline göre sınıflandırılması.....	12
1.5. Acetamiprid'in genel özellikleri	18
1.6. Mospilan (20 SP)'nin genel özellikleri	18
3.1. 96 saatlik Acetamiprid uygulaması sonunda <i>X. laevis</i> embriyolarında gözlenen ölüm oranları.....	32
3.2. 96 saatlik Acetamiprid uygulaması sonunda <i>X. laevis</i> larvalarında gözlenen ölüm oranları.....	33
3.3. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.....	34
3.4. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan EC50 ve TI değerleri.....	34
3.5. Akut larva testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.....	34
3.6. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları	36
3.7. Akut larva testi sonucu hesaplanan ortalama vücut uzunlukları.....	38
3.8. Kronik embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları.....	39
3.9. Kronik larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.10. Akut embriyo testinde kullanılan solüsyonların ortalama Ph değerleri.....	41
3.11. Akut larva testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri	41
3.12. Kronik embriyo testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri	42
3.13. Kronik larva testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri	42
3.14. Akut embriyo testi sonucu gözlenen malformasyon tipleri ve yüzdeleri.....	43
3.15. Akut larva testi sonucu gözlenen malformasyon tipleri ve yüzdeleri.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
LC50	Populasyonun%50 sini öldüren konsantrasyon
LC10	Populasyonun%10 unu öldüren konsantrasyon
LC90	Populasyonun%90 ını öldüren konsantrasyon
EC50	Populasyonun%50 sini etkileyen konsantrasyon
FETAX	(Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus)
mg	Miligram
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
I.U	<i>International Unit</i>
ppm	Milyonda bir
TI	Teratojenik İndeks
h.	Saat

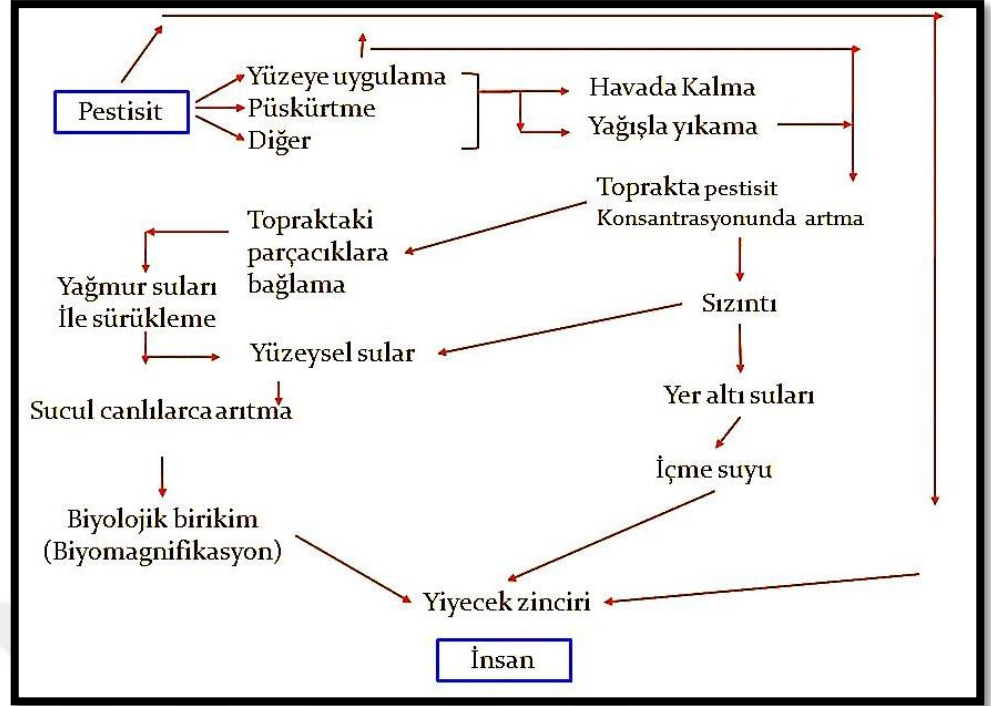
1. GİRİŞ

Eski çağlardan bu yana beslenme ve barınma yeryüzündeki en önemli iki gereksinim olarak bilinmektedir. Özellikle son yıllarda yüksek bir hızla artmaya başlayan nüfus karşısında, bu kalabalık nüfusun beslenme ihtiyacını karşılayabilecek oranda ve nitelikte gıda maddesi üretebilmek dünya çapında en ciddi sorunlardan biri haline gelmiştir. Günümüz koşullarında hem talebi karşılayacak miktarda hem de kaliteli gıda maddesi yetiştirebilmek oldukça zordur. Tarıma uygun olan alanların çoğu kontrolsüz artan nüfusun gereksinimlerini karşılamak üzere sanayileşme ve yapılaşmayla işgal edildiği için yeryüzündeki tarımsal alanlar giderek azalmaktadır. Bu nedenle yeterli ürün eldesi ancak birim alandan alınan verimin artırılması ile mümkün olabilmektedir. Herhangi bir tarım ilacı kullanılmadan yapılan üretimlerde yaklaşık olarak %65 oranında verim kaybı olduğu bilinmektedir. Tarımdaki esas amaç üretimin artırılması ve ürün kaybının en aza indirilmesi haline gelmiştir. Bu amaçla tarımsal üretim alanlarında çeşitli koruyucu-önleyici maddelerden yararlanılmaya başlanmıştır (Öztürk, 1990; Sarıgül, 2007).

Tarımsal ürünlerin, üretiminden tüketiciye ulaşana kadar geçirdiği tüm aşamalarda besin değerlerini bozabilecek ya da bu ürünlerin miktarının ve kalitesinin azalmasına neden olabilecek her türlü zararlı etkeni kontrol altına alabilmek amacıyla kullanılan sentetik ya da doğal maddelerin tümüne verilen ortak isim pestisitlerdir (Egemen ve Canyurt, 1996). Pestisitler, uygulama kolaylığı, kullanım sonucunda büyük oranda başarı elde edilmesi, düşük maliyet ve kısa süreli aralıklarla uygulanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Pestisitlerin yaklaşık %75'i tarımsal üretimde kullanılsa da bunun yanında endüstride, ev, otel, hastane, park gibi ortamlarda haşerelerle mücadele için de önemsenir miktarda pestisit kullanılmaktadır. Tanımından da anlaşılacağı üzere pestisitler aslında öldürmek üzere formüle edilmiş zehirlerdir. Kullanılacak pestisit tercih edilirken dikkate alınması gereken en önemli özellik, pestisit hedefteki zararlı canlılar için yüksek toksik etkiye sahip olurken hedef dışındaki diğer organizmalar için herhangi bir toksik etkiye sahip olmaması ya da çok düşük toksik etkide olmasıdır (Last and Wallace, 1992; Demirci vd., 2005).

Kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir negatif etkiye neden olmadığı düşünülen pestisitlerin zararlı etkileri yavaş yavaş dikkat çekmeye başlayınca bu zararları keşfetmek, azaltabilmek veya ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli araştırmalar ve çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Zamanla artan arı, balık, kurbağa ve kuş ölümleri, birçok canlıda kusurlu doğumlar, biyolojik çeşitliliğin azalması, davranış bozukluklarının ortaya çıkması, gelişim bozuklukları ve bazı hastalıklarda belirgin derecede artış, pestisitlerin olumsuz etkilerinin çevre kirlenmesinden, çeşitli besinlere oradan da çevreyle sürekli iletişimde olan canlılara kadar uzandığını ve araştırmaların boyutunun geliştirilip çalışmalara daha bilimsel bakılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Aslında pestisitlerin çevredeki olumsuz etkileri hakkında ilk ciddi araştırma ve mücadele ünlü biyolog Rachel Carson'ın 1962 yılında yayınlanan eseri "Silent Spring" ile başlamıştır. Kitapta özellikle DDT ve klorlu hidrokarbonların yüksek oranda birikme özelliklerine değinilerek, söz konusu pestisitlerin canlıların doku ve organlarında büyük ölçüde depolandıklarına dikkat çekilmiştir. Ayrıca bu maddelerin besin zinciri yoluyla aktarılması sonucu hedef dışı organizmalar için potansiyel tehlike oluşturabileceği de belirtilmiştir. Carson'ın çabaları sonucu Birleşik Devletlerde 1971 yılında DDT'nin yasaklanması ve diğer kimyasalların kullanımına kontrol getirilmesiyle birlikte özellikle etkilenen kuş populasyonlarında belirgin bir iyileşme göze çarpmaya başlamıştır (Carson, 1962; Coppage, 1971; Hill and Fleming, 1982; Yıldız vd., 2005; Reece et al., 2013).

Özellikle son yıllarda tarımsal faaliyetler içerisinde büyük oranda yer alan ve tarım zararlılarını etkisiz hale getirmek amacıyla sürekli olarak kullanılan pestisitlerin kullanıldıkları yerlerdeki toprağı ve suyu kirlenmelerinin yanı sıra buldukları yerlerden ve üretimlerinin yapıldığı tesislerden çeşitli biyolojik ya da fiziksel taşınım yollarıyla yer altı ve yer üstü sularına karışarak hedef dışı organizmalarda da ciddi toksik etkiler meydana getirdiği tespit edilmiştir (Richardson, 1998; Yıldız vd., 2005) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Pestisitlerin doğada izlediği yol (Güler ve Çobanoğlu, 1997; Keleş, 2017).

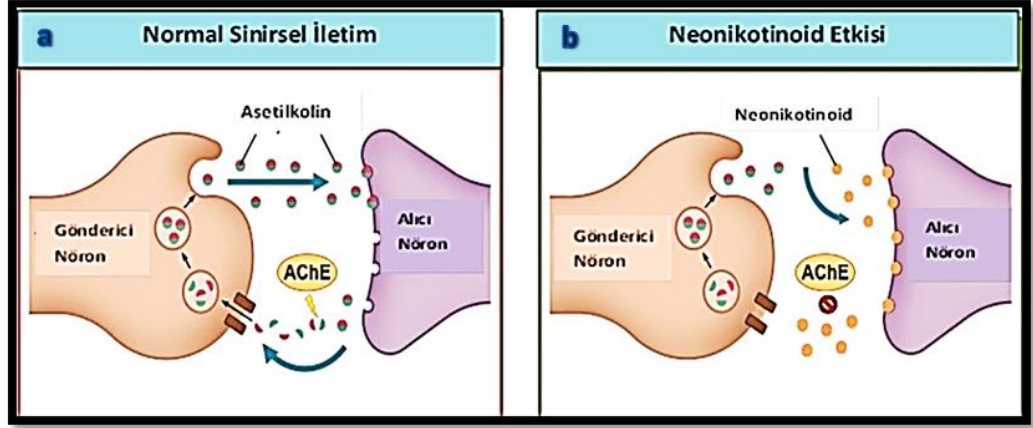
Pestisitlerin tarım alanlarında kullanımının dışında, su bitkilerini koruma amacıyla direkt suya yapılan uygulamaları, evsel kullanımları, endüstriyel tesisler ve üretim tesislerinden kaynaklanan sızıntıları, park ve bahçelerdeki uygulamaları, boş ilaç ambalajlarının çevreye atılması gibi faaliyetlerle de ekosistemde geniş çaplı yayılış gösterdiği bilinmektedir. Colorado'daki bir üretim tesisinden yayılan zehirli kimyasalların birkaç mil uzaklıktaki tarım alanlarına ulaşarak etraftaki canlılara ve yetiştirilmekte olan mahsullere zarar verdiği tesbit edilmiştir (Carson, 1962). Doğadaki pestisit konsantrasyonunun ekosistemdeki doğal işleyişi bozacak düzeyde olduğu ve birçok canlının biyolojik işlevlerinde direkt ya da dolaylı olarak çeşitli olumsuz etkilere yol açtığı farklı yıllarda farklı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Nimmo and McEwen, 1993; Atamanalp ve Yanık, 2001). Bu ilaçların kullanımının fazla olduğu bölgelerde yaşayan canlılarda pestisit biyobirikiminin daha fazla olduğu dikkat çekicidir. Bölgelere göre yakalanan bazı balık türlerinde DDT birikiminin araştırılması sonucu en fazla birikimin bu maddenin en fazla kullanıldığı bölge olan Akdeniz Bölgesi'nden yakalanan balıklarda olduğu tespit edilmiştir (Baştürk et al., 1980; Güler ve Çobanoğlu, 1997; Egemen, 2006). Ayrıca sulara karışmak suretiyle oldukça kapsamlı yayılım gösteren bu maddelerin büyük bir kısmının kanserojen özellik taşıması, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olması, şimdiki ve daha sonraki nesiller üzerinde

yaratacağı olumsuz etkiler düşünüldüğünde bu konuda yapılan toksisite çalışmalarının önemi daha da artmaktadır (Bouhafs et al., 2009; Bosch et al., 2011).

İnsektisitler tarımsal faaliyetlerde zararlılara karşı sık olarak tercih edilen pestisit gruplarından biridir. İnsektisitlerin tarım alanında kullanılmasının temel hedefi zararlı böcekleri kontrol altına alarak ürün veriminin yükselmesini sağlamaktır. İnsektisitlerin çalışma prensibi sinirsel iletim üzerine etki ederek ani ölüm şeklinde gerçekleştiği için genel toksik etki mekanizması ve hedef aldığı organlar, hedef olmayan diğer canlı organizmalarda da hemen hemen aynıdır. Bu nedenle insektisilerin doğadaki hedef olmayan diğer hayvan gruplarında olumsuz etki gösterme potansiyelinin diğer pestisitlere nazaran daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Gubler, 1998).

Günümüzde farklı etken maddelere sahip birçok insektisit mevcuttur. Fakat özellikle yüksek miktarda ve aşırı sıklıkta kullanılan bazı insektisitlerin etken maddelerine karşı böceklerde direnç oluşması nedeniyle sürekli olarak yeni etken maddeli insektisit geliştirilmesi ihtiyacı söz konusudur. Neonikotinoid grubu insektisitler, bu ihtiyaç neticesinde geliştirilen yeni nesil insektisitlerdendir ve yaklaşık olarak son 30 yıldır tüm dünya genelinde zararlılara karşı en fazla kullanılan insektisitler arasında sayılmaktadır. (Kovganko and Kashkan, 2004; Van Der Sluijs et al., 2013).

Nikotinden türetilen neonikotinoid insektisitler, nikotinic asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) agonisti olarak çalışırlar (Şekil 1.2). Nikotinic asetilkolin reseptörlerinin memelilerdeki yapısının böceklerdekinden farklı yapıda olması nedeniyle neonikotinoidlerin memelilerdeki söz konusu reseptörlere olan ilgisinin az olacağı, bu nedenle de neonikotinoid insektisitlerin memeliler üzerindeki toksisitesinin düşük olduğu düşünülmektedir (Tomizawa and Casida, 2003; 2005; Casida and Quistad, 2004). Bunun yanında neonikotinoid insektisitlerin uygulanma ve depolanmasının kolay olması, maliyetinin düşük olması, zararlıları yok etmedeki başarısı ve çoğu insektisit aksine lipofilik özellikte olmaması nedeniyle zararlıların kontrolünde diğer grup insektisitlerin yerine sıklıkla tercih edilmeye ve giderek artan bir hızla kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 1.2. Neonikotinoid insektisitlerin sinirsel iletim üzerindeki etkisi a. Normal sinirsel iletim b. Neonikotinoidlerle etkileşim sonrası sinirsel iletim (Bioninja, 2017).

Fakat sudaki çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle, neonikotinoid insektisitlerin yer üstü ve yer altı sularına yoğun miktarda karıştığı bilinmektedir. Uygun koşullar altında (20°C, pH:7), neonikotinoid insektisitlerin sudaki çözünürlüğü 184 mg/L ile 590,000 mg/L arasında değişmekte olup, su kaynaklarına sürekli olarak bir karışma durumu mevcuttur (PPDB, 2012; Wood and Goulson, 2017). Suyu yüksek oranda karışması nedeniyle bu gruptaki insektisitlerin bazı yararlı böcekler, amfibiler ve balıklar gibi hedef olmayan organizmalar için tehdit oluşturabileceği son yıllarda dikkat çekmektedir (Kocaman and Topaktaş, 2007; Beketov and Liess, 2008).

Hollanda'da 2004 yılından bu yana neonikotinoid bir insektisit olan İmidacloprid'in yüzey sularında ekotoksikolojik limitten (13 ng/L) 25,000 kat daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Van Dijk et al., 2013). 2010 ve 2011 yıllarında Kaliforniya'da bulunan tarım alanları yakınındaki yüzey sularından alınan numunelerin ise %89'unda İmidacloprid tespit edildiği ve bu numunelerin %19'unda USEPA tarafından belirlenen 1.05 µg/L limitinin aşıldığı belirlenmiştir (Starner and Goh, 2012; Van Dijk et al., 2013). 2014 yılında Kanada'da yapılan bir araştırmada ise su kaynaklarından ve sedimentlerden farklı dönemlerde alınan numunelerin analizinde neonikotinoid insektisit konsantrasyonu İmidacloprid için maximum 256 ng/L (ortalama:15.9 ng/L), Thiamethoxam için maximum 1,490 ng/L (ortalama:40.3 ng/L), Clothianidin için maximum 3,110 ng/L (ortalama:142 ng/L) ve Acetamiprid için maximum 54.4 ng/L (ortalama:1.1 ng/L) olarak ölçülmüştür (Main et al., 2014; Bonmatin et al., 2015).

İspanya'da sera topraklarında bulunan sudaki neonikotinoid konsantrasyonunun, yeraltı suları için izin verilen miktarın 20 katını aştığı belirlenmiştir (Gonzalez-Pradas et al., 2002). Macaristan'da ise en yüksek neonikotinoid konsantrasyonu yaz başında yağmur sonrası geçici sığ su havzalarında tespit edilmiş olup 10–41 µg/L'dir (Székács et al., 2015). Teksas'ın çiftlik alanları yakınındaki geçici sulak alanlarda ise Thiamethoxam ve Acetamiprid konsantrasyonlarının 225 µg/L'yi aştığı belirlenmiştir (Anderson et al., 2013). Avustralya'da tarım alanlarından su alan nehirlerden yağış sonrası alınan örneklerin %27-93'ünde 5 farklı neonikotinoid insektisite rastlandığı ve bu insektisitlerden Imidacloprid konsantrasyonunun 4.6 µg/L, Thiacloprid konsantrasyonunun ise 1.4 µg/L'ye kadar ulaştığı bildirilmiştir (Sanchez-Bayo and Hyne, 2014; Morrissey et al., 2015).

Neonikotinoid insektisitler su kaynaklarına bol miktarda karışmaları nedeniyle özellikle suda yaşayan plankton, balıklar, amfibi larvaları ve hatta besin zinciri yoluyla bu canlılarla beslenen diğer organizmalar için potansiyel tehlike oluşturmaktadır. Bu insektisitlerin su kaynaklarından toprağa geçişleri sonucu bitkiler tarafından absorbe edilerek bitkilerin nektar ve polen kısımlarında birikim gösterdikleri bu yolla da böcekler, arılar, kelebekler ve kuşlara kadar ulaştıkları bilinmektedir (USEPA, 2012; Goulson, 2013; Uçkun, 2013).

2008 yılı Mayıs ayında Almanya'da neonikotinoid insektisitlerden Clothianidin ve Imidacloprid uygulaması sonucu bal arısı popülasyonunun %50'sinin yok olduğu, 2013 yılı Haziran ayında ise Amerika'nın Oregon Eyaleti'ndeki ıhlamur ağaçlarının yine bir neonikotinoid insektisit olan Dinotefuran ile ilaçlanmasından sonra 50.000 civarı yaban arısının öldüğü rapor edilmiştir (EPA, 2008; Hopwood et al., 2012). Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar da neonikotinoid grubu insektisitlerin bal arılarında önemli toksik etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin arıların öğrenme ve hatırlama yeteneklerinde kayıp, besin arama davranışlarında bozulma, kovan içi iletişim bozuklukları, bağışıklık sisteminin bozulması sonucu hastalıklara yatkınlık, üremede azalma ve giderek artan oranda ölüm gibi durumlara yol açtığı bildirilmiştir (Decourtye et al., 2004a; 2004b; Maini et al., 2010; Uçkun, 2013).

Ayrıca yapılan çalışmalarla neonikotinoid insektisitlerin balıklar, hedef dışı böcekler, amfibiler ve hassas bazı kuş türlerinde de üreme bozuklukları, sitotoksik, genotoksik etkiler, büyüme ve gelişme problemleri ile immün sistem bozukluklarına yol açtıkları belirlenmiştir. İlaçlanan tohumlarla ve ilaçtan etkilenmiş böceklerle beslenen insektivor kuşların da tehdit altında olduğu bilinmektedir (Tegowska et al., 2004; Gibbons et al., 2015). Avrupa Kıtası'nda yapılan araştırmaların sonuçlarına göre neonikotinoid grubundan üç insektisit (Clothianidin, Imidacloprid ve Thiametoxam) yüksek oranda risk taşıdığına karar verilerek kullanımlarına sınırlandırma getirilmiştir (EFSA, 2013; Uçkun, 2013).

Neonikotinoidlerin su kaynaklarına geniş ölçüde karışmaları nedeniyle tüm doğal çevre için ciddi bir tehdit oluşturabileceğinin fark edilmeye başlanmasına rağmen neonikotinoidler ile yapılan toksisite araştırmaları sınırlı sayıdadır. Mevcut literatürde; az sayıda çalışmada bu gruptaki pestisitlerin genel olarak akut toksik etkilerine yer verilmiş, kronik etkilerine ise çok az değinilmiştir (Van Der Sluijs et al., 2013).

Acetamiprid, neonikotinoid grubu bir insektisit olup hedef seçici özelliği nedeniyle sık kullanılmaktadır. Özellikle tarım yapılan sulak alanlar etrafında kullanılan bu pestisit su kaynaklarına büyük oranda karışmaktadır. Acetamiprid'in kullanıldığı alanlar nedeniyle etkilemesi olası olan hedef dışı organizmalar üzerindeki toksik etkileriyle ilgili çalışma sayısı sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda Acetamiprid'in insan bağırsak ve periferik lenfosit hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik potansiyele sahip olduğu comet assay ve mikronükleus testlerinden yararlanılarak belirlenmiştir. Çalışmada Acetamiprid uygulamasına maruz kalan hücrelerde kromozomal bozukluklar ve mikronükleus oluşumları tespit edilmiştir (Kocaman, 2007; Singh et al., 2012; Çavaş et al., 2012; Van Der Sluijs et al., 2013).

Amfibiler, ekosistemdeki besin zincirinde oldukça kritik bir noktada bulunan, doğal döngünün devamlılığı için önem teşkil eden canlılardır. Dünya çapında amfibi popülasyonlarında özellikle son yıllarda önemsenir bir azalma söz konusudur. Bu azalmada en önemli etkenlerden biri olarak tarım zararlılarına karşı kullanılan pestisitler göze çarpmaktadır. Amfibiler, diğer canlılara oranla

pestisitlerin olumsuz etkilerine karşı daha büyük bir risk altındadır. Çünkü bu canlıların derisi son derece geçirgen olup, bu durum canlının kirleticilere maruziyetini arttırmaktadır. Ayrıca amfibiler üreme alanı olarak tarım ilaçlarının birikimi açısından çok elverişli olan kirliliğe maruz, sığ ve durgun suları ya da küçük su birikintilerini tercih etmektedirler. Bu sığ su birikintilerinde sirkülasyon imkanı olmaması kirleticilerin birikimine neden olarak amfibi embriyo ve larvaları için büyük tehlike arz etmektedir. Gelişimin erken döneminde canlıların kirleticilere karşı olan hassasiyeti düşünüldüğünde durumun önemi ortaya çıkmaktadır (Carson, 1962; Anwar, 2003; Sayım, 2008; Wagner et al., 2017). Acetamiprid'in belirli bir konsantrasyondan sonra *Rana temporaria* (Amphibia; Anura) türünün larvalarında büyüme ve metamorfozu olumsuz yönde etkilediği ayrıca larvaların gelişim sırasındaki ölüm oranını arttırdığı belirlenmiştir (Tegowska et al., 2004).

1.1. Pestisitler ve Toksikite Testleri

Canlılar yaşamsal gereksinimlerini karşılarken ekosistemi etkilemekte böylelikle doğal çevrede kısa veya uzun süreli çeşitli değişikliklere yol açmaktadır. Pestisitler insanların zararlılardan korunmak üzere kullandıkları ve kalıntılarıyla ekosistemi etkileyen maddelerdir. Pestisitler artık modern tarım için vazgeçilemez bir bileşen haline gelmiştir çünkü pestisit kullanımı ile düşük maliyete karşılık kaliteli ve yüksek verimli ürün elde edilebilmektedir. Ancak günümüzde bu maddelerin doğal dengeyi etkileyen en önemli tehlikelerden olduğu ve çevre için potansiyel zarar oluşturduğu bilinen bir gerçektir.

Genel olarak uygulanan pestisitlerin önemli bir miktarı hedefteki organizma dışına gitmektedir. Pestisitlerin kullanılan miktarının çok azı hedef organizmaya ulaşırken kalan kısmının ekosisteme karıştığı bilinmektedir. Burada pestisitlerin bilinçsiz ve ölçsüz kullanımının etkileri önem kazanmaktadır (Demirci vd., 2005; Baltacı-Yiğit, 2015). Pestisitlerin günümüzde bilinen ve devamlı olarak kullanılan birçok çeşidi vardır. Bunun yanında sürekli olarak yeni pestisitler üretilmekte ve piyasaya arz edilmektedir. Pestisitlerin formülasyonunda etken maddenin yanı sıra yardımcı maddeler de yer almaktadır. Bu yardımcı maddeler;

etki arttırıcılar, güvenlik arttırıcılar, sıvı ve katı taşıyıcılar, eriticiler gibi pestisitlerin pestisit özelliğini kazanmasına yardımcı olan maddelerdir (Vural, 2005).

Kullanılan bir pestisit taşıdığı risklerin;

1. Çevredeki kalıcılığı,
2. Taşınımı,
3. Hedef dışı organizmalar üzerindeki etkileri,
4. Etkili olması için kullanılması gereken miktar,

olmak üzere dört ayrı faktöre bağlı olduğu kabul edilmektedir.

Pestisitlerin sınıflandırılmasında dikkate alınan birçok kriter bulunmaktadır. Bu kriterler arasında en sık tercih edilenler şu şekildedir (Öztürk, 1990);

- I. Hedef alınan organizmaya göre
- II. Zararlıların biyolojik dönemlerine göre
- III. Bileşimindeki etken maddesine göre
- IV. İlacın fiziksel haline göre
- V. İlacın yarılanma ömrüne göre

I. Hedef Alınan Organizmaya Göre Sınıflandırma

Pestisitleri sınıflandırmada en sık olarak kullanılan kriter hedef alınan organizmaya yönelik olandır. Etki gösterdikleri canlı grubuna göre pestisitler; fungusitler, insektisitler, herbisitler, rodentisitler, akarisitler, algisitler, mollusisitler, nematisitler, bakterisitler, aphisitler, avisitler, repellentler, fungustatikler şeklinde gruplandırılmaktadır (Çizelge 1.1).

Bu grupların arasında en yaygın kullanılanlar ise sırasıyla; İnektisitler (böcek öldürücüler), Herbisitler (yabani ot öldürücüler), Fungusitler (fungus öldürücüler) ve Rodentisitlerdir (kemirgen öldürücüler) (Kubilay, 2013).

Çizelge 1.1. Pestisitlerin hedef alınan organizmaya göre sınıflandırılması (Egemen, 2006).

PESTİSİT ÇEŞİTLERİ	UYGULANAN GRUP	ETKİ
İnsektisitler	Böceklerle karşı	Öldürücü
Fungusitler	Mantarlarla karşı	Öldürücü
Herbisitler	Zararlı otlara karşı	Öldürücü
Rodentisitler	Kemirgenlere karşı	Öldürücü
Akarisitler	Akarlara karşı	Öldürücü
Algisitler	Algilere karşı	Öldürücü
Mollusisitler	Salyangozlara karşı	Öldürücü
Nematisitler	Nematodlara karşı	Öldürücü
Bakterisitler	Bakterilere karşı	Öldürücü
Repellentler	Kaçırıcılar	Uzaklaştırıcı
Aphisitler	Yaprak bitlerine karşı	Öldürücü
Avisitler	Kuşlara karşı	Öldürücü-Uzaklaştırıcı
Fungustatikler	Funguslara karşı	Faaliyet durdurucu

II. Zararlıların Biyolojik Dönemlerine Göre Sınıflandırma

Pestisitlerin çoğu hedef organizmanın belli bir yaşam dönemini kapsayacak şekilde formüle edilmektedir. Bu açıdan bakıldığında pestisitler 4 ayrı grupta incelenebilir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Pestisitlerin zararlının biyolojik dönemine göre sınıflandırılması (Kubilay, 2013).

ZARARLILARIN BİYOLOJİK DÖNEMLERİNE GÖRE
Ovisitler (yumurta için)
Larvasitler (larvalar için)
Ovalarvasit (yumurta ve larvalar için)
Erginler için

III. Bileşimindeki Etken Maddesine Göre Sınıflandırma

Pestisitlerin sınıflandırılmasında bir diğer önemli unsur ise pestisitlerin etken maddesidir. Etken madde pestisit içindeki ana bileşen olup istenen etkiyi göstermesini sağlar (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Pestisitlerin etken maddesine göre sınıflandırılması (Güler ve Çobanoğlu, 1997; Uçkun, 2013)

ETKEN MADDESİNE GÖRE	PESTİSİT
Organoklorlular	Aldrin, DDT
Organofosforlular	Chlorpyrifos, Diazinon
Karbamatlar	Carbaryl, Methiocarb
Piretiroidler	Deltamethrin, Permethrin, Fenvalerate
Neonikotinoidler	Imidacloprid, Acetamiprid
Arsenikler	Kalsiyum arseniat
Fenoksi bileşikleri	MCPA
Strobilurin bileşikleri	Florokzastrobin
Triazololler	Prokloraz, Triadimefon

IV. İlacın Fiziksel Haline Göre Sınıflandırma

Pestisitlerin pek çok farklı fiziksel halde üretimi yapılmaktadır. Uygulamanın yapılacağı alanın özelliklerine uygun olan pestisit tercih edilebilmektedir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Pestisitlerin fiziksel haline göre sınıflandırılması (Kubilay, 2013)

İLACIN FİZİKSEL HALİNE GÖRE PESTİSİTLER
Islanabilir toz (WP)
Granüller
Emülsiyon konsantre (EC)
Aerosoller
Solüsyon konsantre (SC)
Suda çözülebilen tozlar (SP)
Tabletler ve kapsüller

V. Yarılanma Ömrüne Göre Sınıflandırma

Pestisitlerin dayanıklılığı topraktaki kalıcılığı anlamına gelen ‘**yarı ömür**’ terimi ile ifade edilmektedir. Yarı ömür pestisitinin başlangıç miktarının yarısının ortadan yok olması ya da kendisini meydana getiren diğer bileşiklere ayrılması için gereken süre olarak tanımlanmaktadır.

Kimyasalın topraktaki kalıcılığı sadece kimyasalın özelliğine değil toprağın biyotik ve abiyotik özelliklerine de bağlı olmakla birlikte, topraktaki kalıcılığı birkaç günden birkaç haftaya kadar devam edenler: **kalıcı olmayan pestisitler**, 1-1,5 yıl arası etkisini sürdürenler: **orta kalıcılıkta pestisitler**, dayanıklılıkları 2 yılın üzerinde olan pestisitler ise **kalıcı pestisitler** olarak sınıflandırılmaktadır. Genel olarak yarı ömrü kısa olan kimyasalların olası toksisiteleri de düşük olarak kabul edilmektedir (Arslan, 2015).

Pestisitler gıdalarda ve çevrede sürekli olarak birikim göstermektedir. Bu birikim ekosistemde bulunan tüm canlılar için ciddi derecede tehditler oluşturabilecek ölçüde kirlilik yaratmaktadır (Yazgan, 1997). Özellikle tarım alanlarında kullanılan ilaçların kalıntıları ya suya bağlanarak dip sedimentlerde birikir ya da canlılar tarafından absorbe edilerek bünyelerine aktarılır. Her iki durumda da kalıntıların hedef dışı organizmalara zarar verme potansiyeli yüksektir (Rand and Petrocelli, 1985).

Pestisitlerin zehirli olduğu eski zamanlardan beri bilinmektedir fakat başta insan olmak üzere ekosistemde yaşayan diğer hedef dışı organizmalar için olumsuz etkilere sahip olduğu ancak son yıllarda anlaşılabilmektedir. Pestisitlere doğrudan ya da dolaylı yoldan maruz kalan canlılarda çeşitli kronik hastalıklar, davranış bozuklukları, nörolojik bozukluklar, teratojenik etkiler sonucu kayıplar ya da ölü doğumlar ve hatta genetik bozukluklara kadar uzanan geniş çapta hasarlar görülebilmektedir (Andersson et al., 2014).

Pestisitlerin büyük çoğunluğunun çevrede uzun yıllar bozunmadan korunduğu bilinmektedir ve pestisitlerle yapılan toksisite çalışmalarına göre pestisitlerin toksik etkilerinin özellikle genç bireylerde daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun gelişimin erken evrelerinde henüz tam gelişmemiş olan metabolik kapasiteyle alakalı olabileceği düşünölmektedir (Anwar, 2003; Andersson et al., 2014).

Doğadaki kirletici maddeler 3 farklı yolla canlı vücuduna alınmaktadır;

- Solunum yolu
- Vücut yüzeyinden absorbsiyon
- Sindirim sistemi (beslenme yoluyla)

Karasal organizmalar çoğunlukla bu yollardan bir ya da ikisinden etkilenirken, sucul organimalar için her üç yoldan da zararlı madde alınımı söz konusu olmaktadır. Zararlı maddelerin doğadaki dağılımı ve çeşitli ekosistemler üzerindeki etkileri **Ekotoksikoloji** bilim dalı tarafından araştırmaktadır. Ekosistemdeki zararlı etkileri belirlemek kadar, bu etkilerin azaltılması için çareler üretmek de ekotoksikoloji üzerine çalışan araştırmacıların amaçları arasındadır (Parlak vd., 2009).

Herhangi bir yolla doğaya karışan kirleticilerin o ortamda yaşayan canlılar üzerindeki potansiyel zararlarını belirlemek amacıyla yapılan deney ve değerlendirmelerin bütününe **toksisite testleri** denir. Ayrıca dünya genelinde piyasaya sürölecek olan tüm ilaçlar, kozmetik ve temizlik ürünleri, besin katkı maddeleri de mutlaka toksisite testlerine tabi tutularak toksik açıdan

değerlendirilmektedir. Toksikite testleri kısa ya da uzun vadedeki etkileri ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır. Söz konusu araştırmada amaç hangi etkiyi gözlemlemek ise ona uygun olan test yöntemi tercih edilmelidir. Toksikite çalışmalarında çoğunlukla deney hayvanları kullanılmaktadır. Deney hayvanlarının kolaylıkla gözlenebilmesi, istenilen zamanlarda kontrol edilebilmesi ve gerekli tespit işlemlerinden sonra bütün dokularının incelenebilmesi toksisite testlerinde deney hayvanlarının tercih edilmesinin başlıca nedenlerindedir (Parlak vd., 2009; Arome and Chinedu, 2013).

Pestisitlerin canlılar üzerindeki toksik etkileri genel olarak **akut etki** ve **kronik etki** olarak iki ana grupta incelenebilir:

Akut Etki; Akut toksik etki kontrollü şartlar altında kısa süre içinde yüksek dozlardaki maddelerin ortaya çıkardığı etkilerdir. Akut toksisite testleri, kısa süreli değerlendirme testleri olup canlının herhangi bir maddenin yüksek miktarlarına maruz kaldığı kısa bir süre içinde meydana gelen etkileri belirlemek amacıyla yapılır. Bu testler aynı maddenin farklı konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmış birkaç uygulama grubu ve madde içermeyen sadece ortam şartlarında bulunan bir kontrol grubu kullanılarak gerçekleştirilir. Akut testlerin esas amacı, belirlenen tür için uygulanan maddenin **lethal konsantrasyon (LC50)** değerini tespit edebilmektir.

LC50 (Lethal Konsantrasyon); Belirli bir süre içinde kendisine maruz kalan organizmaların %50 sini öldüren toksik madde konsantrasyondur. Bir kimyasalın hedef dışı organizmalar için risk değerlendirmesinin yapılmasında akut toksisite testlerinden yararlanılmaktadır. Çünkü lethal konsantrasyon bir maddenin ne derece güvenli olduğunun da bir göstergesidir. LC50 değeri ne kadar düşükse madde o derece toksiktir. Akut testler genel olarak zamana bağlı olarak yapılır. Organizmaların maruziyetinin başlamasından itibaren 24 saatte bir yapılan kontrollerle ölüm oranları belirlenir. Testin amacına yönelik olarak maruziyet süresi 72 saat, 96 saat olabileceği gibi süresi daha da uzun tutulabilir (Gupta, 2012; Arome and Chinedu, 2013).

Kronik Etki; Bir kimyasal maddeye uzun süreli maruziyetin neden olduğu etkiler kronik etki olarak isimlendirilmektedir. Canlıların ekosistemdeki ksenobiyotiklere maruz kalma süresinin genel olarak uzun olmasından yola çıkılarak kronik toksisite testleri yapılmaya başlanmıştır. Kronik toksisite testleri canlıların maddenin nispeten düşük konsantrasyonlarına uzun süreli maruz kalması sonucu ortaya çıkan etkileri belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Söz konusu testlerde maddenin kümülatif etkilerini tespit etmek amaçlanmaktadır (Gupta, 2012).

Bazı maddelerin akut ve kronik etkilerinin yanında maruz kalan bireyin gelecek nesillerini de tehdit eden bir takım olumsuz etkileri bulunabilmektedir. Bu şekilde etkilenen bireyden meydana gelecek olan kuşaklarda çeşitli bozukluklara neden olan etkilere **gecikmiş etki** adı verilmektedir. Karsinojenik, mutajenik ve teratojenik olarak sınıflandırılabilen bu etkiler akut ve kronik toksisite testleri ile saptanamayan veya bu testlerde karşılaşılmış olmasına rağmen ayrıntılarına inilemeyen bazı özel etkilerdir. Bu özel etkileri saptamak amacıyla yapılan testler **özel toksisite testleri** olarak kabul edilir (Boğa, 1996; Vural, 2005).

Etkisini embriyonik yapılanmaları bozacak şekilde göstererek doğuştan bazı bozukluklar (anomaliler) taşıyan canlıların oluşmasına neden olan maddelere **teratojen madde** adı verilir. Teratojenler embriyonik gelişim aşamasında seçici hücre ölümlerine sebebiyet vererek doğuştan kusurlara (malformasyon), embriyonun ölümüne ve düşük yapmaya neden olabilmektedir. Teratojenlerin etkisi embriyonik gelişimin evresine göre farklılık gösterdiği için maruziyetin organizmanın hangi gelişim evresinde gerçekleştiği teratojenite testleri için büyük önem taşımaktadır. Yani teratojen bir maddenin anomali yapma etkisi maruz kalındığı zamana ve doza bağlıdır. Döllenmeden sonraki embriyonik gelişim evrelerinden organogenez evresinin teratojenlere karşı en hassas evre olduğu bilinmektedir. Organogenez evresinde hücre bölünmeleri son derece hızlı olup hücre farklılaşmaları gerçekleşmektedir. Bu evrede teratojen maddeye maruz kalma durumunda çeşitli yapısal değişiklik ve eksiklikler görülebilmektedir (Özbudak vd., 2016).

Teratojenik maddelerin çoğunlukla bireylerde herhangi bir akut ya da kronik etki göstermemesi, etkilerinin gelecek kuşaklarda kendini göstermesi teratojenik maddeler üzerine araştırmaları dikkat çekici hale getirmiş bu amaçla birçok teratojenite test metodu geliştirilmiştir (Boğa, 1996). FETAX testi bu amaçla geliştirilmiş bir test yöntemidir.

1.2. FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) Testi

Xenopus laevis türünün teratojenite testi amacıyla kullanımı ilk kez Greenhouse tarafından gerçekleştirilmiş olup daha sonraki dönemlerde diğer araştırmacıların da katkılarıyla yöntem geliştirilmiştir. *Xenopus laevis* kullanılarak uygulanan bu teratojenite testine FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) ismini veren kişi ise Dumont'tur. Testin tüm kimyasalların teratojenitesini belirlemek üzere standart hale getirilmesini Bantle 1988 yılında gerçekleştirmiştir. Test birçok avantajlı yönüyle dikkat çekmektedir; öncelikle test prosedürü maliyeti az olan bir yöntem olmakla birlikte hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilirdir. Test sonucunda ölüm, büyüme inhibisyonu, anomali oluşumları gibi durumlar stereo mikroskop altında rahatlıkla gözlenebilmektedir (ASTM, 1998).

Bunun yanı sıra *X. laevis* türü laboratuvar şartlarına kolaylıkla adapte olabilen, beslenme ve bakımı kolay olan, hormon indüklemesi ile yılın her mevsiminde yeterli miktarda ve sağlıklı embriyo elde edilebilen bir deney hayvanıdır. Söz konusu türün embriyonik gelişim sürecinin memeli embriyosunun gelişim süreciyle paralel olması da testin değerini arttırmaktadır. Bu durum nedeniyle elde edilen test sonuçları uygulanan maddenin memeliler açısından teratojenite değeri hakkında bir öngörü sağlama potansiyelinde olmaktadır (Boğa, 1996; Birhanlı, 2003). Yapılan alışmalarda FETAX testi sonuçlarının, kemirgenlerle yapılan testlerin sonuçlarıyla yüksek oranda uyumluluk gösterdiği görölmüştür (ASTM, 1998; Pekmezemek, 2004).

FETAX test prosedüründe canlılar test süresi boyunca maddeye maruz kalmaya devam ederler, her 24 saatte bir yapılan kontrollerde ölen embriyolar ortamdaki uzaklaştırılır. Amaç ortamda ölü embriyolar nedeniyle oluşabilecek mikrobiyal bir durumun, yaşayan embriyoları etkileyerek test sonucunu

değiştirmesini önlemektir. Test sonuçları birçok maddenin teratojenitesini belirlemek için yeterli olmaktadır.

1.3. Acetamiprid (Neonikotinoid İsektisit)

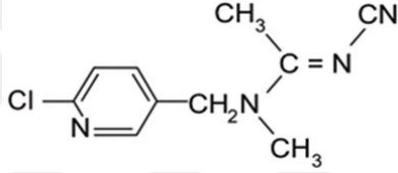
Neonikotinoid insektisitlerin kimyasal yapılarına göre kloronikotinil, tianikotinil ve furanikotinil olarak 3 ayrı alt grubu mevcuttur (Ünver, 2015). Neonikotinoid bir insektisit olan Acetamiprid, kloronikotinil grubuna dahil olup, 90'lı yılların başlarından itibaren zararlılara karşı kullanılmaya başlanmıştır (Brunet et al., 2005) (Çizelge 1.5).

Kimyasal adı (E)-N1 -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2 -cyano-N1 – **methylacetamidine** olan insektisitinin zararlılarla mücadelede kullanılmak üzere üretilmiş birçok ticari formülasyonu bulunmaktadır. İlk olarak Japonya'da **Mospilan** ticari adıyla satışına başlanmıştır (Yamamoto and Casida, 1999) (Çizelge 1.6). Malcon, Akira, Neoplan, Mostar da insektisitinin ticari formlarından bir kaçının adıdır. Türkiye'de ise ilk olarak 1996 yılında Mospilan adıyla kullanıma sunulmuştur (Ünver, 2015).

Acetamiprid, hedef seçici özelliği ile özellikle bitler, beyaz sinekler gibi emici zararlılara karşı etkili olup pamuk, antep fıstığı, tütün, patates, domates, elma, patlıcan, kiraz, fındık, turunçgiller gibi ürünlerin tarım zararlılarına karşı korunmasında aktif olarak kullanılmaktadır. Diğer neonikotinoid grubu insektisitler gibi Acetamiprid de postsinaptik nikotinic asetilkolin reseptörlerini geri dönüşümsüz olarak bloke ederek merkezi sinir sistemini etkiler. Merkezi sinir sisteminin etkilenmesi zararlının hızlı ve ani bir şekilde ölmesini sağlar. Bu hızlı ve pratik etkisi nedeniyle Acetamiprid kullanımı yaygın olan insektisitler arasında bulunmaktadır (Farooqui, 2013).

Acetamiprid suda çözünürlüğü yüksek olan bir pestisitir. Suda çözünürlüğün yüksek olması pestisitinin sulak alanlarda hızla yayılarak yüzey sularına oradan da yer altı sularına kadar kolaylıkla ulaşmasını sağlayan bir özelliktir. Bu yolla pestisitinin suda yaşayan canlılara oradan da besin zinciri yoluyla sucul ve karasal birçok canlıya ulaşarak zararlı etkiler göstermesi kaçınılmazdır.

Çizelge 1.5. Acetamiprid'in genel özellikleri (Kocaman, 2007).

Kimyasal Adı:	(E)-N1 -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2 -cyano-N1 – methylacetamidine
Sınıfı:	Neonikotinoid insektisit
Suda Çözünürlüğü	(25 °C, pH: 7): 2.95 g/L
Fiziksel Hali:	Toz
Erime Noktası:	89.9 °C
Moleküler Ağırlığı:	222.68 g/mol
Kapalı Formülü:	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Açık Formülü:	

Çizelge 1.6. Mospilan (20 SP)'nin genel özellikleri (Nippon Soda Co. Ltd., 2012).

Etken madde	Acetamiprid %20
Adjuvant	(Belirtilmemiş) %5
Taşıyıcı	(Belirtilmemiş) %75
Toksosite	<i>Cyprinus carpio</i> : LC50:> 100 mg/L (96h) <i>Daphnia magna</i> : EC50:> 159 mg/L (48h) <i>Raphidocelis subcapitata</i> : EC50:> 97.8 mg/L (72h)

Bu çalışmayla, ASTM (American Society for Testing and Materials) standartlarına uygun FETAX test prosedüründen yararlanılarak neonikotinoid bir insektisit olan Acetamiprid'in ekosistemdeki trofik döngüde önemli rol oynayan bir grup olan amfibiler üzerindeki teratojenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma, Acetamiprid'in çok fazla çalışılmamış olan uzun süreli maruziyetteki etkilerinin ortaya konmasını sağlayarak bu insektisit kullanımını konusunda gerekli önlemlerin alınması için konuya dikkat çekilmesini sağlama potansiyelindedir.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Bu çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2017-054 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada laboratuvar koşullarında beslenmekte olan *Xenopus laevis* (Anura; Pipidae) türüne ait embriyo ve larvalar kullanılmıştır. *X. laevis* türüne ait ergin erkek ve dişi kurbağalar, Prof. Dr. Murat ÖZMEN'in yardımlarıyla, İnönü Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Bu tez çalışması ile *X. laevis* türü Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü tarafından, üniversitemizde ilk kez laboratuvar şartlarında üretilmeye başlanmıştır.

Bu çalışmada, laboratuvar şartlarına kolayca adapte olabilen ve uygun ortam koşulları sağlandığında yeterli sayıda, sağlıklı embriyo elde edilebilen bir tür olması açısından ve FETAX testini gerçekleştirmek üzere *X. laevis* türü tercih edilmiştir.

2.1.1. *Xenopus laevis* Türünün Genel ve Biyolojik Özellikleri

Xenopus laevis'in sistematikteki yeri şu şekildedir :

Regnum: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Classis: Amphibia

Ordo: Anura

Familia: Pipidae

Genus: *Xenopus*

Species: *Xenopus laevis* (Daudin, 1802)

Özellikle Güney Afrika'da yayılış gösteren *Xenopus laevis* ilk kez 1802 yılında Daudin tarafından tanımlanmıştır.

X. laevis dorsoventral yassı bir vücut ile gövdesine oranla küçük sayılabilecek bir başa sahiptir. Tür deri yapısı bakımından sucul kurbağalara benzemekle birlikte çiftleşme özellikleri açısından karasal kurbağaları hatırlatmaktadır. Arka ayak parmakları arasında canlıyı yüzmeye elverişli kılan zarlar mevcuttur. Ayrıca arka bacakların oldukça uzun ön bacakların ise kısa ve lateral açılımlı olması nedeniyle tür yüzmek için oldukça uygun bir biçime sahiptir. Canlının derisi yumuşak ve nemli bir yapıya sahiptir. Gözleri karasal kurbağaların gözlerine nazaran daha küçük ve daha belirsizdir. Türün rengi yeşil tonlarında olmasına rağmen bulunduğu zeminin rengine göre tonu açık ya da koyuya doğru değişim göstermektedir.

Bütün bu özelliklerine bakıldığında *Xenopus*'un sucul ya da karasal bir tür olduğu hala kesin olarak söylenememektedir *Xenopus* türü kurbağaların dişileri erkeklerine nazaran daha iri yapılıdır. Dişi kurbağalar kloak kısmında papilla taşırlar. Erkeklerde ise çiftleşme döneminde ön kol içlerinde yapışkan siyah kıllar belirir. Bu kıllar amplexus sırasında erkeklerin dişiyi iyice kavramasını sağlamaktadır.

Halk arasında '**Afrika Tırnaklı Kurbağası**' olarak isimlendirilen *X. laevis* gelişimi ve üremesi hakkında oldukça detaylı bilgiye sahip olunan ayrıca laboratuvar şartlarına çok iyi adapte olan bir tür olması nedeniyle deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Gerekli ortam şartları sağlandığında türün ergin bireylerine Human Chorionic Gonadotropin (hCG) enjeksiyonu yapılarak yılın tüm dönemlerinde yeterli miktarda ve sağlıklı embriyo elde edilebilmektedir.

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen üremede ortam sıcaklığı, ışık, nem gibi faktörlerin yanı sıra ortamın temizliği ve beslenme kalitesi de çok büyük önem taşımaktadır. Özellikle canlının içinde yaşadığı suyun kalitesi üreme potansiyelini etkileyen en önemli faktörlerdendir.

Ergin dişi bireyler yılda 2-3 kez yumurta bırakabilmekte ve her yumurtlama döneminde bir dişiden binlerce yumurta elde edilebilmektedir (Prati et al., 2000). Ampleksus ve yumurta bırakımı genellikle gece ışık, ses ve titreşimin en az olduğu saatlerde gerçekleşmektedir. Yumurta bırakma 10-16 saat boyunca devam edebilmektedir.

Yumurtalar jel bir kılıf ile çevrili olup yaklaşık 1.5 mm boyutundadır. Embriyonal gelişim memelilerdeki gelişime benzer bir süreç göstermektedir. Dölleniş yumurtalar belli bölünmeler geçirerek 2, 4, 8, 16 gibi artan sayıda blastomerlere ayrılır. Ardından blastula, gastrulasyon ve nörulasyon safhaları gerçekleşir ve tüm bu evreler tamamlandıktan sonra larvalar yumurtadan çıkar. Yumurtadan çıkan larvalar 24 saat boyunca su yüzeyinde asılı kalır ve oldukça hareketsiz görünür. Larvalar aktif olarak yüzmeye başladıktan sonra da bir süre daha vitellus kesesinden beslenmektedir. Larvaların beslenme ihtiyacı yumurtadan çıkışı takiben 7. günden itibaren haşlanmış ıspanak ve marul püresi ile sağlanabilmektedir. Larvaların gelişimi; kirlilik, yoğunluk, ortam şartları, besin miktarı, sıcaklık gibi koşullardan büyük ölçüde etkilenmektedir (Nieuwkoop and Faber, 1975; Delgado et al., 2001).

2.1.2. Laboratuvar Şartları

X. laevis türüne ait ergin erkek ve dişi kurbağalar Ege Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kurbağa Laboratuvarı'nda optimum koşullar altında 65x35x25cm boyutlarında cam akvaryumlar içinde barındırılmıştır. Bu akvaryumlarda kloru giderilmiş ve havalandırılmış çeşme suyu kullanılmıştır. Akvaryumlardaki suyun, kurbağaların zaman zaman su yüzeyine çıkarak hava almalarına olanak sağlayacak seviyede, 8-10 cm, olmasına dikkat edilmiştir. Kurbağalar iki günde bir taze, ince kıyılmış (5-6 mm) tavuk karaciğeri ile beslenmiştir. Beslemeden yaklaşık 1 saat sonra kirlenmiş olan akvaryum suları uygun şekilde boşaltılarak yerine kloru giderilmiş su doldurulmuştur.

Ortam sıcaklığı 23 ± 1 °C, fotoperiyot ise 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık olarak ayarlanmıştır.

Denemelere başlamadan önce 6 aylık bir süre boyunca türün aklimesyonu sağlanmıştır.

2.1.3. Denemelerde Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada değişen konsantrasyonlardaki test solüsyonlarının hazırlanmasında ve kontrol gruplarında solüsyon olarak **FETAX** çözeltisi kullanılmıştır. **FETAX** çözeltisi **Tip I ASTM (American Society for Testing and Materials)**, standartlarına uygun şekilde hazırlanmıştır (ASTM, 1998). **FETAX** çözeltisi hazırlanırken 1 litre distile su içinde;

- ✓ 625 mg NaCl
- ✓ 96 mg NaHCO₃
- ✓ 30 mg KCl
- ✓ 15 mg CaCl₂
- ✓ 60 mg CaSO₄.2H₂O
- ✓ 75 mg MgSO₄ karıştırılarak çözülmüştür.

Her denemede ve bütün solüsyon değişimlerinde **FETAX** çözeltisi taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

Denemelerde Acetamiprid'in ticari formülasyonlarından biri olan **MOSPILAN (20 SP)** kullanılmıştır. Uygulama konsantrasyonları, ticari **MOSPILAN (20 SP)** preparatının belli oranlarda sulandırılmasıyla hazırlanmış ve konsantrasyon hesaplamaları, ticari preparat içindeki aktif madde miktarı dikkate alınarak yapılmıştır. Solüsyonların hazırlanmasında manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen çözelti elde edilmiştir.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan neonikotinoid insektisit Acetamiprid, **MOSPILAN (20 SP)** ticari adıyla **SUMI AGRO TURKEY** firmasından temin edilmiştir.

Formaldehit (**Sigma-Aldrich**), MS222 (**Sigma-Aldrich**), Human Chorionic Gonadotropin **PREGNYL (1500 I.U)** kullanılmıştır.

Otomatik pipetler (**Brand**), cam petriler, manyetik karıştırıcı, cam beherler, mezür, stereo mikroskop (**Olympus A216**), pH metre (**Hach-Lange**) kullanılmıştır.

2.1.5. Embriyo Eldesi

Toksisite testlerinde kullanılacak tüm embriyo ve larvalar laboratuvar koşullarında, *Xenopus laevis* türüne ait ergin dişi ve erkek kurbağaların Human Chorionic Gonadotropin (hCG) enjeksiyonu ile amplexusa sevk edilmesiyle elde edilen döllenen yumurtalardan yetiştirilmiştir.

Bu amaçla enjeksiyon yapılacak olan ergin dişi ve erkek bireyler 48 saat önceden toplu olarak yaşadıkları akvaryumdan alınarak ayrı akvaryumlara aktarılmıştır. Yumurta eldesi istenen günden 36 saat önce erkek bireye 200 I.U, ertesini gün ise aynı erkek bireye 300 I.U, dişi bireye ise 600 I.U Human Chorionic Gonadotropin (hCG) dorsal lenf keselerinden enjekte edilerek aynı akvaryuma alınan bireyler amplexusa sevk edilmiştir. Enjeksiyonlarda **PREGNYL** (1500 I.U) stoğundan kullanılmış ve enjeksiyonlar 1 mL'lik insülin enjektörü ile yapılmıştır.

Ampleksusun gerçekleşebilmesi için karanlık ve olabildiğince sessiz bir ortam gerekli olduğu için akvaryumun üzeri ışık geçirmeyen örtü ile kapatılmış ve laboratuvarında sessizlik sağlanmıştır. Bu şekilde karanlık, sessiz ve titreşimsiz bir ortam sağlanarak amplexustan yüksek verim alınması amaçlanmıştır. Ortam sıcaklığı 23 ± 1 °C'de tutulmuştur. Enjeksiyonun ardından 2-4 saat içinde amplexusun başladığı ve yumurta bırakmanın 10-12 saat boyunca sürdüğü gözlenmiştir (Şekil 2.1). Yumurtaların sabah erken saatlerde alınması amaçlandığı için dişi ve erkek bireye yapılan son hormon enjeksiyonları yumurta eldesi istenen zamandan yaklaşık 12 saat önce yapılmıştır.



Şekil 2.1. *Xenopus laevis* türünde amplexus ve yumurta bırakımı

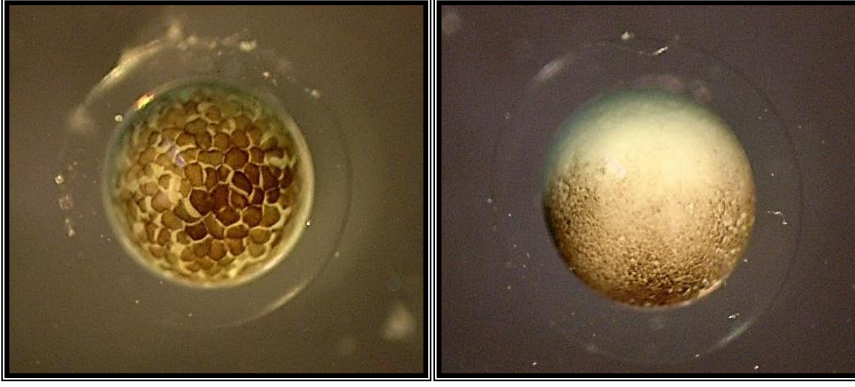
Akvaryumlarda bırakılmış olan yumurtalar ertesi sabah erken saatlerde plastik pastör pipeti yardımıyla nazikçe toplanarak taze hazırlanmış FETAX solüsyonu içeren havalandırılmalı kaplara aktarılmıştır. Elde edilen embriyolar stereo mikroskop altında tek tek incelenerek normal bölünme gösterenler toksisite testlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilmiş embriyolar denemede kullanılacakları blastula safhasına ulaşana kadar havalandırılmalı kaplarda bekletilmiştir.

FETAX embriyo denemelerinde kullanılan embriyoların 8. ve 11. evreler arasında olması gerekmektedir. Çünkü 8. evreden önce seçilen embriyolarda daha sonra anormal bölünmelerin gerçekleşmesi olasıdır, 11. evreden sonraki embriyolarda ise organogenez başlamış olacağından denemeler için uygun olmamaktadır (Nieuwkoop and Faber, 1956).

2.2. Metot

2.2.1. *Xenopus laevis* Embriyoları ile Yapılan Denemeler

Acetamiprid'in *X. laevis* embriyoları üzerindeki toksik ve teratojenik etkilerini belirleyebilmek amacıyla blastula safhasındaki (Şekil 2.2), embriyolar kullanılmıştır. Embriyolar kullanılarak yapılan denemeler akut ve kronik olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Blastula evresindeki *Xenopus laevis* embriyoları (8. ve 9. safhalar).

2.2.1.1. Akut Toksikite Testi

Stereo mikroskop altında seçilerek FETAX embriyo testlerinde kullanılmak üzere seçilmiş olan blastula safhasındaki 15 adet sağlıklı embriyo her birinde 10 mL test solüsyonu bulunan 60 mm'lik cam petrilere aktarılarak Acetamiprid'in 7 farklı konsantrasyonuna 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır.

Uygulama konsantrasyonları yapılan ön deneme sonuçlarına göre belirlenen aralıklarda seçilmiştir. Kontrol grubu için ve diğer uygulama konsantrasyonlarını hazırlarken **FETAX solüsyonu** kullanılmıştır.

Akut toksisite testleri, statik yenilemeli sistem esas alınarak, 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneme kapları 24. 48. 72. ve 96. saatlerde kontrol edilerek ölü embriyolar sayısı kaydedilerek, ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve sonra solüsyonlar yenilenmiştir.

Deneme süresi sonunda hayatta kalan larvalar stereo mikroskop altında fotoğraflanmıştır ve malformasyon gösteren birey sayısı kaydedilmiştir. Malformasyon tipleri anomali atlasına (Bantle et al., 1998) göre tespit edilmiştir. Ayrıca larvaların baş, kuyruk ve baş+kuyruk uzunlukları ölçülerek kaydedilmiştir. Deneme sonunda MS222 ile ötenazi uygulandıktan sonra larvalar %5 formaldehit içerisinde tespit edilerek +4°C'de saklanmıştır.

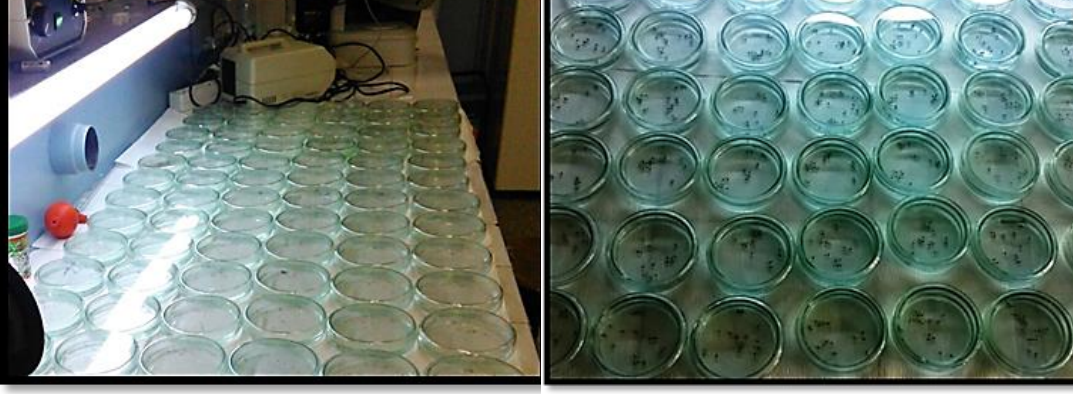
2.2.1.2. Kronik Toksikite Testi

Stereo mikroskop altında seçilmiş olan sağlıklı embriyoların bir kısmı ise Acetamiprid'in embriyolar üzerindeki uzun süreli etkilerini tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Kronik testler her bir kaptaki 15 embriyo olacak şekilde 250 mL'lik cam petrielerde 50 mL test solüsyonu içerisine gerçekleştirilmiştir. Tüm test konsantrasyonları hazırlanırken ve kontrol grubu için **FETAX solüsyonu** kullanılmıştır.

Embriyolar Acetamiprid'in 6 farklı konsantrasyonuna 14 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Yenilemeli sistem esas alınarak yapılan denemeler 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Denemede kullanılan uygulama konsantrasyonları ön deneme sonuçlarına göre belirlenmiştir. Solüsyonların yenilenmesi ve deneme kaplarının kontrolü 24 saatte bir yapılmıştır ve her solüsyon değişiminde ölü embriyolar ortamdan uzaklaştırılarak sayıları kaydedilmiştir. Gelişimin 6. gününden itibaren beslenmeye başlanan larvalar için yem olarak sera micron balık yemi kullanılmıştır. Besleme günlük olarak yapılmıştır; bunun için toz haldeki sera micron'un sulandırılması ile elde edilen stoktan kontrol grubu ve her bir uygulama kabına eşit miktarda eklenerek larvaların beslenmesi için gereken süre boyunca beklendikten sonra solüsyonlar yenilenmiştir.

Deneme süresi sonunda hayatta kalan larvaların baş, kuyruk ve baş+kuyruk uzunlukları ölçülüp kaydedilerek, larvalar stereo mikroskop altında incelenip fotoğraflanmıştır. MS222 ile ötenazi işlemi sonrasında larvalar % 5 formaldehit içeren tüpler içinde tespit edilerek +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 2.3. Toksikite test düzeneği

2.2.2. *Xenopus laevis* Larvaları ile Yapılan Denemeler

Acetamiprid'in *X. laevis* larvaları üzerindeki toksik etkilerini belirleyebilmek amacıyla 46. gelişim evresindeki larvalar kullanılmıştır (Şekil 2.4). Larvalarla yapılan denemeler akut ve kronik olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.4. 46. evredeki *Xenopus laevis* larvası

2.2.2.1. Akut Toksikite Testi

Stereo mikroskop altında seçilen sağlıklı embriyolardan bir kısmı 46. gelişim evresine kadar uygun ortam koşulları altında havalandırılmalı kaplarda yetiştirildikten sonra bu larvalar *X. laevis* larva testi için kullanılmıştır. 46. evredeki larvalarla gerçekleştirilen 96 saatlik akut larva testi, statik yenilemeli sistem esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

Larva testi her birinde 15 larva bulunan 100 mm'lik cam petrilere içerisinde gerçekleştirilmiş olup petrilere 6 farklı konsantrasyonda Acetamiprid içeren 40 mL solüsyon eklenerek 4 tekrarlı deneme yapılmıştır. Petrilere her 24 saatte bir kontrol edilerek solüsyonlar yenilenmiştir ve ölen birey sayısı kaydedilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Deneme süresi boyunca larvalar beslenmemiştir.

96 saatin sonunda hayatta kalan larvaların sayısı kaydedilerek her bir larvanın baş, kuyruk ve baş+kuyruk uzunlukları ölçülmüştür. Larvalar stereo mikroskop altında fotoğraflanarak meydana gelen anomaliler belirlenmiştir. Deneme sonunda larvalar MS222 ile uygulanan ötenazinin ardından %5 formaldehit içinde tespit edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2.2.2.2. Kronik Toksikite Testi

Acetamiprid'in *X. laevis* larvaları üzerinde uzun süreli etkilerini saptamak amacıyla 46. gelişim evresindeki larvalar kullanılmıştır. Denemeler her birinde 15 larva bulunan 250 mL'lik petrilere 50 mL test solüsyonu kullanarak gerçekleştirilmiştir. Test konsantrasyonlarının hazırlanmasında ve kontrol grubu için **FETAX solüsyonu** kullanılmıştır.

Larvalar 14 gün boyunca Acetamiprid'in 6 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Yenilemeli sistem esas alınarak yapılan denemeler 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 24 saatte bir deneme kapları kontrol edilerek ölü larvalar ortamdan uzaklaştırılıp solüsyonlar yenilenmiştir. Denemenin 2. gününden itibaren (gelişimin 6. günü) larvalar sera micron balık yemi ile günlük olarak beslenmeye başlanmıştır. Bunun için toz haldeki sera micron'un sulandırılması ile elde edilen stoktan kontrol grubu ve her bir uygulama kabına eşit miktarda eklenerek larvaların beslenmesi için 4-5 saat kadar beklendikten sonra solüsyonlar değiştirilmiştir.

Deneme sonunda hayatta kalan larvaların sayısı kaydedilerek her bir larvanın baş, kuyruk ve baş+kuyruk uzunlukları ölçüldükten sonra, larvaların fotoğraflanma işlemi stereo mikroskop altında yapılmıştır. Daha sonra bu larvalar

MS222 ile ötenazi uygulanarak %5 formaldehit içinde tespit edilmiştir ve +4 °C 'de saklanmıştır.

2.2.3. Solüsyon pH'larının Belirlenmesi

Toksisite testlerinde sıcaklık, solüsyonların pH'ı gibi faktörlerdeki değişimin sonuçları etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle test sonuçlarının ortam pH'ı değişiminden etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacıyla deneme başlatılırken ve solüsyon yenileme işlemlerinden önce hazırlanan çözeltilerin pH'ları ölçülerek ortalama pH değerleri tespit edilmiştir.

2.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

2.2.4.1. Hayatta kalan larvaların vücut uzunluklarının ölçülmesi

Gerçekleştirilen akut ve kronik denemelerin sonunda hayatta kalan larvaların baş, kuyruk ve baş+kuyruk uzunlukları stereo mikroskopta mikrometrik oküler yardımıyla ölçülmüştür.

Larvaların baş, kuyruk ve total uzunluklarının istatistiksel değerlendirmesinde **SPSS 20** (SPSS Inc., USA) programı aracılığıyla **One Way ANOVA** varyans analizi ve **Kruskal Wallis** analizi uygulanmıştır. Veriler ortalama ve standart hata (S.E) olarak verilmiştir. Analizlerde **p<0.05** düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

2.2.4.2. LC10, LC50, LC90, EC50 ve TI değerlerinin hesaplanması

Acetamiprid'in LC10, LC50, LC90, EC50 ve TI değerlerinin hesaplanmasında **SPSS 20** (SPSS Inc., USA) istatistik programı aracılığıyla **Probit Regresyon Analizi** kullanılmıştır. Teratojenik indeks (TI) değeri; her bir tekrar için belirlenmiş olan 96 saatlik LC50 değerlerinin 96 saatlik EC50 değerlerine oranlanması ile hesaplanmıştır.

2.2.4.3. Malformasyon oranı ve tiplerinin belirlenmesi

Akut embriyo testi sonunda hayatta kalan bireylerden malformasyon gösterenler stereo mikroskop altında fotoğraflanarak, malformasyonlar anomali atlasına (Bantle et al., 1998) göre belirlenip sınıflandırılmıştır. Bu malformasyonlar; kuyruk malformasyonları, ödemler, göz anomalileri, mikrosefali, depigmentasyon (anormal pigmentasyon), anormal bağırsak gelişimleri şeklinde gözlenmiştir.

Tek veya iki ayrı malformasyon gösteren bireyler tabloda ayrı ayrı belirtilmiştir. Bu malformasyonlardan üç veya daha fazla sayıda malformasyonu aynı anda gösteren aşırı deforme bireyler ise çoklu malformasyon başlığı altında toplanmıştır.

Akut larva testi sonunda görülen anomaliler de stereo mikroskop altında fotoğraflanarak sınıflandırılmıştır. Larva testi sonunda gözlenen malformasyonlar; kuyruk eğriliği+kırık kuyruk, kuyruk eğriliği+ödem ve anormal pigmentasyon şeklinde gruplandırılarak, anomali tablosunda belirtilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Denemeler Sonucu Gözlenen Ölüm Oranları

Gerçekleştirilen akut ve kronik toksisite testlerinin sonunda ölen toplam birey sayısı tesbit edilip, ölüm oranları her bir konsantrasyon için yüzdesel olarak hesaplanmıştır.

3.1.1. Akut Embriyo Testi

Blastula safhasındaki *X. laevis* embriyolarının 96 saat boyunca Acetamidrid'in 7 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılması sonucu denemeye alınan toplam 480 embriyodan 284'ünün öldüğü gözlenmiştir.

Kontrol grubunda % 1.7 olarak hesaplanan ölüm oranı, en düşük uygulama konsantrasyonu olan 30 ppm'de % 20, 70 ppm'lik uygulama grubunda % 96.7 olarak tesbit edilmiştir. En yüksek konsantrasyon grubu olan 75 ppm'de ise tüm bireylerin öldüğü gözlenmiştir. Çizelge 3.1 incelendiğinde konsantrasyon artışına paralel olarak ölüm oranlarının da arttığı görülmektedir.

Çizelge 3.1. 96 saatlik Acetamidrid uygulaması sonunda *X. laevis* embriyolarında gözlenen ölüm oranları.

Konsantrasyon (ppm)	n	Ölen birey sayısı	Ölüm oranı (%)
Kontrol	60	1	1.7
30	60	12	20
45	60	22	36.7
50	60	40	66.7
55	60	43	71.7
65	60	48	80
70	60	58	96.7
75	60	60	100

3.1.2. Akut Larva Testi

X. laevis türünün 46. gelişim evresindeki larvaları kullanılarak gerçekleştirilen 96 saatlik larva toksisite testi sonucu denemeye alınan toplam 420 larvadan 195'inin öldüğü gözlenmiştir.

Kontrol grubunda hiç ölüm gözlenmezken, en düşük konsantrasyon olan 58 ppm'de ölüm oranı % 6.7, en yüksek konsantrasyonda ise bu oran %100 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.2 incelendiğinde konsantrasyon artışına paralel olarak ölüm oranlarının da arttığı görülmektedir.

Çizelge 3.2. 96 saatlik Acetamiprid uygulaması sonunda *X. laevis* larvalarında gözlenen ölüm oranları.

Konsantrasyon (ppm)	n	Ölen birey sayısı	Ölüm oranı (%)
Kontrol	60	0	0
58	60	4	6.7
64	60	12	20
68	60	23	38.3
72	60	41	68.3
76	60	55	91.7
82	60	60	100

3.2. Akut Toksikite Testleri Sonucu Hesaplanan LC10, LC50, LC90, EC50 ve Teratojenik İndeks (TI) Değerleri

Embriyo testi sonunda 48 saatlik ortalama LC10, LC50, LC90 değerleri sırasıyla; **36.67 ppm, 76.52 ppm ve 116.37 ppm**, 96 saatlik ortalama LC10, LC50, LC90 değerleri ise sırasıyla; **24.07 ppm, 45.52 ppm ve 66.99 ppm** olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3) ve (Şekil 3.1).

96 saatlik denemeler sonunda embriyolar için hesaplanan ortalama EC50 değeri ise **27.63 ppm** olarak tespit edilmiş olup, her bir tekrar için belirlenmiş olan 96 saatlik LC50 değerlerinin 96 saatlik EC50 değerlerine oranlanması ile hesaplanan teratojenik indeks (TI) değeri **1.68** olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4).

96 saatlik larva testi sonunda Acetamiprid'in 48 saatlik ortalama LC10, LC50, LC90 değerleri sırasıyla; **66.84 ppm, 92.86 ppm, 120.08 ppm**, 96 saatlik saatlik ortalama LC10, LC50, LC90 değerleri ise **61.48 ppm, 68.76 ppm ve 76.05 ppm** olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 3.5). (Şekil 3.2).

Çizelge 3.3. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.

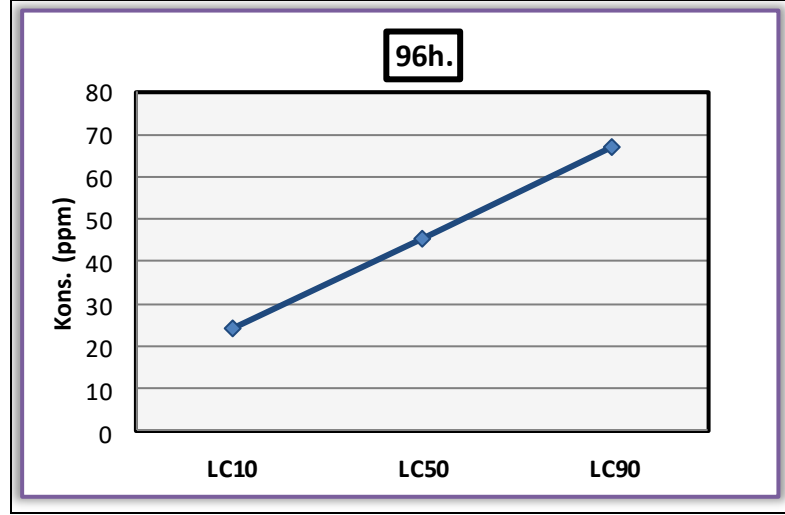
Embriyo testi	LC10 (ppm)	LC50 (ppm)	LC90 (ppm)
48h.	36.67 (6.76-46.98)	76.52 (66.84-103.86)	116.37 (94.39-193.27)
96h.	24.07 (-2.33-33.56)	45.52 (36.20-51.82)	66.99 (59.87-84.90)

Çizelge 3.4. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan EC50 ve TI değerleri.

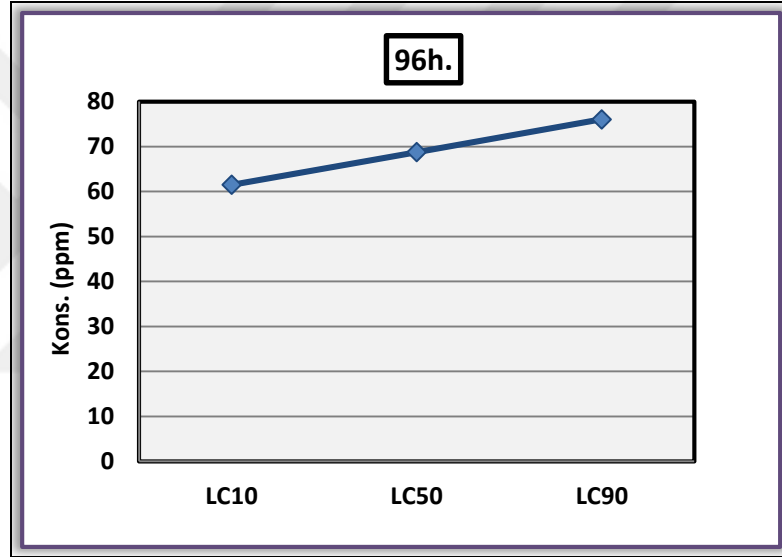
Embriyo Testi	EC50 (ppm)	TI
96h.	27.63 (17.38-35.14)	1.68

Çizelge 3.5. Akut larva testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri.

Larva Testi	LC10 (ppm)	LC50 (ppm)	LC90 (ppm)
48h.	66.84 (60.38-70.33)	92.86 (85.89-110.56)	120.08 (104.91-160.32)
96h.	61.48 (56.59-64.10)	68.76 (66.67-70.80)	76.05 (73.52-80.72)



Şekil 3.1. Akut embriyo testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri



Şekil 3.2. Akut larva testi sonucu hesaplanan LC10, LC50 ve LC90 değerleri

3.3. Denemeler Sonucu Hayatta Kalan Bireylerde Ölçülen Vücut Uzunlukları

Gerçekleştirilen akut ve kronik toksisite testlerinin sonunda hayatta kalan larvaların baş, kuyruk ile baş+kuyruk uzunlukları ölçülmüştür.

3.3.1. Akut Embriyo Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları

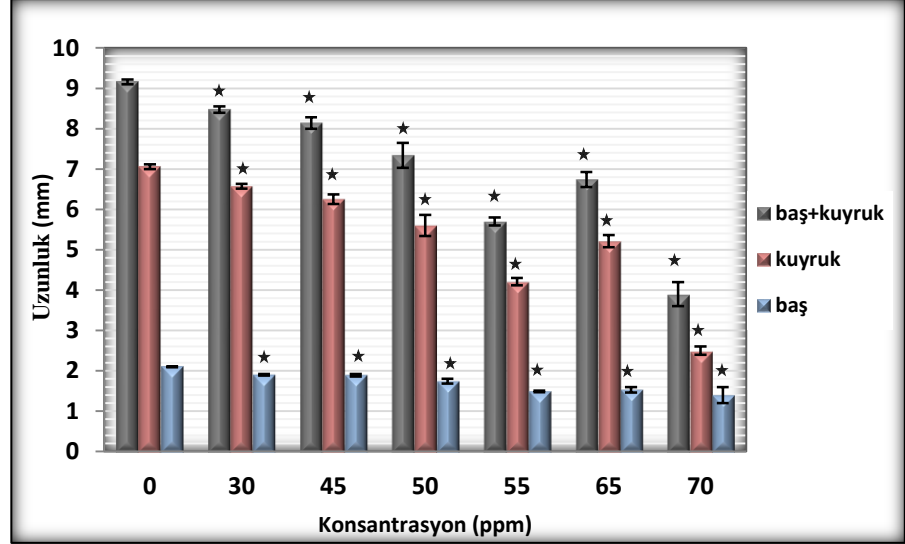
96 saatlik FETAX embriyo testi sonunda hayatta kalan 196 larvanın baş, kuyruk ve baş+kuyruk (total) uzunlukları ölçülmüştür. Çizelge 3.6'ya göre kontrol grubunda ortalama baş uzunluğunun 2.10 mm iken, en düşük uygulama konsantrasyonu olan 30 ppm'de 1.90 mm, en yüksek konsantrasyon olan 70 ppm'de ise 1.40 mm olduğu görülmektedir. Ortalama kuyruk uzunluğu; kontrol grubunda 7.06 mm, 30 ppm'de 6.57 mm, 70 ppm'de ise 2.50 mm olarak ölçülmüştür. Kontrol grubunda ortalama total uzunluk 9.16 mm iken, bu değer 30 ppm'de 8.47 mm, 70 ppm'de ise 3.90 mm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6 ve Şekil 3.3 incelendiğinde tüm uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak ortalama baş, kuyruk ve total uzunluklar açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0.05$).

Çizelge 3.6. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları

Kons. (ppm)	n	Ort. Baş uz. \pm SE (mm)	Ort. Kuyruk uz. \pm SE (mm)	Ort. Total uz. \pm SE (mm)
Kontrol	59	2.10 \pm 0.01	7.06 \pm 0.06	9.16 \pm 0.06
30	48	1.90 \pm 0.02*	6.57 \pm 0.06*	8.47 \pm 0.08*
45	38	1.89 \pm 0.03*	6.25 \pm 0.12*	8.14 \pm 0.14*
50	20	1.74 \pm 0.06*	5.60 \pm 0.26*	7.34 \pm 0.31*
55	17	1.49 \pm 0.02*	4.21 \pm 0.09*	5.70 \pm 0.10*
65	12	1.53 \pm 0.07*	5.21 \pm 0.15*	6.74 \pm 0.19*
70	2	1.40 \pm 0.20*	2.50 \pm 0.10*	3.90 \pm 0.30*

* = Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 3.3. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları ve S.E

3.3.2. Akut Larva Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları

96 saatlik larval toksiste testi sonunda hayatta kalan 225 larvanın baş, kuyruk ve baş+kuyruk (total) uzunlukları ölçülmüştür. Vücut uzunluklarına ait ortalama değerler Şekil 3.4 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Kontrol grubu larvalarına ait ortalama baş uzunluğu 3.57 mm iken, en düşük konsantrasyon olan 58 ppm’e maruz bırakılan larvalarda bu değer 3.18 mm, en yüksek konsantrasyon olan 76 ppm’de ise 2.66 mm olarak hesaplanmıştır. Ortalama kuyruk uzunluğu; kontrol grubu larvalarında 7.72 mm, 58 ppm’e maruz bırakılan larvalarda 5.98 mm, 76 ppm’de ise 5.80 mm olarak saptanmıştır.

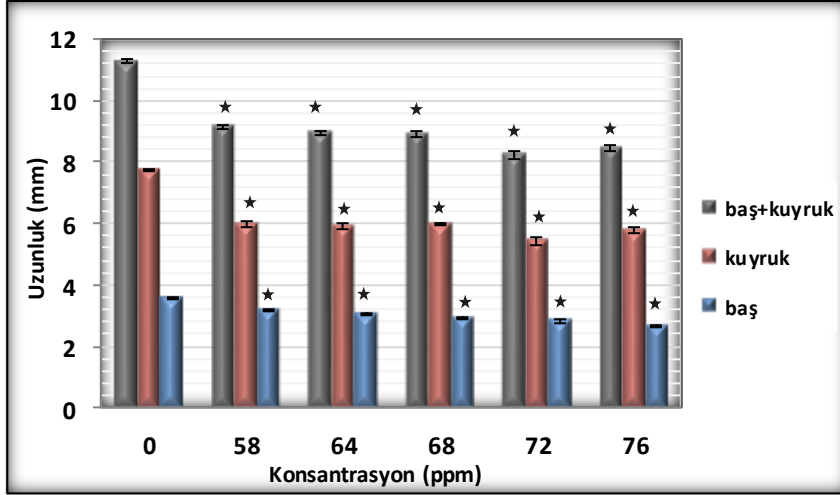
Kontrol grubu larvalarına ait ortalama total uzunluk 11.29 mm olarak hesaplanmış olup, bu değer en düşük uygulama konsantrasyonu olan 58 ppm’de 9.16 mm, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 76 ppm’de ise 8.46 mm dir.

Akut embriyo testine benzer şekilde; tüm uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak ortalama baş, kuyruk ve total uzunluklar açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir ($p < 0.05$) (Şekil 3.4 ve Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Akut larva testi sonucu hesaplanan ortalama vücut uzunlukları

Kons.(ppm)	n	Ort. Baş uz. ±SE (mm)	Ort. Kuyruk uz. ±SE (mm)	Ort. Total uz. ± SE (mm)
Kontrol	60	3.57±0.03	7.72±0.04	11.29±0.06
58	56	3.18±0.05*	5.98±0.07*	9.16±0.06*
64	48	3.06±0.03*	5.90±0.08*	8.96±0.07*
68	37	2.93±0.03*	5.98±0.06*	8.91±0.07*
72	19	2.83±0.05*	5.43±0.14*	8.26±0.13*
76	5	2.66±0.02*	5.80±0.10*	8.46±0.09*

* = Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05)



Şekil 3.4. Akut larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları ve S.E

3.3.3. Kronik Embriyo Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları

14 günlük kronik embriyo testi sonunda kontrol grubunda ortalama baş uzunluğu 3.98 mm olarak ölçülmüş olup, bu değer en düşük uygulama konsantrasyonu olan 0.1 ppm'de 3.97 mm, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 16 ppm'de ise 4.87 mm olarak belirlenmiştir.

Kuyruk uzunluğunun da kontrol grubu larvalarda ortalama 8.41 mm, 0.1 ppm'de 8.24 mm ve 16 ppm'de ise 8.96 mm olduğu saptanmıştır. Ortalama total

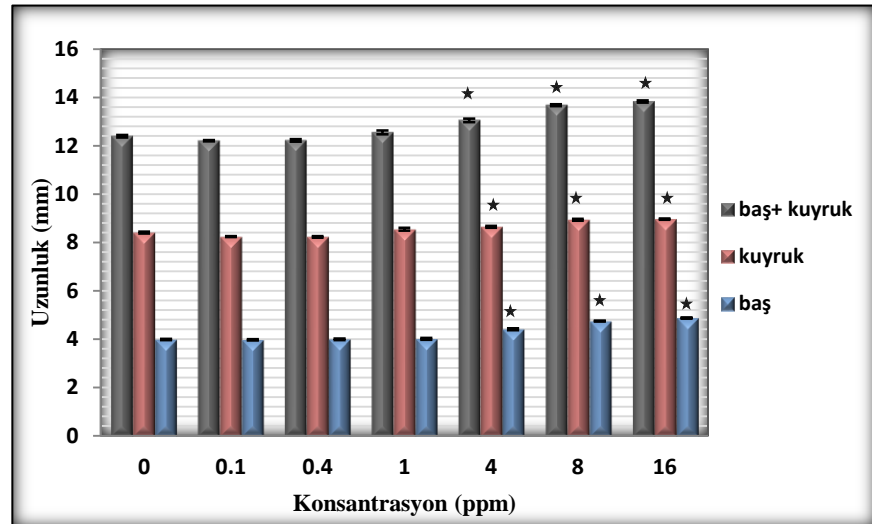
uzunluğun kontrol grubunda 12.39 mm, 0.1 ppm'de 12.21 mm, 16 ppm'de ise 13.83 mm olduğu görülmektedir (Şekil 3.5 ve Çizelge 3.8).

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sadece 4, 8 ve 16 ppm'lik yüksek konsantrasyon grubu bireylerin ortalama vücut uzunluklarında, kontrol grubu bireyelerinkine göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 3.8. Kronik embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları

Kons. (ppm)	n	Ort. Baş uz. ± SE (mm)	Ort. Kuyruk uz. ± SE (mm)	Ort. Total uz. ± SE (mm)
Kontrol	57	3.98±0.05	8.41±0.04	12.39±0.05
0.1	53	3.97±0.03	8.24±0.02	12.21±0.03
0.4	55	3.99±0.05	8.23±0.03	12.22±0.05
1	53	4.01±0.08	8.54±0.06	12.55±0.08
4	54	4.41±0.07*	8.64±0.04*	13.05±0.07*
8	54	4.74±0.04*	8.94±0.04*	13.68±0.04*
16	53	4.87±0.05*	8.96±0.03*	13.83±0.05*

*= Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$)



Şekil 3.5. Kronik embriyo testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları ve S.E

3.3.4. Kronik Larva Testi Sonunda Hayatta Kalan Bireylerin Vücut Uzunlukları

Deneme sonlandırılırken hayatta kalan larvaların baş, kuyruk, baş+kuyruk uzunlukları ölçülerek kaydedilmiştir.

Ortalama baş uzunluğu kontrol grubunda 4.52 mm iken, en düşük uygulama konsantrasyonu olan 1 ppm'de 4.40 mm, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 20 ppm'de ise 5.08 mm olarak hesaplanmıştır.

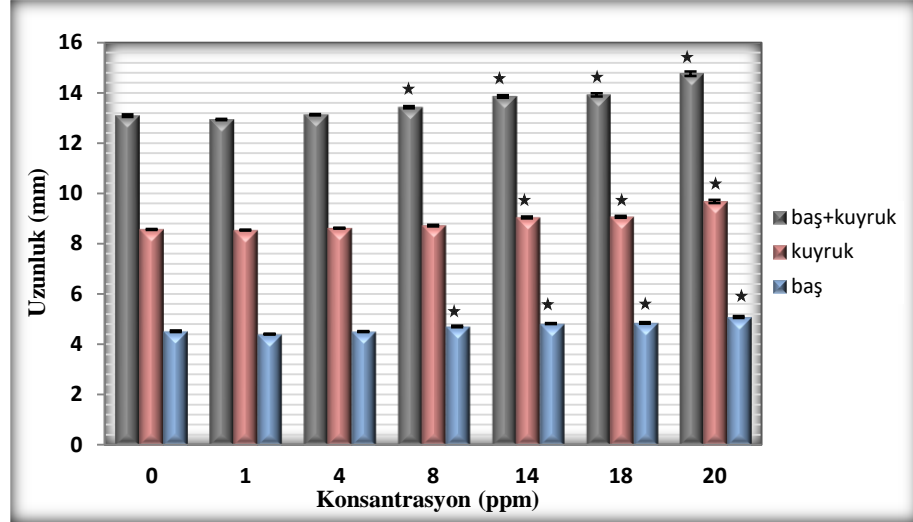
Ortalama kuyruk uzunlukları incelendiğinde kontrol grubu larvalarda bu değer 8.57 mm, 1 ppm'de 8.54 mm ve 20 ppm'de ise 9.68 mm dir. Kronik larva testi sonunda kontrol grubu bireylerin ortalama total uzunluğu 13.09 mm iken, bu değer 1 ppm'de 12.94 mm ve 20 ppm'de ise 14.76 mm olduğu saptanmıştır (Şekil 3.6 ve Çizelge 3.9).

İstatistiksel değerlendirmede 8, 14, 18 ve 20 ppm konsantrasyon grubu bireylerinin ortalama vücut uzunluklarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Çizelge 3.9. Kronik larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları

Konsantrasyon (ppm)	n	Ort. Baş uz. ± SE (mm)	Ort. Kuyruk uz. ± SE (mm)	Ort. Total uz. ± SE (mm)
0	58	4.52±0.03	8.57±0.02	13.09±0.05
1	54	4.40±0.02	8.54±0.02	12.94±0.03
4	53	4.51±0.02	8.62±0.02	13.13±0.03
8	55	4.71±0.03*	8.72±0.03	13.43±0.05*
14	54	4.82±0.02*	9.04±0.04*	13.86±0.05*
18	53	4.85±0.03*	9.07±0.04*	13.92±0.06*
20	52	5.08±0.04*	9.68±0.06*	14.76±0.09*

*= Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$)



Şekil 3.6. Kronik larva testi sonunda hesaplanan ortalama vücut uzunlukları ve S.E

3.4. Solüsyon pH'larının Karşılaştırılması

Gerçekleştirilen bütün denemeler için hazırlanan solüsyonların pH'ları ölçülerek ortalama pH değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arasında pH değeri açısından toksisiteyi etkileyecek düzeyde anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. (Çizelge 3.10, Çizelge 3.11, Çizelge 3.12, Çizelge 3.13).

Çizelge 3.10. Akut embriyo testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri

Konsantrasyon	Kont.	30 ppm	45 ppm	50 ppm	55 ppm	65 ppm	70 ppm	75 ppm
96 saatlik ort. pH değerleri	7.85	7.78	7.83	7.76	7.70	7.80	7.78	7.73

Çizelge 3.11. Akut larva testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri

Konsantrasyon	Kontrol	58 ppm	64ppm	68 ppm	72 ppm	76 ppm	82 ppm
96 saatlik ort. pH değerleri	7.85	7.80	7.78	7.76	7.74	7.80	7.78

Çizelge 3.12. Kronik embriyo testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri

Konsantrasyon	Kontrol	0.1 ppm	0.4 ppm	1 ppm	4 ppm	8 ppm	16 ppm
14 günlük ort. pH değeri	7.86	7.88	7.86	7.83	7.78	7.78	7.80

Çizelge 3.13. Kronik larva testinde kullanılan solüsyonların ortalama pH değerleri

Konsantrasyon	Kontrol	1 ppm	4 ppm	8 ppm	14 ppm	18 ppm	20 ppm
14 günlük ort. pH değeri	7.90	7.86	7.86	7.78	7.80	7.76	7.80

3.5. Acetamiprid'in Neden Olduğu Malformasyon Tipleri ve Oranları

Denemeler sonlandırılırken hayatta kalan larvalar stereo mikroskop altında incelenerek malforme larvalar fotoğraflanmıştır. Larvaların gösterdiği malformasyonlar anomali atlasına (Bantle et al., 1998) göre belirlenerek sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.14).

3.5.1. Akut Embriyo Testi Sonucu Gözlenen Anomaliler

96 saatlik embriyo testi sonucunda hayatta kalan bireylerden malformasyon gösterenler stereo mikroskop altında fotoğraflanarak malformasyon tipleri belirlenmiştir. Tek veya iki ayrı malformasyon gösteren bireyler tabloda ayrı ayrı belirtilmiştir, üç veya daha fazla sayıda malformasyonu aynı anda gösteren aşırı deforme bireyler ise çoklu malformasyon başlığı altında sınıflandırılmıştır (Şekil 3.8).

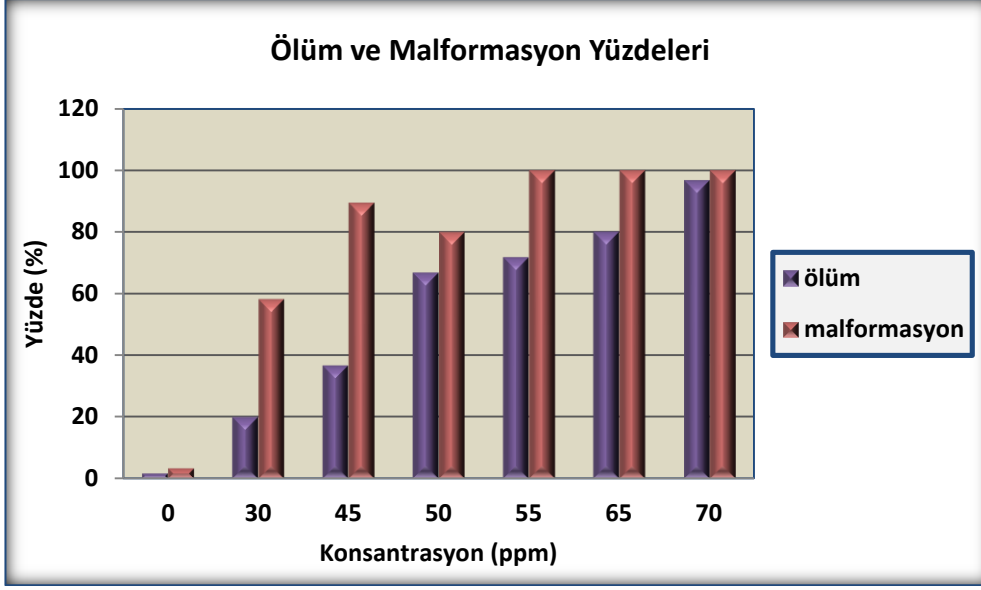
Akut embriyo testi sonunda kontrol grubu larvalarda % 3.39 oranında malformasyon gözlenirken, en düşük konsantrasyon grubunda malformasyon yüzdesi % 58.33, en yüksek üç konsantrasyon grubunda (55, 65 ve 70 ppm) ise % 100 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.14).

Uygulama gruplarında, ölüm oranlarında olduğu gibi, konsantrasyon artışına paralel olarak malformasyon yüzdesinin de bariz olarak arttığı görülmektedir (Şekil 3.7).

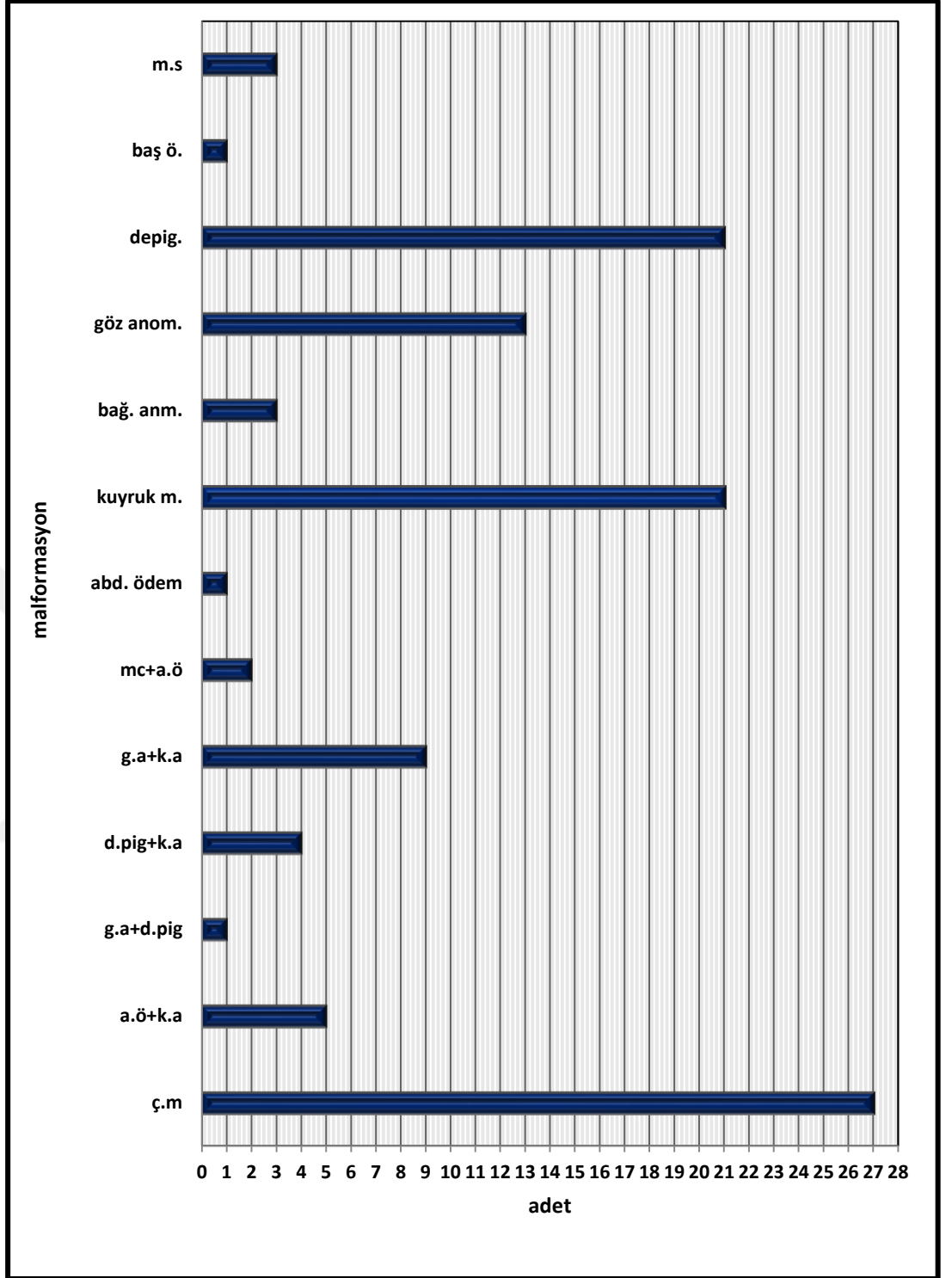
Çizelge 3.14. Akut embriyo testi sonucu gözlenen malformasyon tipleri ve yüzdeleri

	Kont.	30 ppm	45 ppm	50 ppm	55 ppm	65 ppm	70 ppm
n/m	59/2	48/28	38/34	20/16	17/17	12/12	2/2
Baş ödemi	-	-	1	-	-	-	-
Kuyruk malf.	2	8	7	1	2	1	-
Abdominal ödem	-	-	-	-	1	-	-
Gözde anomali	-	-	6	4	-	3	-
Mikrosefali	-	1	1	1	-	-	-
Mikrosefali+ Abd. ödem	-	-	2	-	-	-	-
D.pig.	-	13	1	4	2	1	-
Bağırsak anomalisi	-	-	-	2	-	1	-
Abd. ödem+kuyruk m.	-	1	1	-	2	1	-
D.pig+k.m	-	2	1	-	1	-	-
Gözde anomali+k.m.	-	1	7	-	-	1	-
D.pig+gözde anomali	-	1	-	-	-	-	-
Çoklu malformasyon gösterenler	-	1	7	4	9	4	2
Toplam malforme birey sayısı	2	28	34	16	17	12	2
Toplam malforme birey yüzdesi	% 3.39	% 58.33	% 89.47	% 80	% 100	% 100	% 100

D.pig.: depigmentasyon, **k. m.:** kuyruk malformasyonu, **Abd.ödem:** abdominal ödem

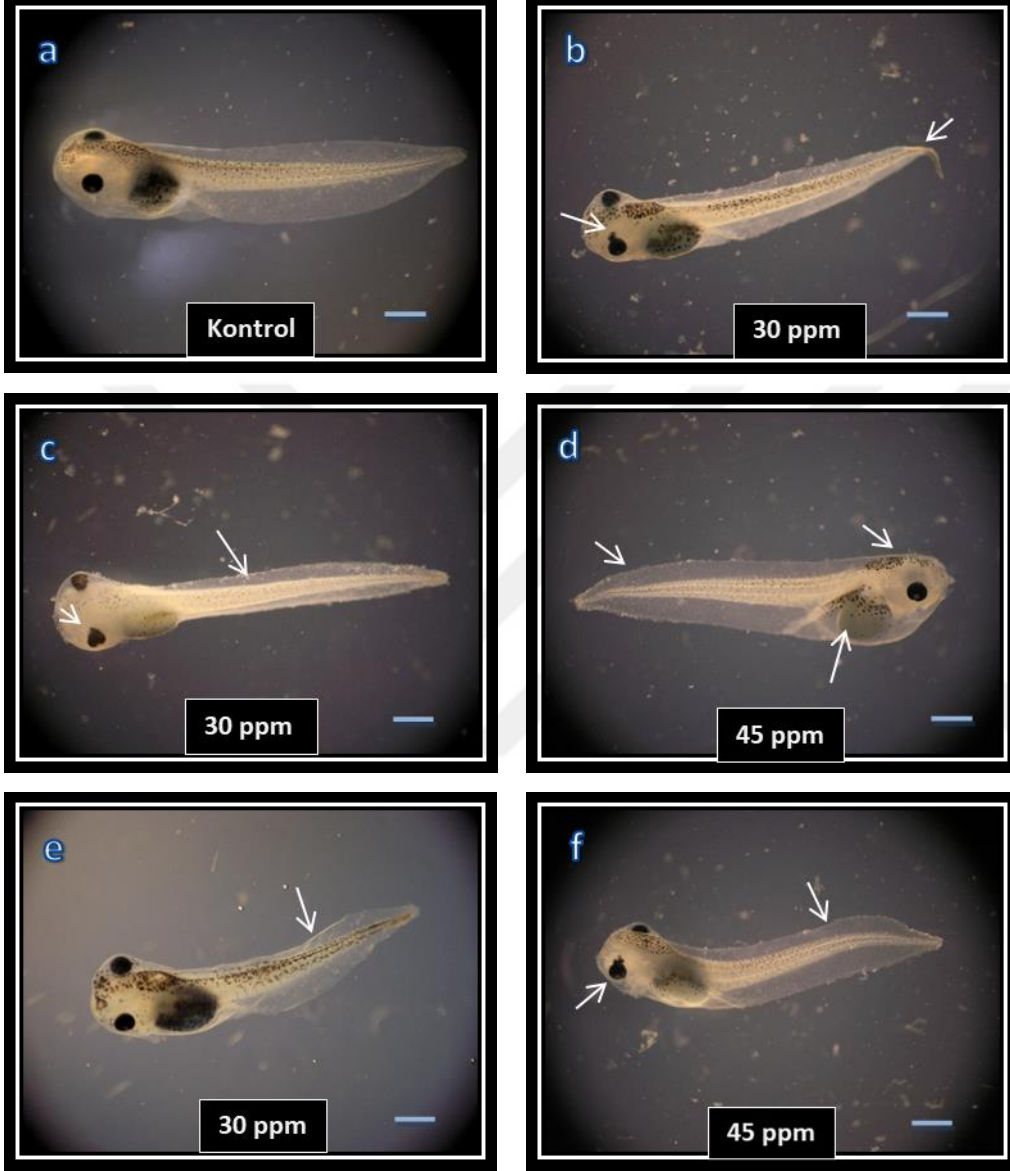


Şekil 3.7. Akut embriyo testi sonunda hesaplanan ölüm ve malformasyon yüzdeleri

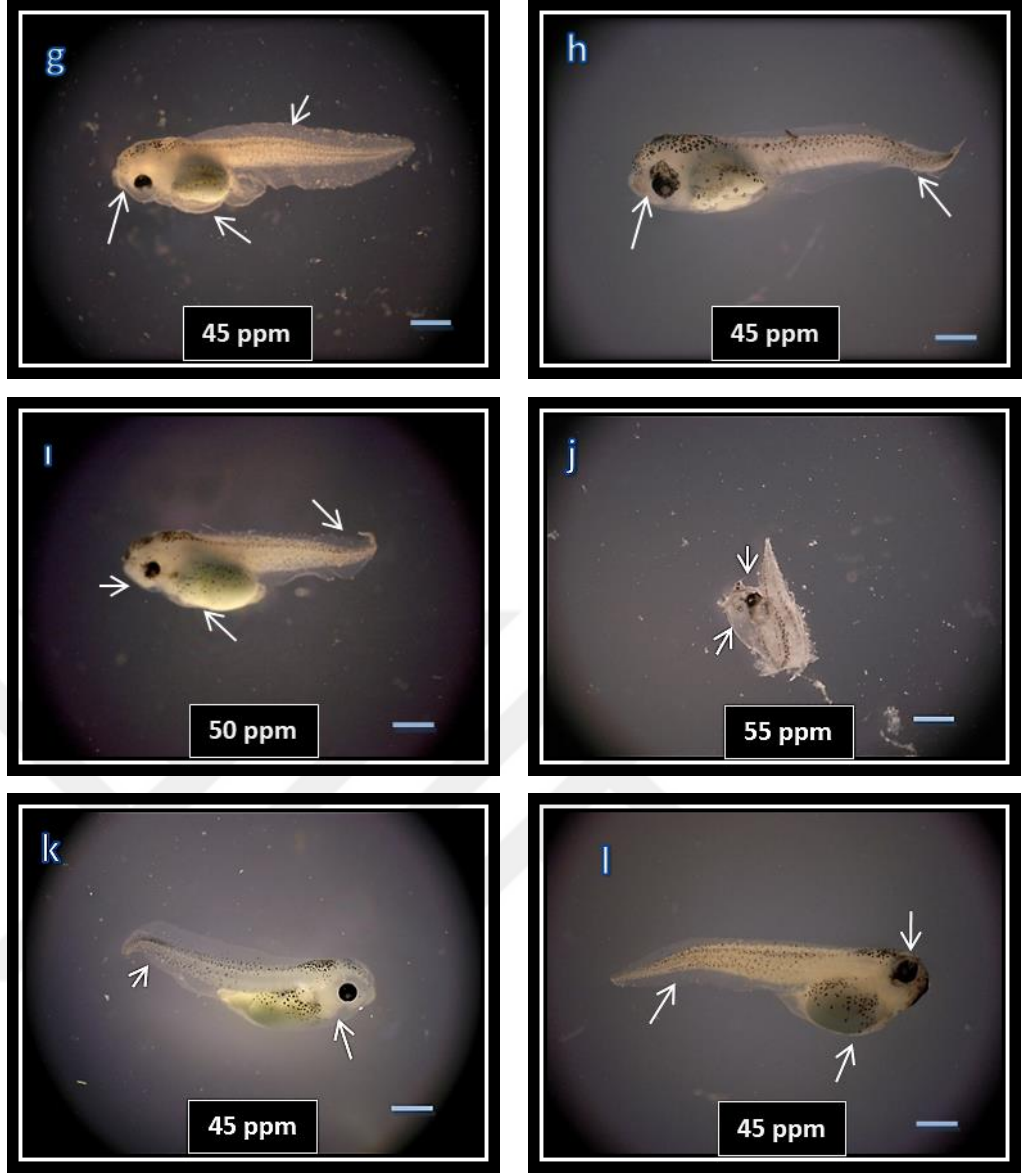


Şekil 3.8. Akut embriyo testi sonunda konsantrasyon gruplarına göre malformasyon tipi dağılımı
m.s: mikrosefali, **baş ö.:** baş ödemi, **depig.:** depigmentasyon, **g. a.:** gözde anomali, **bağ. anm.:** bağırsak anomalisi, **kuyruk m.:** kuyruk malformasyonu, **k.a.** kuyruk anomalisi, **a.ö.** abdominal ödem, **ç.m.** çoklu malformasyon

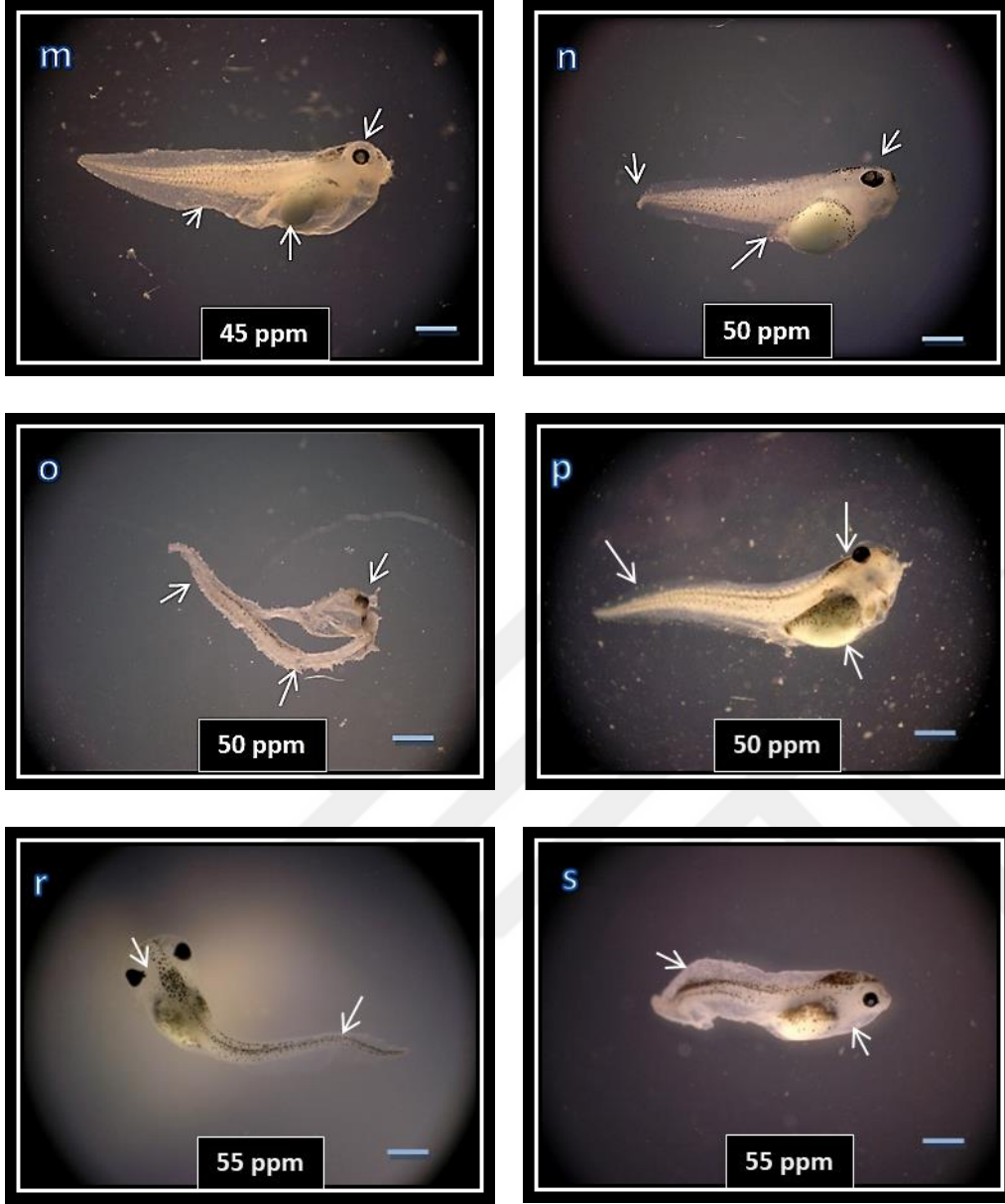
96 saatlik akut embriyo testi sonucu gözlenen malformasyonlardan bazılarını gösteren fotomikrograflar aşağıda verilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12).



Şekil 3.9. Acetaminiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar **a.** Kontrol **b.** Göz anomalisi, kuyruk eğriliği, **c.** Göz anomalisi, anormal pigmentasyon, **d.** Kuyruk eğriliği, bağırsak anomalisi, mikrosefali, **e.** Kuyruk eğriliği, **f.** Göz anomalisi, kuyruk eğriliği. **Bar** =1 mm



Şekil 3.10. Acetaminiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar **g.** Kuyruk eğriliği, ödemler, mikrosefali, bağırsak anomalisi, **h.** Göz anomalisi, anormal pig., kuyruk eğriliği, **i.** Kuyruk mlf., mikrosefali, bağırsak anomalisi, **j.** İleri derecede malformasyon, **k.** Kuyruk eğriliği, mikrosefali, bağırsak anomalisi **l.** Göz anomalisi, kuyruk eğriliği. **Bar** =1 mm



Şekil 3.11. Acetaminiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar **m.** Kuyruk eğriliği, mikrocefali, bağırsak anomalisi, ödem, **n.** Göz anomalisi, kuyruk malf., anormal pig., bağırsak anomalisi **o.** İleri derecede malformasyon, **p.** Kuyruk eğriliği,, mikrocefali, bağırsak anomalisi, **r.** Kuyruk eğriliği, göz anomalisi, **s.** Kuyruk malf., bağırsak anomalisi, mikrocefali, **Bar** =1 mm



Şekil 3.12. Acetaminiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz bırakılan embriyolarda gözlenen bazı malformasyonlar **t.** Kuyruk eğriliği, mikrosefali, ödemler, bağırsak anomalisi, anormal pig., **u.** Mikrosefali, kuyruk eğriliği, anormal pig., bağırsak anomalisi, **v.** İleri derecede malformasyon, **w.** İleri derecede malformasyon, **y.** Kuyruk eğriliği, bağırsak anomalisi, **z.** İleri derecede malformasyon, **Bar** =1 mm

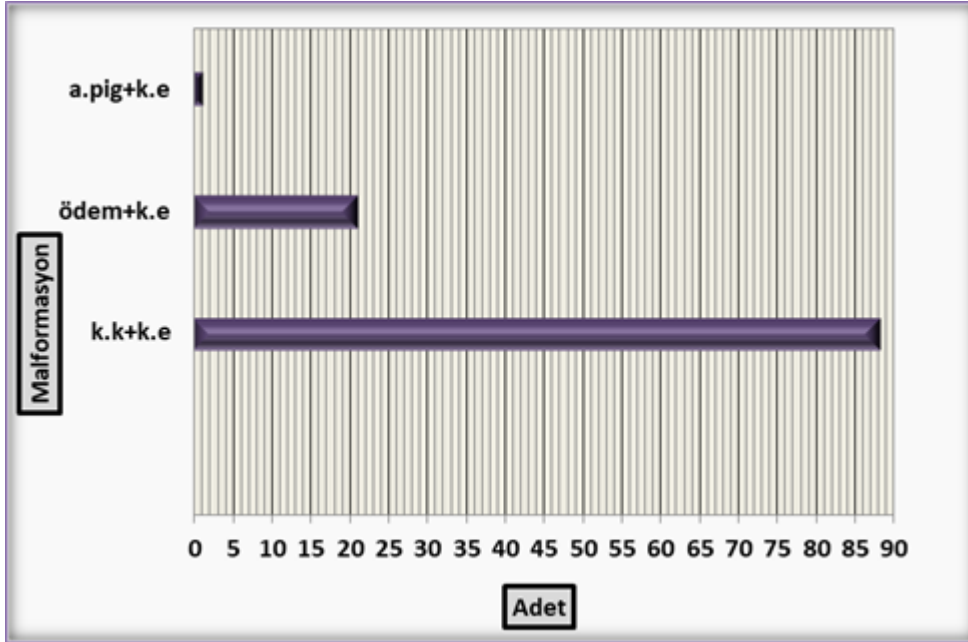
3.5.2. Akut Larva Testi Sonucu Gözlenen Anomaliler

96 saatlik larva testi sonunda hayatta kalan bireylerden anomali gösterenler stereo mikroskop altında fotoğraflanarak anomali tipleri ve oranları belirlenmiştir (Çizelge 3.15) ve (Şekil 3.13).

Çizelge 3.15. Akut larva testi sonucu gözlenen malformasyon tipleri ve yüzdeleri

	Kontrol	58 ppm	64 ppm	68 ppm	72 ppm	76 ppm
n/m	60/2	56/32	48/36	37/18	19/17	5/5
Kuyruk ucunda kırılma+kuyruk eğriliği	2	23	28	17	13	5
Ödem+kuyruk eğriliği	-	9	7	1	4	-
Anormal pig.+k.e	-	-	1	-	-	-
Toplam malforme birey sayısı	2	32	36	18	17	5
Malf. yüzdesi	%3.33	%57.14	%75	%48.65	%89.47	%100

Anormal pig.: anormal pigmentasyon, **k.e:** kuyruk eğriliği,



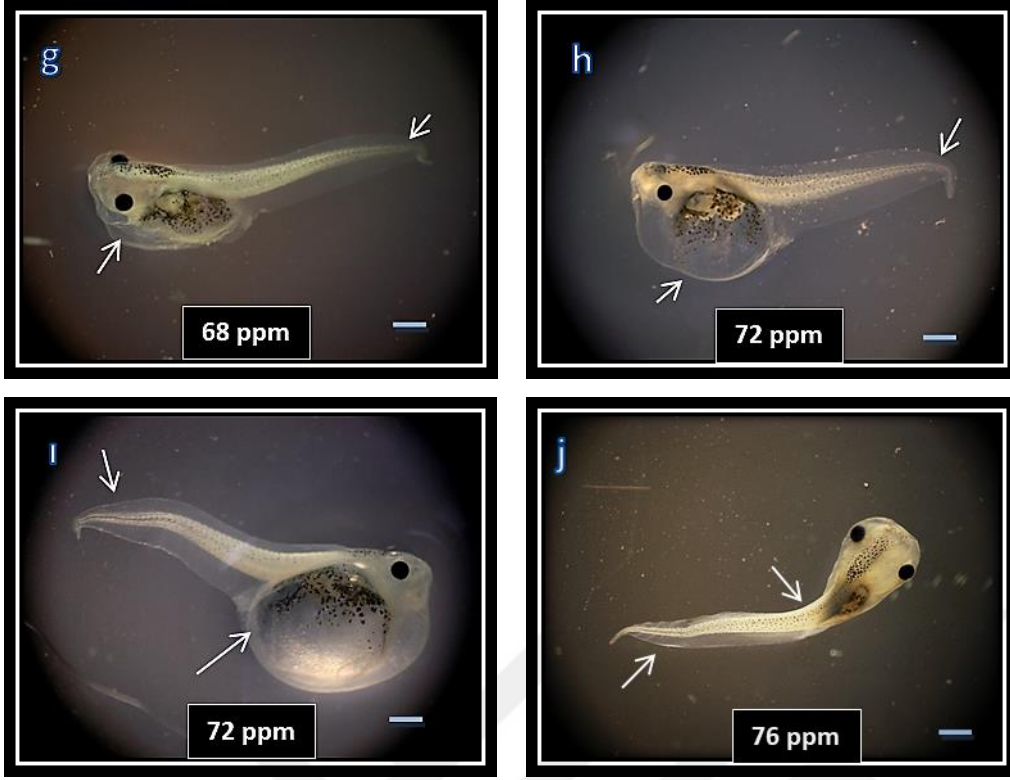
Şekil 3.13. Akut larva testi sonunda konsantrasyon gruplarına göre malformasyon tipi dağılımı

a.pig: anormal pigmentasyon, **k.e:** kuyruk eğriliği, **k.k:** kuyruk ucunda kırılma

96 saatlik akut larva testi sonucu gözlenen malformasyonlardan bazılarını gösteren fotomikrograflar aşağıda verilmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Acetamidrid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz kalan larvalarda gözlenen bazı anomaliler **a.** Kontrol, **b,c,d,f.** Kuyruk eğriliği+kuyruk ucunda kırılma, **e.** anormal pig.+k.e, **Bar** =1 mm



Şekil 3.15. Acetaminiprid'in farklı konsantrasyonlarına 96 saat maruz kalan larvalarda gözlenen bazı anomaliler **g,h,i.** Kuyruk eğriliği+ödem, **j.** Kuyruk eğriliği+kuyruk ucunda kırılma, **Bar** =1 mm

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaşamın var oluşundan itibaren canlılar ile yaşadıkları çevre arasında muazzam bir ekolojik denge söz konusudur ve yaşamın devamlılığı için ekosistemdeki bu doğal dengenin stabil tutulması büyük önem taşımaktadır. Doğadaki dengeyi sabit tutan döngüde her canlı grubunun çeşitli görevleri olmakla birlikte amfibiler son derece kritik bir basamakta yer almaktadır. Fakat son yıllarda dünya genelinde amfibi ölümlerindeki artış ve amfibi popülasyonundaki azalma dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır (Li et al., 2016; Wagner et al., 2017; Xu and Huang, 2017; Hrynyk et al., 2018). Amfibilerin, özellikle üreme dönemlerinde, sucul ortamdaki kirleticilerden etkilenme olasılıklarının yüksek olması bu konuya bilimsel açıdan yoğunlaşılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Sayım, 2008; Robinson et al., 2017; Wagner et al., 2017).

Neonikotinoidler son 30 yıldır dünya çapında giderek artan miktarda kullanılan bir insektisit grubudur. Neonikotinoid insektisitlerin suda çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle su kaynaklarına yüksek oranda karıştığı ve bu suretle suda yaşayan hedef dışı organizmalar için tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir (Beketov and Liess, 2008; Kocaman and Topaktaş, 2007). Amfibilerin üreme için sirkülasyon imkanı olmayan sığ ve durgun su birikintilerini tercih etmesi, özellikle embriyonik ve larval dönemde suya karışan pestisitlere yoğun ölçüde maruz kalmasına neden olmaktadır. Buna rağmen yeryüzündeki su kaynaklarına karşı oranı yüksek olan neonikotinoid insektisitlerin amfibiler üzerindeki toksik etkileri ile ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, FETAX toksisite test prosedürü kullanılarak, neonikotinoid bir insektisit olan Acetamiprid'in *Xenopus laevis* embriyo ve larvaları üzerindeki akut, kronik ve teratojenik etkileri ortaya konmuştur. Acetamiprid hedef seçici özelliği nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir tarım ilacı olup sulak alanlara ciddi oranlarda karışmaktadır. Acetamiprid'in hedef dışı organizmalar üzerindeki toksik etkileriyle ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Singh et al., 2012; Van Der Sluijs et al., 2013). Ayrıca EPA'nın bildirisine göre çevredeki kirletici maddelerin

sucul ekosistemdeki organizmalar üzerindeki etkilerinin araştırılması için amfibi larvaları gibi duyarlı organizmaların kullanılması önem taşımaktadır (EPA, 1996).

Önceki çalışmalar incelendiğinde, neonikotinoidler ile yapılan kronik toksisite testlerinin çok az olduğu, bu pestisitlerin genel olarak akut etkilerinin araştırıldığı belirlenmiştir. Neonikotinoid insektisitlerin bazı sucul organizmalar üzerindeki toksik etkileri üzerine yapılan çalışmalarla, farklı türler için birçok neonikotinoid insektisit LC50 değerleri tespit edilmiştir. Neonikotinoid grubu bir insektisit olan Thiakloprid'in gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) için LC50 değeri 30.5 mg/L bulunurken, aynı insektisit zebra balığı *Danio rerio* üzerindeki 96 saatlik LC50 değeri 19.7 mg/L olarak belirlenmiştir (Schmuck, 2001; Osterauer ve Köhler, 2008). Neonikotinoid insektisitler grubundan Clothianidin, Dinotefuran, Thiamethoxam'ın *Lepomis macrochirus* türü üzerindeki 96 saatlik LC50 değerleri sırasıyla; 117 mg/L, >99.3 mg/L, >114 mg/L olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki 96 saatlik LC50 değerleri, Clothianidin için 105 mg/L, Dinotefuran için > 99.5 mg/L / ve Thiamethoxam için >100 mg/L olarak bulunmuştur (Barbee and Stout, 2009). 2004 yılında yapılan bir çalışmaya göre yine neonikotinoid bir insektisit olan Imidacloprid'in *Rana nigromaculata* üzerindeki 96 saatlik LC50 değeri 129 mg/L, *Rana limnocharis* üzerindeki 96 saatlik LC50 değeri ise 82 mg/L olarak tespit edilmiştir (Feng et al., 2004).

LC50 değeri türlere göre ve hatta aynı türün farklı gelişim evrelerine göre farklılık gösterebilmektedir. 1990 yılında yapılan bir çalışmada Lindane'nin *Rana temporaria* larvaları için 48 saatlik LC50 değerinin 5.88 mg/L, tatlı su balığı *Gambusia affinis* için ise aynı değer 0.10 mg/L olduğu belirlenerek *Gambusia affinis* türünün bu insektisite karşı daha hassas olduğu belirtilmiştir (Thybaud, 1990). Malathion'un bir amfibi türü olan *Rana ridibunda* üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise %25'lik Malathion preparatının 21. evre *R. ridibunda* larvaları üzerindeki 96 saatlik LC50 değeri 28.84 ppm olarak hesaplanırken aynı türün 25. evre larvaları üzerindeki LC50 değeri 18.60 ppm olarak hesaplanmıştır (Sayım, 1998).

Bu çalışmada Acetamiprid'in 96 saatlik LC50 değeri *X. laevis* embriyo ve larvaları için sırasıyla 45.52 ve 68.76 ppm olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bakıldığında; Acetamiprid'in 46. evre *X. laevis* larvalar için hesaplanan LC50 değerinin, embriyolar için hesaplanan değerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum *X. laevis* embriyolarının Acetamiprid'e karşı 46. evre larvalarına nazaran daha hassas olduğunu göstermektedir. Amfibilerin embriyonik dönemde toksik maddelere karşı daha hassas olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. *X. laevis* türünün 8. evredeki embriyolarının Nano-TiO₂'ye karşı aynı türün 46. evre larvalarına göre daha hassas olduğu bildirilmiştir. Çalışmada; 80 ppm Nano-TiO₂'nin embriyolarda % 12.5, larvalarda ise % 6.25 oranında ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Birhanlı et al., 2014). Benzer şekilde; *B. arenarum* embriyolarının (blastula safhası), larvalarına göre Fenol'ün toksik etkilerine karşı çok daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Paisio et al., 2009). Bir başka çalışmada *Rhinella arenarum* (Anura; Bufonidae) türünün blastula safhasındaki embriyoları ve 25. evre larvaları üzerinde Epichlorohydrin maddesinin 72 saatlik LC50 değerleri hesaplanmış ve Epichlorohydrin'e karşı *R. arenarum* embriyolarının, larvalarından daha hassas olduğu belirtilmiştir (Hutler et al., 2013). Bir amfibi türü olan *Bombina bombina* embriyo ve larvaları kullanılarak Trifluralin toksisitesinin tesbiti amacıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada da; embriyolar ve larvalar için hesaplanan 120 saatlik LC50 değeri sırasıyla, 9.40 ve 11.80 ppm olarak belirlenmiş ve türün embriyolarının larvalarına oranla Trifluralin'e karşı daha hassas olduğu belirtilmiştir (Sayım, 2010). Benzeri daha birçok çalışmada karşılaşılan, embriyonik dönemdeki hassasiyetin bu dönemde oluşumsal aktifliğin ve hücre farklılaşmasının yüksek düzeyde olmasıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir (Pérez-Coll and Herkovits, 2004).

Bu çalışmada; embriyo ve larvalar kullanılarak yapılan akut toksisite testlerinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışına paralel olarak uygulama grubu bireylerin vücut uzunluklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edilmiştir. Ayrıca embriyo testleri sonunda tüm kontrol grubu larvalar 46. gelişim evresine ulaşmasına rağmen Acetamiprid uygulanan bireylerin 46. evreye ulaşamayıp daha erken gelişim evrelerinde kaldıkları belirlenmiştir. Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde; Acetamiprid'in *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerinde büyümeyi ve gelişimi inhibe edici bir etki gösterdiği

söylenbilir. Benzer şekilde, *X. laevis* embriyoları kullanılarak yapılan bir başka araştırmada Allyl isothiocyante uygulaması sonucu larvaların vücut uzunluklarında önemli derecede azalma tesbit edilmiştir. Allyl isothiocyante konsantrasyonu arttıkça larvaların vücut uzunluklarının orantılı olarak azalma gösterdiği; buna bağlı olarak Allyl isothiocyante maddesinin *X. laevis* embriyoları üzerinde büyümeyi yavaşlatıcı bir etkiye yol açtığı belirtilmiştir (Williams et al., 2015).

Bu çalışmada Acetamiprid'in teratojenik indeks (TI) değeri 1.68 hesaplanmış olup, Acetamiprid'in *X. laevis* embriyoları üzerinde önemli derecede teratojenik ekiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. ASTM (1998)'e göre bir maddenin teratojenik indeks (TI) değerinin 1.50 ve üzerinde olması o maddenin teratojenik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Gibberellik asit'in *X. laevis* embriyoları üzerindeki teratojenik indeks değeri (TI) 1.69 olarak hesaplanmış ve Gibberellik asit'in *X. laevis* embriyoları üzerinde toksik ve teratojenik etkisi bulunduğu belirtilmiştir (Boğa et al., 2009). Genel olarak teratojenik etkili maddelerin amfibiler üzerinde malformasyonlara neden olduğu bilinmektedir (Gardner et al., 2016; Parker and Rayburn, 2017).

Bu çalışmada; embriyo ve larvalar kullanılarak yapılan akut toksisite testi sonunda Acetamiprid'in farkı konsantrasyonlarına maruz kalan bireylerde değişen oranlarda çeşitli malformasyonlar ortaya çıktığı gözlenmiştir. Stereo mikroskop altında tesbit edilen bu malformasyonlar; kuyruk malformasyonları, ödemler, göz anomalileri, mikrosefali, depigmentasyon (anormal pigmentasyon), anormal bağırsak gelişimleri şeklindedir. Konsantrasyon artışıyla birlikte malformasyon oranında ve şiddetinde ciddi oranda bir artış görülmektedir.

Larval toksisite testi sonucunda görülen malformasyon çeşidi ve şiddeti embriyo testine göre daha az olmuştur. Bu durum *X. laevis* larvalarının embriyolarına göre Acetamiprid'den etkilenme oranının daha düşük olduğu bulgumuzu doğrular niteliktedir.

Larva testinde Acetamiprid'in neden olduğu malformasyonlar görülme sıklığına göre; kuyruk eğriliği+kırık kuyruk, kuyruk eğriliği+ödem ve anormal pigmentasyon şeklindedir.

Tüm deneme dikkate alındığında kuyruk malformasyonları ve depigmentasyon en fazla görülen malformasyon tipi olarak dikkat çekmiştir. Hayatta kalan larvalardan % 10.71'inde bu iki tip malformasyona rastlanmıştır. Larvalarda % 6.63 oranında ise göz anomalisi tespit edilmiş olup bu anomaliler çoğunlukla bir ya da iki gözün birden gelişmemesi, göz yuvarlağının tamamlanmaması ya da göz yuvarlağı biçiminde bozukluklar; örneğin oval biçimli göz yuvarlağı ve göz yuvarlağının etrafında lekeler olarak gözlenmiştir. Hayatta kalan larvalarda çoklu malformasyon oranı % 13.78 olarak belirlenmiştir. Çoklu malformasyon gösteren bireylerde ileri derecede şekil bozuklukları, bazı bireylerde kuyruk gelişiminin olmaması gibi şiddetli anomalilerin yanı sıra mikrosefali, göz anomalisi, kuyruk anomalileri ve ödem gibi bozukluklar birlikte görülmüştür. Özellikle mikrosefali anomalisi çoklu malformasyon gösteren tüm larvalarda görülmüş olup bu malformasyonun uygulanan maddenin sinir sisteminde bir gelişim geriliğine yol açması sonucu ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Bu oluşum amfibilerle yapılan toksisite testlerinde sıklıkla karşılaşılan bir durum olarak bilinmektedir (Hauptman et al., 1993; Pekmezemek, 2004).

Amfibiler ile yapılan toksisite testlerinde bu çalışmada karşılaşılan yukarıda sözü geçen anomalilerin görülme sıklığı oldukça fazladır. *Xenopus laevis* embriyolarına Glyphosate uygulaması sonucu gözlenen teratojenik etkilerin araştırıldığı bir çalışmada da çalışmamızdakine benzer şekilde konsantrasyon artışı ile paralel olarak malformasyon oranında artış tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada gözlenen bazı malformasyonlar da çalışmamızda karşılaştığımız malformasyonlardan olan, ödem, göz anomalileri, anormal bağırsak kıvrımlanmaları, mikrosefali şeklinde belirtilmiştir (Bonfanti et al., 2018). Bir başka çalışmada Triphenyltin'in *Xenopus tropicalis* embriyoları üzerinde teratojenik etkiler gösterdiği ve larvalarda kuyruk eğriliği, göz anomalileri, anormal pigmentasyon gibi malformasyonlara neden olduğu belirtilmiştir (Yu et al., 2011). *Bufo arenarum* embriyoları üzerinde teratojenik etki gösterdiği

belirlenen Fenol'ün de larvalarda ödem, anormal pigmentasyon ve göz anomalileri gibi benzer malformasyonlara sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Paisio et al., 2009). Tarım alanlarında sık kullanılan bir herbisit olan Trifluralin'e maruz bırakılan *Bombina bombina* embriyo ve larvalarında da ödem, kuyruk eğriliği, anormal barsak kıvrımlanması gibi birçok morfolojik anomali gözlenmiştir (Sayım, 2010). Gibberellik asit'in *X. laevis* embriyoları üzerinde oluşturduğu malformasyonlar arasında konsantrasyon artışına bağlı olarak artış gösteren; mikrosefali, kuyruk malformasyonları, ödem, bağırsak anomalisi ve göz anomalileri sayılmıştır (Boğa et al., 2009). Bu bulgular çalışmamızdaki bulgularla benzerlik göstermektedir.

Ayrıca 45 ppm ve üstündeki konsantrasyonlara maruz kalan larvalarda ters yüzme, dönerek yüzme, suyun üstünde hareketsiz ve ters olarak durma gibi davranış bozuklukları göze çarpmaktadır. Bu davranış değişiklikleri Acetamiprid'in nörotoksik etkilere yol açtığını düşündürmektedir. Neonikotinoid insektisitlerin etki mekanizmasının sinir sistemi üzerine olması da çalışmamızda gözlenen nörotoksik bulguları açıklamaktadır.

Ekosistemde canlıların zararlı maddelerin yüksek dozlarına kısa süreli maruziyeti nadir olarak rastlanan bir durumdur. Doğal döngü içerisinde organizmaların xenobiyotiklerin nispeten düşük dozlarına uzun müddet maruz kaldığı bilinmektedir. Bu bağlamda zararlı maddelerin ekosistemdeki etkilerini belirleyebilmek amacı söz konusu olduğunda kronik toksisite testlerinin değeri ortaya çıkmaktadır. Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada Acetamiprid'in *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerindeki uzun süreli etkileri de araştırılmıştır.

Kronik denemelerin gerçekleştirildiği 14 günlük sürenin sonunda hem embriyo testinde hem de larva testinde kontrol grubu ve uygulama gruplarının ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca bu denemelerde uygulama grubu bireylerde herhangi bir anomali de tesbit edilmemiştir.

Blastula safhasındaki embriyolar ve 46. evredeki larvalar kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde; Acetamiprid'in düşük konsantrasyonlarda uzun

sürel maruziyetinin *X. laevis* embriyo ve larvalarının büyümesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığı aksine büyümeyi indüklediği belirlenmiştir. Bu durum Acetamiprid'in düşük konsantrasyonlarda *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerinde hormetik etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Hormetik etki özellikle pestisitlerle yapılan toksisite çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Hormesis bir maddenin yüksek konsantrasyonlarının büyümeyi inhibe eden etkisine karşın düşük konsantrasyonlarının büyüme üzerinde olumlu etki göstermesi şeklinde açıklanan bir doz-cevap ilişkisi olarak bilinmektedir. Toksik maddelerin yaşam üzerinde hem destekleyici hem de yok edici iki zıt etkiye sahip olması ilgi çekici bir durum olmakla birlikte özellikle son dönemlerde sıklıkla araştırma konularına dahil edilmeye başlanmıştır. Hormesis mekanizmasının toksik bir maddenin düşük dozları ile karşılaşıldığında aktifleşerek canlıya adaptif bir özellik kazandırdığı ve bu adaptif cevabın bazı özel koruyucu proteinler ve antioksidan enzimler tarafından sağlandığı bilinmektedir. Hormetik cevap yaşamın devamlılığını sağlamak amaçlı gelişmiş bir mekanizmadır ve hücredeki çoğalma/büyüme faktörlerinin sentezinin artırılmasını sağlamaktadır. Mekanizma bu şekilde düşük dozlardaki stres faktörlerinin varlığında canlının hayatta kalmasını desteklemektedir (Kısım ve Uzunoğlu, 2012).

Gelişimsel süreçteki epigenetik adaptasyonun temelini stresle oluşan hormetik cevaba ait mekanizmalar tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Örneğin ağır fiziksel hareketlerin hücreyi yapısal ve fonksiyonel olarak tehdit eden reaktif oksijen ve azot türevlerinin üretiminde artışa yol açmasına rağmen; hafif düzeyde yapılan fiziksel hareketlerin, vücut için yararlı olduğu ve hastalıklardan koruduğu bilinmektedir. Ayrıca hormetik cevabın epigenetik hafızanın oluşumunda rol oynadığı da bilinmektedir. Bitkilerde daha önceden kazanılmış olan ve hücre bölünmesi ile kalıtılan stres hafızasının, stres durumlarında devreye girerek epigenetik hafızayı tetiklediği ve bitkilerin ileride karşılaşılabilecekleri stres durumlarıyla baş etmelerini sağladığı tespit edilmiştir (Marchant, 2008; Kısım ve Uzunoğlu, 2012).

Hormetik etkinin ilk bakışta olumlu bir özellik gibi görülmesine rağmen canlılar için olumsuz bazı durumlara yol açabileceği de belirtilmiştir. Düşük doz stimülasyonunun hücre proliferasyonuna neden olarak prostat gibi organlarda

büyümeye, aynı yolla gözde retina ayrılmalarına ve bazı zararlı mikroorganizmaların çoğalmasına yol açtığı bilinmektedir (Randall et al., 1947; Garrod, 1951; Chueh et al., 2001; Wu et al., 2002; Calabrese, 2010).

Birçok maddenin düşük konsantrasyonlarının çeşitli canlılar üzerinde hormetik etki gösterdiğini kanıtlayan çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızı destekler şekilde ZnO ve CuO nanopartiküllerinin düşük konsantrasyonlarda *X. laevis* larvalarının gelişim ve metamorfozu üzerinde pozitif yönde bir etkiye yol açtığı, uygulama konsantrasyonlarında yapılan vücut ölçümlerinin kontrol grubuna oranla artış gösterdiği, bu durumun muhtemelen hormetik etkiden kaynaklandığı belirtilmiştir (Nations et al., 2010; Nations et al., 2011). Nif çayından alınan su ve sediment örneklerinin *Daphnia magna* türü üzerindeki etkilerini gözlemlemek için yapılan bir çalışmada canlıda üreme artışına neden olan konsantrasyonların hormetik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Parlak et al., 2010). Mevcut çalışmada da kullanılmış olan Acetamiprid'in *Rana temporaria* türü üzerindeki etkisini incelemek üzere gerçekleştirilen bir çalışmaya göre; Acetamiprid'in yüksek konsantrasyonlarının büyümeyi yavaşlatan bir özellik göstermesine rağmen düşük konsantrasyonlarda larvaların büyümesi üzerinde olumlu bir etki göstererek, hızlı büyümeyi indüklediği ve bu konsantrasyonlarda tutulan larvaların kontrol grubuna oranla vücut uzunluklarının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonların sebep olduğu hızlı büyümenin hormesis olayı ile açıklanabileceği belirtilmiştir (Tegowska et al., 2004). Aynı çalışmada büyümedeki bu pozitif etkinin Acetamiprid'in tiroid bezi fonksiyonunda meydana getirdiği bazı değişiklikler nedeniyle olabileceği açıklanmıştır. Amfibilerde tiroksin hormonunun büyüme ve metamorfoz üzerinde önemli rolü olduğu bilinmektedir (Tegowska et al., 2004). Yine bir amfibi türü olan *Hypsiboas pulchellus* larvalarının Cr (VI) ile kronik maruziyeti sonucu larvaların büyüme oranında artış meydana geldiği ve bu durumun hormesis ile bağlantılı olabileceği rapor edilmiştir (Natale et al., 2006). 2017 yılında kurşunun (Pb^{2+}) *Bufo gargarizans* embriyoları üzerindeki olumsuz etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada ise kurşunun yüksek konsantrasyonlarda büyüme ve gelişimi geciktirici etki gösterirken düşük konsantrasyonlarının büyüme ve gelişmeyi arttırıcı etkiye yol açtığı bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlara maruz bırakılan larvaların ölçülen vücut uzunluklarının kontrol grubuna oranla artış göstermesinin olası bir

hormetik etkiden kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir (Chai et al., 2017). Bu sonuçlar mevcut çalışmadaki bulguları destekler niteliktedir. Ayrıca neonikotinoid insektisitlerden biri olan Imidacloprid'in yaprak biti *Aphis glycines* türü üzerinde yüksek konsantrasyonlarda üremeyi azaltıcı, düşük konsantrasyonlarda ise üremeyi arttırıcı etki gösterdiği belirlenmiş ve bu durum Imidacloprid'in hormetik etkisi olarak tanımlanmıştır (Qu et al., 2015).

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, neonikotinoid bir insektisit olan Acetamiprid'in *X. laevis* embriyo ve larvaları üzerinde yüksek konsantrasyonlarda toksik ve teratojenik etkileri olduğu fakat bu pestisitinin düşük konsantrasyonlarının aynı canlıda hormetik adaptasyonu tetikleyerek büyüme üzerinde uyarıcı bir etki gösterdiği saptanmıştır. Çalışma aynı maddenin farklı konsantrasyonlarda değişik etkilerini göstermesi nedeniyle çevresel toksikoloji açısından önem arz etmektedir.

Bu sonuçlar bağlamında Acetamiprid etken maddeli ilaçların kullanımının kontrole tabi tutulması ve bu ilaçların kullanımına belli bazı sınırlandırmaların getirilmesi ekosistem sağlığı açısından tavsiye edilebilir niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anderson, T.A., Salice, C.J., Erickson, R.A., McMurray, S.T., Cox, S.B. and Smith, L.M.**, 2013, Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains, *Chemosphere*, 92:84–90pp.
- Andersson, H., Tago, D. and Treich, N.**, 2014, Pesticides and health, A review of evidence on health effects, valuation of risks and benefit-cost analysis, *Advances in Health Services Research*, 1-61.
- Anwar K.**, 2003, Toxicological effect of single treatment of permethrin injected into the eggs on '0' day incubation on the liver of newly hatched chick, *Online J. Biol. Sci.*, 3:660-673.
- Arome, D. and Chinedu, E.**, 2013, The importance of toxicity testing, *J. Pharm. BioSci.*, 4:146-148.
- Arslan, H.**, 2015, Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Yüzme Performansı, Biyokimyasal, Hematolojik, Histopatolojik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, 100s.
- ASTM (American Society for Testing and Materials)**, 1998, Standard guide for conducting the frog embryo teragonesis assay-Xenopus (FETAX), E1439-98. Philadelphia, PA.
- Atamanalp, M. ve Yanık, T.**, 2001, Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4):555-563 pp.
- Baltacı-Yiğit, H.M.**, 2015, Ozonla pestisit giderimi uygulamasının domateste renk ve C vitaminine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 50s.
- Bantle, J.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Linder, G. and Fort, D.J.**, 1998, *Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX*, 2nd ed., Oklahoma State University, Stillwater, OK.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barbee, G.C. and Stout, M.J.**, 2009, [Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish \(*Procambarus clarkii*\) associated with rice–crayfish crop rotations, *Pest Manag. Sci.*, 65: 1250-1256.](#)
- Baştürk, Ö., Doğan, M., Salihoğlu, İ. and Balkaş, T.**, 1980, DDT, DDE, and PCB residues in fish, crustaceans and sediments from the eastern Mediterranean coast of Turkey, *Marine Pollution Bulletin*, 11(7):191-195pp.
- Beketov, M. and Liess, M.**, 2008, Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 55: 247-253pp.
- Bioninja**, ‘‘Neurotransmitters’’ <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-6-human-physiology/65-neurons-and-synapses/neurotransmitters.html>, (Erişim tarihi: 20 Nisan 2017).
- Birhanlı, A.**, 2003, Bazı Tekstil Boyar Maddelerinin *Xenopus laevis* Üzerinde Toksik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, 111s.
- Birhanlı, A., Emre, F.B., Sayılkan, F. and Güngördü, A.**, 2014, Effect of nanosized TiO₂ particles on the development of *Xenopus laevis* embryos, *Turk. J. Biol.*, 38: 283-288pp.
- Boğa A.**, 1996, Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Etkisini Değerlendirmede FETAX Testinin Değeri, Master Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 83s.
- Boğa, A., Binokay, S. and Sertdemir, Y.**, 2009, The toxicity and teratogenicity of gibberellic acid (GA3) based on the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), *Turk. J. Biol.*, 33: 181-188pp.
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P. and Colombo, A.**, 2018, Glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*, *Aquatic Toxicology*, 195: 103-113pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bonmatin, J-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N. and Tapparo, A., 2015, *Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil*, Environ. Sci. Pollut. Res., 22:35–67pp.**
- Bosch, B., Manas, F., Gorla, N. and Aiassa, D., 2011, Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring, Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 3(6):155-163pp.**
- Bouhafs, N., Berrebbah, H., Devaux, A., Rouabhi, R. and Djebbar, M.R., 2009, Micronucleus induction in erythrocytes of tadpole *Rana saharica* (Green Frog of North Africa) exposed to Artea 330EC, American-Eurasian Journal of Toxicologic Sciences, 1(1):07-12pp.**
- Brunet, J-L., Badiou, A. and Belzunces, L.P., 2005, In Vivo Metabolic Fate of [14 C]-acetamiprid in Six Biological Compartments of the Honeybee, *Apis mellifera L.*, Pest Management Science, 61:742-748pp.**
- Calabrese, E.J., 2010, Hormesis: Once Marginalized, Evidence Now Supports Hormesis as the Most Fundamental Dose Response, Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine, 15-56pp.**
- Carson, R., 1962, Silent Spring, Houghton Mifflin, Boston.**
- Casida, J. and Quistad, G.B, 2004, Why Insecticides are More Toxic to Insect Than People, The Unique Toxicology of Insects. Journal of Pesticide Science, 29: 81-86pp.**
- Chai, L., Li, Y., Chen, A. and Deng, H., 2017, Responses of growth, malformation, and thyroid hormone-dependent genes expression in *Bufo gargarizans* embryos following chronic exposure to Pb⁺², Environ Sci. Pollut Res, 24(36):27953-27962pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chueh, S.C., Guh, J.H., Chen, J., Lai, M.K. and Teng, C.M.**, 2001, Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells, *J. Urol.*, 166: 347–353pp.
- Coppage, D.L.**, 1971, Characterization of fish brain acetylcholinesterase with an automated pH stat for inhibition studies, *B. Environ. Contam. Tox.*, 6(4):304-310pp.
- Çavaş, T., Cinkılıç, N., Vatan, O., Yılmaz, D. and Coşkun, M.**, 2012, In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ -H2AX foci assays, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3): 212–217pp.
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M. and Pham-Delegue, M.H.**, 2004a, Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera L.*), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78:83-92pp.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M. and Pham-Delegue, M.H.**, 2004b, Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57:410-419pp.
- Delgado, M.J., Cespedes, M.V., De Pedro, N., Alonso-Bedate, M. and Alonso-Gomez, A.L.**, 2001, Day/night variations of dopamine ocular content during *Xenopus laevis* ontogeny, *Neuro-sci. Lett.* 300, 129-132pp.
- Demirci, F., Erdoğan, C. ve Tatlıdil, F.F.**, 2005, Ankara ili Ayaş ve Nallıhan ilçelerinde domates üretim alanlarında zirai mücadele uygulamaları, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(4):422-427s.
- EFSA (European Food Safety Authority)**, 2013, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin, *EFSA Journal.*, 11(1): 3066p.
- Egemen, Ö. ve Canyurt, M.A.**, 1996, Pestisidlerin Akuatik Ortamdaki Etkileri, *Hayvancılık'96 Ulusal Kongresi, Bildiriler*, İzmir. 1:616-621s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

[Egemen, Ö., 2006, Çevre ve Su Kirliliği, Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 42, Bornova- İzmir, 120s.](#)

EPA (Environmental Protection Agency), 1996, Ecological Effects Test Guidelines, Tadpole/Sediment Subchronic Toxicity Test.

EPA (Environmental Protection Agency), 2008, EPA acts to protect bees.

Farooqui, T.A., 2013, Potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory and colony collapse disorder: A unique hypothesis, *Neurochem. Int.*,62:122-136pp.

[Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L. and Peng, P., 2004, Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*, *Chemosphere*, 56:457–63pp.](#)

Gardner, S.T., Wood, A.T., Lester, R., Onkst, P.E., Burnham, N., Perygin, D.H. and Rayburn, J., 2016, Assessing differences in toxicity and teratogenicity of three phthalates, Diethyl phthalate, Di-n-propyl phthalate, and Di-n-butyl phthalate, using *Xenopus laevis* embryo, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 79(2): 71–82pp.

Garrod, L.P., 1951, The reactions of bacteria to chemotherapeutic agents, *Br. Med. J.*, 1: 205–210pp.

Gibbons, D., Morrissey, C. and Mineau, P., 2015, A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22:103p.

Gonzalez-Pradas, E., Urena-Amate, M.D., Flores-Cespedes, F., Fernandez-Perez, M., Garratt, J. and Wilkins, R.J., 2002, Leaching of imidacloprid and procymidone in a greenhouse of southeast of Spain, *Soil Science Society of America Journal*, 66:1821–1828pp.

Goulson, D., 2013, An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides, *Journal of Applied Ecology*, 50: 977-987pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gubler, D.J.**, 1998, Dengue and dengue hemorrhagic fever, Clin. Microbiol. Rev., 11:480-496pp.
- Gupta, D.**, 2012, Study of acute, sub acute and chronic toxicity test, IJARPB, 2 (2):103-129pp.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z.**, 1997, Pestisitler, Çevre Sağlığı Temel Kaynaklar Dizisi, No:52, İlköz Matbaası, Ankara, 173s.
- Hauptman, O., Albert, D.M., Plowman, M.C., Hopfer, S. M. and Sunderman, F.W.Jr.**, 1993, Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis, Ann Clin. Lab. Sci., 23:397–406pp.
- Hill, E.F. and Fleming, J.W.**, 1982, Acetylcholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning, Environ. Toxicol. Chem., 1:27-38pp.
- Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S.E. and Mazzacano, C.**, 2012, Are Neonicotinoids Killing Bees?, The Xerces Society for Invertebrate Conservation, 33p.
- Hrynyk, M.A., Brunetti, C., Kerr, L. and Metcalfe, C.D.**, 2018, Effect of imidacloprid on the survival of *Xenopus* tadpoles challenged with wild type frog virus 3, Aquatic Toxicology, 194:152-158pp.
- Hutler Wolkowicz, I.R., Aronzon, C.M. and Pérez Coll, C.S.**, 2013, Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae, J. Hazardous Mater., 263:784-791pp.
- Keleş, D.**, ‘Pestisitler’ <http://slideplayer.biz.tr/slide/9283086/> (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2017).
- Kısım, A., ve Uzunoglu, S.**, 2012, Hormesis: Toksik ajanların düşük dozlarına uyum sağlamada öncül fenomen, Adli Tıp Dergisi / Journal of Forensic Medicine, 26(3):180-190s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kocaman A.Y. and Topaktaş M.**, 2007, In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48:483-490pp.
- Kocaman, A.Y.**, 2007, Acetamiprid ve Alpha-Cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki In Vitro Genotoksik Etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 207s.
- Kovganko, N.V. and Kashkan, Zh.N.**, 2004, Advances in the Synthesis of Neonicotinoids. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 40(12):1709-1726pp.
- Kubilay, B.**, 2013, Karbamatlı Pestisitlerden Carbaryl'in Tatlı Su İstakozlarında (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) Akut Toksik Etkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 57s.
- Last, J.M. and Wallace, R.B.**, 1992, *Moses, Marine, Pesticides*, in, Maxcy Rosenau Last Public Health and Preventive Medicine, 13.th ed. Prentice Hall mt Co. NewYork.
- Li, D., Liu, M., Yang, Y., Shi, H., Zhou, J. and He, D.**, 2016, Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides, *environmental pollution*, 208: 868-874pp.
- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J. and Morrissey, C.A.**, 2014, Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wet lands of Canada's prairie pothole region, *PLoS One* 9:e92821.
- Maini, S., Medrzycki, P. and Porrini, C.**, 2010, The puzzle of honey bee losses: a brief review, *Bulletin of Insectology*, 63:153-160pp.
- Marchant, G.E.**, 2008, Hormesis and toxic torts, *Hum. Exp. Toxicol.*, 27:97-107pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C. and Liber, K.,** 2015, Neonicotinoid contamination of global surfacewaters and associated risk to aquatic invertebrates: a review, *Environ. Int.*, 74:291–303pp.
- Natale, G.S., Ammassari, L.L., Basso, N.G. and Ronco, A.E.,** 2006, Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles, *Dis. Aquat. Organ*, 72: 261–267pp.
- Nations, S., Long, M., Wages, M., Theodorakis, C. and Cobb, G.P.,** 2010, Developmental effects of ZnO nanoparticle on *Xenopus laevis*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74: 203– 210pp.
- Nations, S., Wages, M., Long, M., Theodorakis, C. and Cobb, G.P.,** 2011, Acute effects of ZnO and CuO nanoparticles on *Xenopus laevis*, *Chemosphere*, 83(8):1053–1061pp.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J.,** 1975, Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Amsterdam: North Holland.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber, J.,** 1956, Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Amsterdam, the Netherlands: North-Holland Publishing Company.
- Nimmo, D.R. and McEwen, L.C.,** 1993, Pesticides. In: Hand book of Ecotoxicology , Ed.by P. Calow. Blackwell Sci. Pub. Newyork, 1:161pp.
- Nippon Soda Co., Ltd.,** 2012, ‘Mospilanas 20 SP’, <https://www.litagra.lt/get.php?f.1583>, (Erişim tarihi:1 Şubat 2018).
- Osterauer, R. and Köhler, H.R.,** 2008, Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 86, 485–494pp.
- Özbudak H., Ünal, Z. ve Sabuncuoğlu S.,** 2016, Gebelikte Non-Steroidil Antiinflamatuvar İlaçların Kullanımının Değerlendirilmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20:64-71s.
- Öztürk, S.,** 1990, Tarım İlaçları, Hasad Yayıncılık, Ankara, 523s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Paisio, C.E., Agostini, E., González, P.S. and Bertuzzi, M.L.,** 2009, Lethal and teratogenic effects of phenol on *Bufo arenarum* embryos, *J Hazard Mater*, 167(1-3):64-8pp.
- Parker, T.T. and Rayburn, J.,** 2017, *A comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of Xenopus laevis embryos*, *Toxicology Reports*, 4: 77-82pp.
- Parlak, H., Arslan Çakal. Ö., Boyacıoğlu M. ve Karaarslan M.A.,** 2009, *Ekotoksikoloji Ders Kitabı*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No: 79, İzmir, 339s.
- Parlak, H., Çakal Arslan, Ö., Boyacıoğlu, M. and Karaaslan, M.A.,** 2010, *Acute and chronic toxicity of contaminated fresh water and sediment of Nif Brook on Daphnia magna (Straus, 1820)*, *Ege University of Fisheries and Aquatic Sciences*, 27(4):135-141pp.
- Pekmezekmek, A.B.,** 2004, *Nikel, Magnezyum, Kkobalt, Kadmiyum, Çinko Klorür'ün Teratojenik, Embriyotoksik Etkilerinin Fetax Testi Kullanılarak Xenopus laevis'te Araştırılması*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 208s.
- Pérez-Coll, C.S. and Herkovits, J.,** 2004, *Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX)*, *Food and Chemical Toxicology*, 42: 299-306pp.
- Pesticide properties database (PPDB),** 2012, 'Pesticide properties database', <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>, (Erişim tarihi: 3 Kasım 2017).
- Prati, M., Biganzoli, E., Boracchi, P., Tesauero, M., Monetti, C. and Bernardini, G.,** 2000, *Ecotoxicological soil evaluation by FETAX*, *Chemosphere*, 41:1621-1628pp.
- Qu, Y.Y., Xiao, D., Li, J., Y., Chen, Z., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X.W. and Song, D.L.,** 2015, *Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid Aphis glycines*, *Ecotoxicology*, 24, 479–487pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rand, G.M. and Petrocelli, S.R.**, 1985, Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications, hemisphere publishing cooperation, 666p.
- Randall, W.A., Price, C.W. and Welch, H.**, 1947, Demonstration of hormesis (increase in fatality rate) by penicillin, Am. J. Public Health, 37: 421–425pp.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P. V., Jackson, R.B.**, 2013, Campbell Biology, Palme Yayınları, 774, Ankara, 1263s.
- Richardson, M.**, 1998, Pesticides-Friend or foe Water Science and Technology, 37(8):19-25pp.
- Robinson, S.A., Richardson, S.D., Dalton, R. L., Maisonneuve, F., Trudeau, V. L., Pauli, B. D. and Lee-Jenkins, S.S.Y.**, 2017, Sublethal effects on wood frogs chronically exposed to environmentally relevant concentrations of two neonicotinoid insecticides, Environmental Toxicology and Chemistry, 36(4): 1101–1109pp.
- Sanchez-Bayo, F. and Hyne, R.V.**, 2014, Detection and analysis of neonicotinoids in river waters — development of a passive sampler for three commonly used insecticides, Chemosphere 99: 143–151pp.
- Sarıgül, Z.**, 2007, Herbisit Glifosatın *Daphnia* spp. Üzerine Akut Toksisitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 42s.
- Sayım, F.**, 1998, Malathion (Organik Fosforlu İnektisit)'un *Rana ridibunda* (Amphibia; Anura) Larvaları Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 63s.
- Sayım, F.**, 2008, Acute toxic effects of malathion on the 21st stage larvae of the marsh frog. Turkish Journal of Zoology, 32: 99-106pp.
- Sayım, F.**, 2010, Toxicity of trifluralin on the embryos and larvae of the red-bellied toad, *Bombina bombina*, Turk. J. Zool., 34:479-486pp.
- Schmuck, R.**, 2001, [Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid, Pflanzenschutznachrichten Bayer, 54: 161–184pp.](#)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, T.B., Mukhopadhyay, S.K., Sar, T.K. and Ganguly, S., 2012,** Acetamiprid induces toxicity in mice under experimental conditions with prominent effect on the hemato-biochemical parameters, *J. Drug Metab. Toxicol.*, 3(6):134p.
- Starner, K. and Goh, K.S., 2012,** Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88: 316–32pp.
- Székács, A., Mörtl, M. and Darvas, B., 2015,** Monitoring Pesticide Residues in Surface and Ground Water in Hungary: Surveys in 1990–2015, *Journal of Chemistry*, 2015: 15p.
- Tegowska, E., Grajpel, B., Worek, K., Wilczynska, B. and Piechowicz, B., 2004,** Effect of acetamipride on development and consumption of iodine by tadpole of *Rana temporaria* (Amphibia: Anura), *Zoologica Poloninae*, 1-4:181-190pp.
- Thybaud, E., 1990,** Toxicité aigüe et bioconcentration du lindane et de la deltaméthrine par les têtards de *Rana temporaria* et les gambusies (*Gambusia affinis*), *Hydrobiologia* 190(2):137-145pp.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E., 2003,** Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors, *Annual Review of Entomology*, 48:339-364pp.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E., 2005,** Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanism of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:247-268pp.
- Uçkun, M., 2013,** *Xenopus laevis* İribaşlarına Thiakloprid ve Trifloksistrobin'in Akut Toksik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 163s.
- USEPA (United States Environmental protection Agency), 2012,** White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington DC.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Maxim, J-M. and Belzunces, L.P.**, 2013, Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services, *Curr. Opin. Env. Sus.*, 5:293-305pp.
- Van Dijk, T.C., Van Staalduinen, M.A. and Van der Sluijs, J.P.**, 2013, Macroinvertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One* 8:e62374.
- Vural, N.**, 2005, Toksikoloji, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:73, Ankara, 659s.
- Wagner, N., Müller, H. and Viertel, B.**, 2017, Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24:1495–1508pp.
- Williams, J.R., Rayburn, J.R., Cline, G.R., Sauterer, R. and Friedman, M.**, 2015, Effect of allyl isothiocyanate on developmental toxicity in exposed *Xenopus laevis* embryos, *Toxicol. Rep.*, 2:222–7pp.
- Wood, J. T. and Goulson, D.**, 2017, The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24:17285–17325pp.
- Wu, W.C., Kao, Y.H. and Hu, D.N.**, 2002, A comparative study of effects of antiproliferative drugs on human retinal pigment epithelial cells in vitro, *J. Ocular. Pharmacol. Ther.*, 18: 251–264pp.
- Xu, P. and Huang, L.**, 2017, Effects of α -cypermethrin enantiomers on the growth, biochemical parameters and bioaccumulation in *Rana nigromaculata* tadpoles of the anuran amphibians, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139: 431-438pp.
- Yamamoto, I. and Casida, J.E.**, 1999, Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor, Springer-Verlag, Tokyo, 300p.
- Yazgan, M.S.**, 1997, Türkiye’de pestisit kirliliği, Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II, Gebze, 571-577s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G.,** 2005, Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları, VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.
- Yu, L., Zhang, X., Yuan, J., Cao, Q., Liu, J., Zhu, P. and Shi, H.,** 2011, Teratogenic effects of triphenyltin on embryos of amphibian (*Xenopus tropicalis*): a phenotypic comparison with the retinoid X and retinoic acid receptor ligands, J. Hazard. Mater., 192(3):1860-8pp.



ÖZGEÇMİŞ

İlknur DÜLGER, 11.08.1984 tarihinde Ankara'da doğdu. Lise öğrenimini Şemikler Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde 2002 yılında tamamladı. 2003 yılında başladığı Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'ndan 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına kayıtlanarak 2011 yılında tamamladı. 2012 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başlayan İlknur DÜLGER aynı bölümde ekotoksikoloji üzerine çalışmalarına devam etmektedir.

