T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMİNOPİRALİD VE FLORASULAM HERBİSİTLERİNİN *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK POTANSİYELİNİN BALIK MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BELİRLENMESİ

DİLHAN AKATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. FULYA DİLEK GÖKALP

EDİRNE –2022

DİLHAN AKATA'nın hazırladığı "**AMİNOPİRALİD VE FLORASULAM HERBİSİTLERİNİN *Gambusia holbrooki* (GİRARD, 1859) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK POTANSİYELİNİN BALIK MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BELİRLENMESİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Fulya Dilek GÖKALP (Danışman)	……
Doç. Dr. Filiz SANAL	……
Doç. Dr. Pınar GÖÇ RASGELE	……...…

Tez Savunma Tarihi: 30/06/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof.Dr.Fulya Dilek GÖKALP

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm kaynak bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

30/06/2022

Dilhan AKATA

Yüksek Lisans Tezi

“Aminopiralid ve Florasulam Herbisitlerinin *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) Üzerindeki Genotoksik Potansiyelinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi”

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tarım alanlarında yüksek miktarda pestisit kullanımı çevrede toksik maddelerin birikimine neden olmaktadır. Bu kimyasallar, su kaynakları veya besin zinciri yoluyla canlılara ulaşabilmektedir. Trakya bölgesinde tahıl üretiminde yüksek oranda herbisit kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Aminopiralid ve Florasulam etken maddeleri ve ticari formülasyonunun balık mikronükleus (MN) testi kullanılarak sitotoksik ve genotoksik ön değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Ticari formülasyonun ön çalışma ile belirlenen 72 saat LC_{50} değerinin katlar halinde (1/2, 1/4, 1/8) azalan konsantrasyonları (150 mg/L, 75 mg/L, 37,5mg/L LC_{50}), etken madde Aminopiralid ve Florasulam’ın 1/4 LC_{50} konsantrasyonu (25 mg/L) 24, 48, 72 saat sürelerle *Gambusia holbrooki* üzerinde muamele edilerek, kan eritrositlerinde mikronükleus (MN), eritrosit nükleer anormallikler (ENA) ve polikromatik eritrosit (PCE) frekansı saptanmıştır.

Eritrosit Nükleer Anormallikler (ENA); çentik, lob, MN, tomurcuk, binükleuslu (BN) hücre frekansları saptanmıştır. Ticari formülasyon ve etken maddelerin balık eritrosit testinde gözlenen anormalliklerin süreye bağlı olarak artış gösterdiği, 48 ve 72 saat muameleler sonrası tüm anormalliklerde kontrole göre anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir. Aminopiralid ve Florasulam’ın 25 mg/L, 24, 48, 72 saat muamelesi sonrası olgun eritrosit sayısı (normakromatid eritrosit = NCE) azalarak, dolaşıma yeni katılan PCE sayısı arttığı saptanmıştır. Genotoksisite belirteçlerinden olan nükleer

anormalliklerin (NA) 72 saat sürede arttığı görülüyorken, hücre savunma mekanizması gereği muhtemel solunum stresi nedeniyle eritrosit sayısının yükselmesinden kaynaklan PCE frekansının arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak NA'ların konsantrasyona bağlı artışı Aminopiralid ve Florasulam pestisitinin potansiyel genotoksik etkisinin bulunduğunu göstermektedir.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 69

Anahtar Kelimeler : *Gambusia*, Mikronükleus, Aminopiralid, Florasulam, Genotoksik, LC_{50}, Balık

Master Thesis

Determination of genotoxic potential of Aminopyralide and Florasulam herbicides on *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) by using micronucleus test

Trakya University, Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

The use of high amounts of pesticides in agricultural areas causes the accumulation of toxic substances in the environment. These chemicals reach natural habitats through water sources and food chain. High rates of herbicides are used in grain production in the '' Thrace'' region of Turkey. In this study, it was aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential effects of Aminopyralid and Florasulam active ingredients and their commercial formulation on fish by using micronucleus test.

Erythrocyte Nuclear Abnormalities (ENA); Notch, lobe, micronucleus, bud, bi-nucleated cell frequencies were determined. Commercial formulation and its active ingredients induced nuclear abnormallities in fish erythrocytes, there was a significant increase in all abnormalities compared to the control group. After 25 mg/L, 24, 48, 72 hours treatment of Aminopyralid and Florasulam, it was determined that the number of mature erythrocytes (NCE=Normachromatid Erythrocyte) were decreased, and the number of PCE (Polychromatic erythrocyte) which were newly added to the circulation were increased. While it was observed that nuclear abnormalities, one of the markers of genotoxicity, were increased in 72 hours exposure period and it was determined that the PCE frequency were increased as the increase in the number of erythrocytes due to

possible respiratory stress of cell defense mechanism. In conclusion, concentration-dependent increase in nuclear abnormalities confirms that the pesticides Aminopyralid and Florasulam have potential genotoxic effects.

Year : 2022

Number of Pages : 69

Keywords : *Gambusia,* Florasulam, Aminopyralid, $LC_{50,}$ Micronucleus, Genotoxic, Fish

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan tezimin düzeltilmesinde yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fulya Dilek GÖKALP'e, tez çalışmamda kullanılan balık materyallerinin toplanmasını sağlayan Sayın Prof. Dr. Utku Güner'e, bugünlere gelmemde her türlü desteklerini hissettiğim ve her zaman yanımda olan canım ailem; annem Filiz AKATA ve babam Gürkan AKATA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: TUBAP 2019/169, 2019/182) tarafından desteklenmiştir. Trakya Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET İV

ABSTRACT Vİ

TEŞEKKÜR Vİİİ

İÇİNDEKİLER İX

SİMGELER DİZİNİ Xİ

ÇİZELGELER DİZİNİ Xİİ

ŞEKİLLER DİZİNİ Xİİİ

1.GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Model Organizma Olarak Balıklar 3

2.1.1. Genetik Toksikoloji Testlerinde Model Organizma Olarak Balıklar 3
2.1.2. Test organizması *Gambusia holbrooki* 4

2.2. Mikronükleus Testi 5
2.2.1. Mikronükleus Testi Kullanım Alanları 6
2.2.2. Mikronükleusların Sayılmasında Kullanılacak Kriterler 6
2.2.3. Balıklarda Mikronükleus Testinin Kullanılması 6

2.3. Polikromatik ve Normakromatik Eritrosit 7

2.4. Nükleer Anormallikler 8

3. PESTİSİTLER VE HERBİSİTLER 10

3.1. Pestisitler ve Pestisitlerin Sınıflandırılması 10

3.2. Herbisitler 12
3.2.1. Oksin Herbisit Ailesi 13
3.2.2. Asetolaktat Sentaz İnhibitörleri Herbisit Ailesi 17

4. MATERYAL VE YÖNTEM 23

4.1.Test Organizmasının Toplanması 23

4.2. Florasulam Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi 23

4.3. Aminopiralid Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi 24

4.4. Ticari formülasyonun *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi 24

4.5. Preparatların Hazırlanması ve İncelenmesi 24
4.5.1. Işık Mikroskobunda İncelenecek Preparatların Hazırlanması 25
4.5.2. Floresan Mikroskobunda İncelenecek Preparatların Hazırlanması 25

4.6. Nükleer Anormaliler, Mikronükleus, PCE ve NCE Sayımı 26

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 27

5.1. Ticari formülasyonun Farklı Konsantrasyonlarının *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları 27

5.2. Aminopiralid Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları 32

5.3. Florasulam Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları 35

6. TARTIŞMA 37

7. KAYNAKLAR 42

8. ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
AO	Acridine Orange boyası
BN	Binükleus
CHO	Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*) ovaryum sağlıklı hücre hattı
DNA	Deoksirobonükleik asit
ENA	Eritrosit nükleer anormallikler
KA	Kromozom anormallikleri
LC_{50}	Ortalama öldürücü doz
mg	Miligram
mm	Milimetre
mmHg	Milimetre civa
MN	Mikronükleus
NA	Nükleer anormallik
NCE	Normakromatik eritrositler
nm	Nanometre
PCE	Polikromatik eritrosit
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
RNA	Ribonükleik asit
SS	Standart sapma

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Ticari formülasyonun 37,5 mg/L, 75 mg/L, 150 mg/L konsantrasyonlarda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları……..…31

Çizelge 5.2. Aminopiralid'in 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları …..……...33

Çizelge 5.3. Florasulam'ın 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları……....35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1. Polikromatik ve normakromatik eritrositlerin ışık mikroskobu görüntüleri 29

Şekil 5.2. Nükleus Anormalliklerinin Işık Mikroskobu Görüntüleri 30

Şekil 5.3. Lancelot® Super muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği …… . ..32

Şekil 5.4. Polikromatik ve normakromatik eritrositlerin floresan mikroskop görüntüleri….. . 33

Şekil 5.5. Aminopiralid muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği …… … ...34

Şekil 5.6. Aminopiralid muamelesi sonrası gözlenen PCE frekansının zamana bağlı artış grafiği ……..……..…….……..34

Şekil 5.7. Florasulam muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği ……..…….……..……..... ...36

Şekil 5.8. Florasulam muamelesi sonrası gözlenen PCE frekansının zamana bağlı artış grafiği ……..…….…… ….....36

BÖLÜM 1

1.GİRİŞ

Pestisitlerin tarımsal alanlara büyük ölçekte uygulanması, çevrede toksik maddelerin birikimine neden olur. Bu kimyasallar su rezervuarlarına, akıntılarına ve nehirlerine ulaşabilir ve böylece balıklar dahil olmak üzere sudaki biota üzerinde olumsuz etki yaratabilir (John & Prakash, 2003). Herbisitler, tarımsal kullanım sonrası su kaynaklarına, yeraltı sularına ve yüzey sularına karışabilmektedir. Düşük dozlarda bile genotoksik maddelerin varlığı, besin zinciri yoluyla ve içme suyuna karışarak sucul organizmalara ulaşabilmektedir (Zoll, Ferrier, & Gauthier, 1990). Bu nedenle düşük kimyasal konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik aktiviteyi değerlendirmek önemlidir.

Trakya'da tahıl üretiminde yabancı otların üremesini önlemek amacıyla çok sayıda herbisit bulunmaktadır. Lancelot® Super herbisiti, Aminopiralid ve Florasulam etken maddelerini içeren, yüksek oranda kullanılan herbisittir. Ticari formülasyonu ve etken maddeleri ile yapılan genotoksisite çalışmaları sınırlıdır. Ticari formülasyon ve ayrıca etken maddelerin ayrı ayrı çalışılarak test organizmaları üzerinde genotoksik etkilerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu maddelerin ön toksisite değerlendirmesi, bu konudaki eksik veriyi tamamlar nitelikte olacaktır.

Toksik çalışmalarda kullanılan sucul organizmalar önemli genotoksisite parametreleri sağlamaktadır. Bu çalışmada Lancelot® Super herbisiti ve etken maddeleri olan Florasulam ile Aminopiralid'in *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859)

üzerindeki genotoksik etkisi, mikronükleus (MN), nükleer anormallikler (NA), polikromatik eritrosit (PCE), normakromatik eritrosit (NCE) verileri değerlendirilerek yapılacaktır.

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Model Organizma Olarak Balıklar

2.1.1. Genetik Toksikoloji Testlerinde Model Organizma Olarak Balıklar

Balıklar sadece biyokimyasal araştırmalarda değil, sitogenetik ve genotoksik araştırmalarda da uygun model canlı olarak kullanılabilmektedirler. Su ortamlarında besin zincirinde üst sıralarda bulunmalarının yanı sıra, solunum için çoğunlukla suyu kullanmaları kirleticilere maruz kalmalarına neden olmaktadır. Bu sebeple, balık doku ve hücrelerinin genetik toksikoloji alanındaki çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Farklı yapıdaki kirletici maddelerin balıklar üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar temelde söz konusu kimyasalların karsinojenik etkilerinin araştırılmasını amaçlamaktadır. Sistematik olarak yüksek organizmalarda yapılan genotoksisite testlerinden alınan sonuçlar, özellikle insanlar üzerinde oluşacak etkilerin tahmin edilmesinde daha etkilidir. Balıkların laboratuvar ortamında saklanabilmeleri ve kimyasal ajanlara maruz bırakılabilmeleri kolay olduğundan, insan sağlığı için risk oluşturabilecek kimyasal etkenlerin araştırılmasında, balık türleri in vivo genotoksisite testlerinde yararlanılabilen önemli organizmalar haline gelmişlerdir. Çekirdekli balık eritrositlerinde klastojenik etkilerin belirlenmesinde MN testi uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Alsabti & Metcalfe, 1995; Ellingham, Christensen,

& Maddock, 1986; Galetti, Aguilar, & Molina, 2000; Klinkhardt, 1991; Rishi & Grewal, 1995).

2.1.2. Test organizması *Gambusia holbrooki*

Sivrisinek balıkları Cyprinodontiformes (Dişli sazancıklar) takımının *Poeciliidae* ailesine aittir. Bu aile, sivrisinek balıkları ile birlikte lepistes, pilati, moli ve kılıçkuyruk gibi içerisinde tanınmış çokça türünü içermektedir. *Gambusia* cinsinin doğal dağılım alanı Kuzey Amerika'dır (Lloyd & Tomasov, 1985, Lloyd, 1987)

Kökenleri Kuzey Amerika olan ve bütün dünyada sivrisinek balığı olarak tanınan *Gambusia holbrooki*, sıtma hastalığına karşı yürütülen savaşta biyolojik ajan olarak faydalanmak amacıyla, dünyanın pek çok ülkesine 1900'lü yıllarda aşılanmaya başlamıştır (Courtenay Jr & Meffe, 1989; Walters & Freeman, 2000). Amerika kıtasında Teksas'tan Hawaii'ye yapılan aşılama çalışması, dünyadaki ilk resmî sivrisinek balığı aktarımıdır, Avrupa kıtasındaki ilk aşılama çalışmaları 1920 yılında önce İspanya'da, ikinci olarak da İtalya'da gerçekleştirilmiştir (Walton, Henke, & Why, 2012). Bu balıkların Türkiye sularına ilk aşılamalarının bütün dünyada olduğu gibi sıtma hastalığının vektörü sivrisineklere karşı biyolojik savaş yürütmek amaçlı olarak 1920-1929 yılları arasında yapıldığı belirtilmektedir (Walton et al., 2012).

Sivrisinek balıkları, Türkiye sularına aşılanan ilk "yabancı (egzotik)" balık türüdür (Innal & Erk'akan, 2006). *Gambusia holbrooki*'nin 4-42°C arası geniş bir sıcaklık aralığında yaşamını sürdürebildiği belirtilmekle birlikte, bu türün ideal su sıcaklığının 31-35°C arasında olduğu bildirilmiştir (Pyke, 2005). *Gambusia sp*. yaşam alanı olarak genellikle tatlı suları tercih eder, ancak *Gambusia holbrooki* türünün ‰23 tuzluluğa sahip sularda da yaşamayı başardığı gözlenmiştir (Alcaraz & García-Berthou, 2007).

Üremeleri tropikal bölgelerde tüm sene sürerken, kışın soğuk yaşandığı bölgelerde sadece yaz aylarında gerçekleşmektedir. Özellikle yaşlı ve büyük dişi bireyler bir üreme mevsimi boyunca birden çok doğum yapabilir (Pyke, 2005). Canlı doğum yapan bu türlerin dişileri elverişli ortam olduğunda 3-4 haftada bir doğum yapar. Bu türlerin üremeleri erkek bireylerinde bulunan kopulasyon organıyla olur ve dişi bireyler erkekten gelen sperm hücrelerini döllenme zamanına kadar canlı olarak

saklayabilir (Krumholz, 1948). *Gambusia holbrooki* adaptasyon konusunda yetenekli bir balık türü olduğundan çevresel faktörlerin değişim göstermesine oldukça toleranslıdır. Bu sebeple farklı kalitedeki sularda yaşayabilirler. Göller, göletler, lagünler, kuyular ve bataklıklar başlıca yaşam alanları arasındadır. Akarsuların mansap bölgelerinde yaşarlar ve kıyısal bölgeleri tercih ederler (Rupp, 1997). Yaşadıkları sucul alanların derin olmayan bölgelerini tercih ederler. Bu tip bölgeler, besin bakımından zengin ve saklanma açısından elverişli alan oluşturduğu için balıklar tarafından tercih edilmektedir (Zarev, 2012). Sivrisinek balıkları etçildir ve oldukça geniş besin seçeneklerine sahiptirler (Erguden, 2013). Küçük böcekler, zooplankton, zoobentoz tüketen bu türler, aynı ortamda yaşadığı diğer türlerin yumurta ve larvalarıyla da beslenebilmektedir (Goodsell & Kats, 1999; Özuluğ, Saç, & Gaygusuz, 2013). *Gambusia holbrooki* istilacı bir balık türüdür. Doğal olarak yaşamlarını sürdürdükleri habitatlardan başka habitatlara bilinen ya da bilinmeyen bir yolla, istemli ya da istemsiz şekilde taşınan ve taşındıkları habitatlarda istenmeyen etkiler oluşturan türlere istilacı türler denmektedir (Özdemir & Ceylan, 2007). İstilacı türleri habitatları için tehdit durumuna getiren nedenlerin başında, değişken çevre şartlarına adaptasyon sağlayabilmeleri, üremede farklı yöntemler geliştirmiş olmaları ve farklı besinler ile beslenebilme yetenekleri gelmektedir (Carman, Janssen, Jude, & Berg, 2006). *Gambusia holbrooki* türü de sahip olduğu bu yetenekler sayesinde giriş yaptığı tatlı su kaynaklarında topluluklar oluşturabilmekte, ekosistem faunasının diğer üyeleri için riskler oluşturabilmektedir. *Gambusia* cinsi üyeleri, çoğunlukla tatlı sularda yaşarlar; ancak tuzlu ve acı sularda yaşayan üyeleri de vardır (Zarev, 2012).

2.2. Mikronükleus Testi

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojen maddeleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Demirel & Zamani, 2002; Schmid, 1976; Widel ve ark., 2001).

Kimyasal risk incelemesi veya sucul türlerin izlenmesinde genotoksisite testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Simoniello ve ark., 2009).

Organizmanın çeşitli mutajenik ve klastojenik maddelere maruz kalması ile ortaya çıkan DNA hasarı sonucunda MN oluşmaktadır (Ceppi, Biasotti, Fenech, & Bonassi, 2010; Fenech & Crott, 2002).

MN'ler, ana kromozomdan ayrılmış olan fragmentlerden veya anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nükleusa dahil olmayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nükleusa ek olarak görülebilen küçük nükleuslardır (Heddle ve ark., 1983).

2.2.1. Mikronükleus Testi Kullanım Alanları

MN testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde meydana getirdiği genotoksik etkinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir testtir. Bu test mitoz bölünme ile oluşan hemen hemen tüm hücre tipleri üzerinde in vitro ve in vivo olarak uygulanabilmektedir. MN aynı zamanda, in vitro çalışmalarda nükleer bölünme indeksi, in vivo çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normakromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksisitenin belirlenmesini de sağlamaktadır (Anderson ve ark., 1988; Demirel & Zamani, 2002; Nigro, Palermo, Mudry, & Carballo, 2003; Rojas ve ark., 1993; Seligmann ve ark., 2003).

2.2.2. Mikronükleusların Sayılmasında Kullanılacak Kriterler

MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır; hücreler çift nükleusa sahip olmalı ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır, MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar ya da daha küçük olmalıdır, MN'ler yuvarlak ve oval yapıda olmalıdırlar, MN'ler ana nükleustan belirgin şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilmelidir, boyanma yoğunluğu ana nükleus ile aynı olmalıdır, sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmalıdır (Countryman & Heddle, 1976; Fenech, 2000; Titenko-Holland ve ark., 1997).

2.2.3. Balıklarda Mikronükleus Testinin Kullanılması

Balık eritrositleri çekirdekli olduğundan, bu hücrelere klastojenik etkilerin belirlenmesi için MN testi uygulanması son derece kolaydır. Laboratuvar koşullarında

yapılan çalışmalarda, genotoksik maddeye maruz kalan balıklarda eritrosit MN frekanslarının anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. MN ilk hücre siklusundan önce görülemeyeceği için, bir hücre popülasyonunda gözlenen MN frekansının hücre çoğalması kinetiği ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir. Hücre poliferasyon oranı ise balık türüne, hedef dokuya ve çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Balıklarda da diğer organizmalarda olduğu gibi MN oluşumu belirli bir oranda kendiliğinden gerçekleşmektedir. Fakat balıklardaki kendiliğinden gelişen MN frekansları memelilerdeki frekansa oranla daha düşüktür ve kendiliğinden MN frekansları türe, metoda ve dokuya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Williams & Metcalfe, 1992).

2.3. Polikromatik ve Normakromatik Eritrosit

Polikromatik eritrositler (PCE) gelişim aşamasında olan, olgunlaşmamış eritrositlerdir. Yapılarında hala ribozom bulundururlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı, gelişimlerini tamamlamış olan olgun normakromatik eritrositlerden (NCE'ler) ayırt edilebilirler. NCE'ler gelişimlerini tamamlamış, nükleuslu olgun eritrositlerdir (Krishna & Hayashi, 2000).

Kemik iliği yetişkin hayvanlarda temel hematopoetik organdır. Çeşitli kimyasal maddelere maruz kalması hemaopoietik hücrelerin bölünmeleri sırasında, kromozom hasarına veya mitoz bölünmenin engellenmesine neden olmaktadır (Lambert, Singer, Boucher, & Douglas, 2005). Eritropoezis aşamasında son mitozdan sonra kemik iliğindeki eritroblastlar PCE'lere dönüşürken çekirdeklerini kaybetmekte ve bu anda ortaya çıkan kromozomal hasar sitoplazmada MN oluşmasına sebep vermektedir. MN içeren PCE sayısındaki artış kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu oluşan sitogenetik hasarın bir belirtecidir (MacGregor ve ark., 1987; Üstün, 2007; Von Ledebur & Schmid, 1973).

Uygulanan kimyasalın PCE'de oluşturduğu kromozom kayıpları ve hasarının dolaşım kanındaki NCE'lerin oluşumundaki etkisini MN testi belirlemektedir (Lambert et al., 2005; Yener & Dikmenli, 2009).

Test maddesinin sitotoksisitesi, rutin olarak sitotokik etki gösteren kimyasal ile muamele sonrası PCE/NCE oranındaki azalma ile tespit edilmektedir. (Lambert et al., 2005; Yener & Dikmenli, 2009).

2.4. Nükleer Anormallikler

Son yıllarda farklı organizma ve doku hücreleri üzerinde yapılan incelemelerde genotoksik etkileşimler altında nükleus şeklinde bazı anormallikler olduğu belirlenmiştir. Bu anomallikler binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, MN, loblu nükleus olmak üzere başlıca beş grup altında toplanmışlardır. Bir hücre içerisinde çift nükleus bulunma durumu olan binükleus tanımı, hücre bölünmesi sırasında ve başlıca sitokinezde meydana gelen sitotoksik etkilerin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çentikli nükleus, içerisinde kromatin bulunmayacak şekilde çentiği andıran girintilere sahip nükleuslardır. Tomurcuklanma ve lob oluşumu ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar özellikle, belirli koşullar altında yetiştirilen ve gen amplifikasyonunun indüklenmesine dayalı hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Ma, Martin, Trask, & Hamlin, 1993; Shimura ve ark., 1999).

Shimizu ve ark. amplifiye edilmiş DNA'nın hücre siklusunun S fazında nükleusun dış çevre kısımlarına doğru itilip, buradan nükleus tomurcuklanması ile bir MN oluşturmak üzere atıldığını göstermiştir. Bunun yanında hidroksiüre gibi DNA sentez inhibitörlerinin de amplifiye edilmiş DNA'yı bu mekanizma ile attığı belirlenmiştir. Bu araştırmacılar nükleusun bir şekilde temel nükleus alanı ile uyuşmayacak şekilde fazlalık oluşturan DNA'yı tanıma yeteneğine sahip olabileceğini belirtmişlerdir (Shimizu, Itoh, Utiyama, & Wahl, 1998).

Balık eritrositlerindeki anormalliklerin sınıflandırılması ve genetik toksisite testinde bir indikatör olarak kullanılabileceklerine dair yorumlar ilk olarak Carrasco ve ark. tarafından yapılmıştır (Carrasco, Tilbury, & Myers, 1990).

Pacheco ve Santos, siklofosfamid ve kağıt sanayi atıklarının genotoksik etkilerini yılan balıkları üzerinde test ederken MN testi yanında diğer MN anomalliklerini de değerlendirmiştir (M Pacheco & Santos, 1996).

Ayylon ve Grancia-Vazquez, yaptıkları çalışmalarda balık eritrositlerinde nükleus anomalilerinin çoğu durumda genotoksik etkilere MN ile birlikte oldukça açık

bir korelasyon içerisinde yanıt verdiklerini belirlemişlerdir (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000, 2001).

Folik asit eksikliği olan hücre kültürlerinde yürütülen çalışmalarda tomurcuk, lob ve MN oluşumlarının arttığı gösterilmiştir. Folik asit eksikliğinin gen amplifikasyonuna ve çift iplik kırılmaları gibi DNA ve kromozom hasarına yol açtığı bilinmektedir. Dolayısı ile bu olayların MN ve nükleus tomurcuklanması oluşumunda etkili olmalarının mümkün olabileceği bildirilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda ortaya atılmış yeni bir mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizma Kırılma-Birleşme-Kırılma (KBK) siklusu olarak adlandırılmıştır. KBK siklusunun, folik asit eksikliği olan hücre kültürlerinde nükleus tomurcuklanması ve MN oluşumunun paralel olarak artışına yol açan olası bir mekanizma olacağı ile sürülmüştür (Fenech & Crott, 2002).

Benzer şekilde, balık eritrositlerinde belirlenen lob oluşumlarının folik asit eksikliğinden kaynaklanan nükleus anormallikleri olabileceği bildirilmiştir. Bu mekanizmaya göre kardeş kromozomlarda ortaya çıkan kırılmalar neticesinde oluşan ve S fazında replike olan disentrik kromozomların anafaz safhasında kutuplara çekilirken, merkezi olmayan bir noktada kırılmaları sonucunda oluşan yavru hücrelerden biri bazı genler açısından noksan olurken, diğer yavru hücre bazı genler açısından duplike olacaktır. Bu duplike olan dizilerdeki homolog rekombinasyonlar sonucu oluşacak olan fazlalık halkasal DNA fragmenti tomurcuklanma, çekirdek zarında meydana gelen tomurcuklanma yolu ile uzaklaştırılmalıdır (Hibiya, 1982).

BÖLÜM 3

3. PESTİSİTLER VE HERBİSİTLER

3.1. Pestisitler ve Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, tarımsal ürünlerin, hayvan yemlerinin üretimi, depolanması gibi durumları olumsuz etkileyebilecek her türlü zararlının yok edilmesi veya kontrol altına alınması için kullanılan maddelerdir. Pestisitler ayrıca, bitki büyümesini düzenlemede, yaprak dökücü, kurutucu, yeni oluşan meyvelerin dökülmesini engelleyici etkenleri ortadan kaldırmak amacıyla kullanılan maddelerdir. (Kara & Gençer).

Pestisit türü kullanılacak amaca göre seçilir ve seçilen pestisitte bazı özellikler aranır. Bu özellikler, uygulanacak olan zararlıyı kontrol altında tutabilmeli ve uygulanan ortamda kalabilmelidir. Ayrıca uygulanan zararlıdan başka alandaki diğer canlılara zarar vermemeli, ortamda birikim yapmamalıdır (Göksu, 2003).

Pestisitler işlevlerine göre; yaprak dökücüler (defoliants), kurutucular (dessicants), dezenfektanlar, kaçırıcılar (böcek ve kuşları kaçıranlar), çekiciler (yemler vs.), kısırlık yapan kimyasallar ve büyüme düzenleyicileri olarak sınıflara ayrılmaktadır (Güler & Pestisitler, 1997).

Pestisitler genel olarak ise şu şekilde sınıflandırılır;

Algisitler: Alg öldüren pestisitler,

Fungusitler: Mantar öldüren pestisitler,

Bakterisitler: Bakteri öldüren pestisitler,

Akarisitler: Akarları öldüren pestisitler,

Afisitler: Yaprak bitkilerini öldüren pestisitler,

Mollusitler: Yumuşakçaları öldüren pestisitler,

Avenisitler: Kuşları kaçıran pestisitler,

Herbisitler: Ot öldürücüler,

Rodentisitler: Kemiricileri öldüren pestisitler,

Nematositler: Nematodları öldüren pestisitler,

Termisitler: Karıncaları öldüren pestisitlerdir (Sevim, 2011).

Pestisitin insanlık tarihinde M.Ö. 1500'lü yıllarda kullanılmaya başlandığı biliniyor Günümüze kadar 6000 çeşit pestisit üretilirken bunların 600 adetinin ticari olarak kullanıldığı, tarımsal üretimde zararlı canlılara karşı ve halk sağlığı uygulamalarında haşere ile mücadelede kullanılan pestisitlerin hedef olmayan canlı türlerini etkilemesi, hava, su, toprak ve biotada birikmesi önemli bir çevresel problem olarak ortaya çıkmıştır (Güler & Pestisitler, 1997).

Pestisitler her organizmada değişik şekillerde etkiler göstermektedir, bu etkiler oldukça değişken olup, hedef organizmadaki toksisite biyokimyasal bir dizi olay sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kimyasal ajanlar iki farklı şekilde toksik etki meydana getirirler:

Akut toksisite; sadece bir konsantrasyonda maruz kalındığında kısa sürede meydana gelen ve belirtileri anlaşılabilen etkidir. Akut toksisitenin ölçüsü LC_{50} değeridir. LC_{50} değeri organizma topluluğunda %50 oranında ölüm oluşturan doz olarak bilinmektedir. Düşük LC_{50} değeri o bileşiğin toksisitesinin yüksek olduğunu belirtmektedir.

Kronik toksisite; uzun bir süreçte, öldürücü doz altındaki tekrarlı maruz kalma ile meydana gelen toksisitedir. (Giray Kurt, 2007).

Pestisitlerin 1-2 hafta ile 2 yıldan daha fazla süre toprakta kalabilmektedir (15 ay veya daha fazla) olabilir. Örneğin fenoksi asitler 1-12 hafta, Triazin ve Pikloram gibi herbisitler 1-18 ay kalabilmektedir (Akman, Ketenoğlu, Evren, Kurt, & Düzenli, 2000).

Pestisitler suların kalitesini ve suda bulunan plankton bolluğunu yüksek ölçüde yok etmektedir (Sweilum, 2006). Aynı zamanda balık popülasyonlarının sağlığını ve üremesini önemli ölçüde etkilemektedir (Pathiratne & George, 1998).

Pestisitler ile ilgili bilimsel kaynaklar araştırıldığında yüzlerce pestisitin canlı organizmalar ve çevre üzerindeki etkilerini inceleyen makale, dergi, kitap ve yayın bulunduğu görülmektedir (Ağar, Aydınoğlu, Temel, İkizünal, & Ece, 1991; Atamanalp & Yanık, 2001; Güler & Pestisitler, 1997).

Önemli sucul organizmalardan olan balıklar, biyolojik testler ve toksikolojik araştırmalar için uyumlu organizmalar arasındadır. Bu nedenle uygulanan akut letal toksisite testleri toksik maddenin dozunun anlaşılması ve toksik etki mekanizmasının belirlenebilmesi için histopatolojik ve fizyolojik çalışmalarla desteklenmesi gerekir (Arellano, Santoyo, Martın, & Ygartua, 1999).

3.2. Herbisitler

Herbisitler, bitkileri yok etmek veya kontrol altına almak için kullanılan pestisitlerdir. Ülkemizde herbisit kullanımı sürekli çoğalmakta ve bununla beraber herbisitlerin doğa ve canlılar üzerindeki zararlı etkileri artış göstermektedir. Bu sorunun büyümesini engellemek amacı ile herbisitlerin canlı organizmalar üzerinde yarattığı sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Mengüç, 2018).

Bunların dışında, yağmur gibi etkenlerle yüzeyde çözünmemiş halde bulunan herbisit zamanla toprağa karışarak doğanın kirlenmesine neden olur. Herbisitler buharlaşabilirler ve buhar basıncı seviyesine göre uçucu olarak belirtilebilirler. Buhar basıncı (mmHg) ile tanımlanır ve sınır 20°C de 1.10^{-5} mmHg olarak belirlenmiştir. Herbisitlerin buharlaşması; buharlaşma basıncına, konsantrayonuna, topraktan emilimine , suda çözünebilmesine, havanın ısısına, rüzgarın şiddetine, bağıl neme, toprağın ısısına ve nemine bağlıdır (Yalçınkaya, 2006).

Herbisitler etki mekanizmalarına göre gruplandırılmaktadırlar. Bu gruplardan birisi bu çalışmada kullanılan Aminopiralid herbisitinin dahil olduğu Oksin grubu herbisitler, diğeride yine bu çalışmada kullanılan Florasulam herbisitinin dahil olduğu Asetolaktat sentaz inhibisyonuna neden olan herbisitlerdir.

3.2.1. Oksin Herbisit Ailesi

Fenoksiasetik asitler, oksin herbisit ailesine ait olan hormon grubu herbisitlerdir. Bu herbisitler geniş yapraklı otları ortadan kaldırmak amacıyla kullanılırlar. Herbisitler dolaylı olarak serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olmaktadır. Bu radikaller de hücrenin proteinlerine, nükleik asitlerine, karbonhidratlarına ve lipidlerine saldırarak antioksidan savunma sistemini harekete geçirir (Baumann, 2008; Gunsolus & Curran, 1991). Fenoksi bileşikler toprak ve suda fazla çözünmeyen, ticari amaçlı bileşiklerdir. Bu maddeler bitkilerde dokulara girerek meristem hücrelerinde fizyolojik etkilere sebep olur ve bitkinin ölümüne neden olur (Akman et al., 2000).

1940'lı yıllarda New York'ta kurulan Boyce Thompson Enstitüsünde 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) oksin aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalar, oksinlerin herbisit yani bitki öldürücü olarak kullanımındaki ilk çalışmalardır. Bu konuda, İngiltere'de yapılan çalışmalarda ise, 2,4-D ve naftilasetik asit kimyasal birleşimleri üzerinde durulmuş ve bu aktif maddelerin özellikle geniş yapraklı ve dikotiledon bitkilerde öldürücü etkisinin olduğu saptanmıştır. Bu noktadan yola çıkarak, Pikloram adı verilen ve yaygın olarak kullanılan herbisit imal edilmiştir (Kingman & Moore, 1982).

Oksin herbisitinin bitkisel dokular üzerindeki toksik etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar;

Oksin sınıfına dahil olan diğer herbisitlerin genotoksik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Fasulye bitkisi (*Phaseolus vulgaris L.*) fidelerinin kök dokusunda yapılan bir çalışmada oksin sınıfı herbisit olan 2,4-D bitkiye farklı konsantrasyonlarda 96 saat muamele edilerek genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 2,4-D'nin konsantrasyona bağlı olarak fasulye fidelerindeki kök büyümesini inhibe ettiği

saptanmıştır. Ayrıca DNA hasarını belirlemek için yapılan Comet assay bulgularında 2,4-D'nin DNA hasarını önemli seviyede teşvik ettiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda 2,4-D herbisitinin genotoksik olduğu bildirilmiştir (Bozdağ, 2009).

Pikloram'ın (5–40 mg/L) *Phaseolus vulgaris*'te DNA hasarına, DNA metilasyon kaybına ve genotoksik kararlılığında düşüş meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Taspinar, Aydin, Arslan, Yaprak, & Agar, 2017). Pikloram ticari formülasyonunun *Tradescantia* bitkisi üzerinde yapılan MN testinde doza bağlı MN frekansında artış olduğunu saptamışlardır (Mohammed & Ma, 1999). Pikloram'ın (5–40 mg/L) *Phaseolus vulgaris*'te DNA hasarına, DNA metilasyon kaybına ve genotoksik kararlılığında düşüş meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Taspinar et al., 2017).

Oksin herbisiti olan Pikloram ve 2,4-D'nin *Lactuca sativa L* ve *Allium cepa L.* üzerinde klastojenik ve anojenik etkili olduğu tespit edilmiştir (Alves ve ark., 2021).

Oksin herbisitinin hayvansal dokular üzerindeki toksik etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar;

İnsanlar üzerindeki araştırmalarda; insanlarda mideye alınmasının ardından meydana gelen toksik etkiler araştırılmıştır (Schmoldt, Iwersen, & Schlüter, 1997). 2,4-D'nin eritrosit, lökosit ve kırmızı kemik iliği hücrelerinde biçim ve sayı değişikliğine, hemoglobinde ise miktar değişikliği oluşturduğu belirtilmiştir (Halliop, Tochman, & Latalski, 1980).

2,4-D'nin üretilmesi ve paketlenmesinde çalışan insanların karşı karşıya kaldıkları risk faktörlerinin belirlenmesi için yapılan araştırmada, beyin neoplazmasının bu kişilerde normal bireylere oranla daha çok olduğu bildirilmiştir (Bond ve ark., 1988).

2,4-D'ye kronik olarak maruz kalan işçiler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, 2,4-D grubu pestisitlere uzun süre maruziyetin bazı organlarda kanser gelişimine sebebiyet verebileceğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar 2,4-D türevi herbisitlerin kullanımı ile yumuşak doku sarkoması gelişimi arasında bağlantı olduğunu göstermektedir (Vineis ve ark., 1987; Woods & Polissar, 1989).

2,4-D'ye maruz kalmış çimlerden oluşan alanlarla temas halinde bulunan köpeklerde kötü huylu tümörler geliştiği saptanmıştır (Ibrahim ve ark., 1991).

Başka bir araştırmada, canlı organizmalarda 2,4-D'lerin testosteron salgısında azalmaya sebebiyet verdiği, buna karşılık testikular dokudan östrojen salgılanmasını, progesteron ve prolaktin salgılarında artış meydana getirdiği, mestrual siklusta anormallikler oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca erkek ilaç püskürtücü bireylerde (sprayer) sperm miktarının düştüğü, şekillerinde farklılıkların oluştuğu gözlenmiştir (Lerda & Rizzi, 1991). Bir diğer çalışmada bu herbisitleri uygulayan işçilerde prostat kanseri riskinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Morrison ve ark., 1993).

2,4-D pestisitinin hücresel mutasyonlar meydana getirebileceği (Palmeira, Moreno, & Madeira, 1994), içeriklerindeki Dioksin (2, 3, 7, 8- TCDD) sebebiyle çevreye ve insan sağlığına zararlı oldukları saptanmıştır (Littorin, Hansson, Rappe, & Kogevinas, 1994).

Çevresel bulaşmaya ve epidemiyolojik araştırmalarla toksisiteye sebep oldukları bilinen 2,4-D sınıfı pestisitlerin kullanımının azaltılmasının, farklı kanser çeşitlerinin gelişimini azaltabileceği bildirilmiştir (Hardell & Eriksson, 1999).

Böbrekler üzerinde yapılan bir araştırmada; 2,4-D maddesinin 96 saat akut dozu baz alınarak *Tinca tinca* (kadife balığı) balığında meydana getirdiği patolojik olaylar incelenmiştir. 1, 2, 5, 8 ve 12 günlük maruz kalma sürelerinin ardından, böbrek dokusunun küçüldüğü ve bozulmaya başladığı, boşaltım sistemini oluşturan hücrelerde farklılıklar olmaya başladığı bildirilmiştir (Gomez ve ark., 1999).

Bakteri ve hayvan sistemlerinden faydalanarak 2,4-D ve Dikamba gibi oksin grubu herbisitlerin; MN oluşumunu arttırdığı (Holland ve ark., 2002), kromozom aberasyonlarına sebebiyet verdiği (Amer & Aly, 2001), kardeş kromatid değişimlerini arttırdığı (González, Soloneski, & Larramendy, 2006; Soloneski, González, Reigosa, & Larramendy, 2007), *Drosophila melangoster*'de somatik mutasyon oluşturduğu (Kaya, Yanikoglu, & Marcos, 1999) ve ames testiyle saptanan gen mutasyonlarına sebep olduğu belirlenmiştir (Charles ve ark., 1999).

Son yıllarda Hırvatistan'daki araştırmalar, Strazine, Malathion, Cyanazine ve 2,4-Diklorofenoksi asetik asit'in karışımlarından oluşan bileşiklere maruz kalan işçilerde kromozom anomallikleri ve kardeş kromatid değişim frekanslarındaki artışı göstermektedir (Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2002; Soyöz & Özçelik, 2003; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001, 2002).

2,4-D'lerin bazı biyokimyasal parametrelerde farklılıklar oluşturduğu, oksidant aktiviteye sahip oldukları, insan eritrositlerinin 250 ve 500 ppm 2,4-D'ye maruz bırakılmasıyla kanda glutatyon ve superoksit dismutaz seviyesinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Bukowska, 2003).

Aminopiralid in vitro ames testi, CHO/HGPRT, in vivo fare MN testlerinde negatif sonuç vermiş, ancak Aminopiralid, in vitro sıçan lenfosit kromozom aberasyon testinde pozitif sonuç vermiştir. Bu testte aminopiralid sitotoksik konsantrasyonlarda kromozom aberasyonlarını indüklemiştir. Toksik etkiden dolayı klastojenik etkili olduğu ileri sürülmektedir (USEPA, 2005). Fare ve sıçan karsinojite çalışmalarında tümör oluşumunda artış gözlenmemiştir. Sıçan çalışmalarında, sıçana ağız yoluyla Aminopiralid verilmesi ile Aminopiralid metabolik faaliyetinin hızla absorbe olduğu, yayıldığı ve atıldığı şeklindedir. Dokuda dağılma ve biyoakümülasyonun düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (USEPA, 2005).

Farelerde 2,4-D ve Dikamba pestisitinin peroksizom içeriğini fark edilir seviyede arttırdığı saptanmıştır (Espandiari ve ark., 1995; Lundgren, Meijer, & Depierre, 1987). Toksik kimyasallara maruz kalmış canlılarda birtakım biyolojik süreçler kötü yönde etkilenebilir. Büyümenin durması, nükleik asit ve protein içeriklerinde değişim, gerekli enzimlerin inhibe olması, pigmentte değişim, DNA'da hasar veya mutasyonların meydana gelmesi zararlı ajanların maruziyeti ile bitkisel organizmalarda oluşabilecek bazı önemli biyolojik yanıtlardır (Cenkci ve ark., 2010).

Pikloram'ın *Rhinella arenarum* larvaları üzerinde toksik etkisinin bulunduğu, eritrositlerde nükleer anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir (Lajmanovich ve ark., 2013).

Cnesterodon decemmaculates balığında Dikamba pestisitinin genotoksik etkilerinin incelendiği bir araştırmada, Dikamba'nın DNA tek zincir kırılmasını

arttırdığı, genomik kararsızlık meydana getirdiği saptanmıştır (de Arcaute, Soloneski, & Larramendy, 2014; De Arcaute et al., 2016).

Oksin herbisitlerinin balıklar üzerinde kısa süreli (De Arcaute, Soloneski, & Larramendy, 2016) ve uzun süreli muameleleri sonucu genotoksik etki tespit edilmiştir (Natale ve ark., 2018).

2,4-D ve 2,4-D içeren ticari ürünlerin CHO-K1 (Çin hamster over) hücrelerinde 6–10 mg/L aralığında genetik hasara neden olduğu, ticari formülasyonu ile hücre bölünmesi üzerinde etkili olduğu, her iki formülasyonun da CHO hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik etkili oldukları bildirilmiştir (Laborde, Larramendy, & Soloneski, 2020).

2,4-D herbisiti ile Wistar fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda testis dokusunda histopatolojik hasara neden olduğu (Özdaş ve ark., 2006), MN ve DNA hasarına sebep verdiği saptanmıştır (de Azevedo Mello ve ark., 2020).

Yang ve ark. (2021) Aminopiralid ve Pikloram herbisitleri degradasyonu ile oluşan azo türevlerinin akuatik türler üzerinde tehlikeli olabileceğini ileri sürmektedirler. Aminolopiralid'in akut toksisite (LD_{50}) ve oksidasyon ürünleri ve ekotoksik etki tahmini çalışmaları, degradasyon sırasında oluşan bileşiklerin balıklarda toksik etkili olabileceğini göstermektedir (Yang ve ark., 2021).

2,4-Diklorofenoksiasetik asit, Klorofenoksilik bileşikler sınıfından bir herbisit olup genotoksisitesi çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur. 2,4-D'nin 10, 20, 40 mg/L konsantrasyonlarının *Astyanax lacustris* üzerinde 24, 48, 72 saat muamelesi sonucunda, pestisitin kromozom aberasyonlarına sebep olduğu, mitotik indeksi düşürdüğü, DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Zafra-Lemos, Cusioli, Bergamasco, Borin-Carvalho, & de Brito Portela-Castro, 2021).

3.2.2. Asetolaktat Sentaz İnhibitörleri Herbisit Ailesi

Asetolaktat sentaz inhibitörleri, ALS'yi inhibe eden herbisit sınıfıdır (Saari, Cotterman, & Thill, 2018). Asetolaktat sentaz, ALS inhibitörü herbisitler düşük dozda uygulaması, memelilere karşı toksisitesinin az olması ve uygulama dönemindeki

esnekliklerden dolayı en fazla tercih edilen herbisit grubudur (Prado, De Prado, & Franco, 2004). Asetolaktat sınıfı herbisitler aminoasit inhibitör herbisitleri olarak adlandırılmıştır. Normal bitki gelişimini ve büyümesini sağlayan spesifik aminoasitlerin üretimini engellemek amacıyla özel bir enzim olarak görev alırlar (Baumann, 2008; Gunsolus & Curran, 1991).

Asetolaktat sentaz inhibitörleri herbisitleri grubuna dahil olan Triazoloprimidin herbisitleri, geniş yapraklı otların çıkış öncesi ve çıkış sonrası kontrolü için kullanılan herbisitlerdir. Florasulam, Triazolopirimidin ailesine ait bir herbisittir. Bu aileye ait diğer herbisitler Kloransulam-metil, Diklosulam, Flumetsulam, Metosulam, Penoksulam gibi herbisitlerdir. Triazolopirimidin ailesi, Sulfonamid grubuna dahil herbisitlerdir (Billington, Gehen, & Hanley Jr, 2010). Sulfonamid grubuna ait olan herbisitlerin birçoğu güçlü elektron çeken özelliklere sahip olmaları ile ilgi çekmektedir (Shibasaki ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2015). Tıbbi ve sentetik bileşiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chow & Odell, 2017). Ayrıca anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-malarial, anti-konvülsan, anti-HİV (Chandrasekhar ve ark., 2019), anti-bakteriyel (Stevens ve ark., 2016), anti-viral gibi birçok aktivite göstermektedir (Isaksson, Kumpiņa, Larhed, & Wannberg, 2016).

Florasulam'ın farklı canlı grupları üzerindeki genotoksik etkisinin farklı genotoksisite testleri ile araştırıldığı çalışma sayısı kısıtlıdır. Sulfonamid herbisitleri sınıfına dahil olan diğer herbisitlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.

Asetolaktat sentaz inhibitörleri herbisit ailesinin bitkisel dokularda toksisitesini belirlemek için yapılan çalışmalardan bazıları şunlardır;

Metosulam herbisitinin *Vicia faba* bitkisi üzerindeki sitotoksik potansiyelinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, Metosulam'ın bitkinin mitotik indeksini azalttığı, kromozomal sapma frekansını arttırdığı ve bitki köklerinde hücre bölünmesini inhibe ettiği, kromozomal anormallik frekansını arttırdığı bildirilmiştir (Badr, Zaki, Germoush, Tawfeek, & El-Tayeb, 2013).

U.S.E.P.A. tarafından non-karsinojenik ve non-mutajenik olarak sınıflandırılan Sulfentrazone ve Flumetsulam aktif içerikli pestisitlerin, *Allium cepa* metodu ile yapılan araştırmada tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi arttırdığı, mutajenik hasara neden

oldukları, proliferasyon kapasitesini arttırdığı bundan dolayı bu herbisitlerin mutajenik ve karsinojenik ajanlar olarak tekrar değerlendirilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Silveira, Ribeiro, de Castro Marcondes, & d'Arce, 2016).

Penoxsulam herbisitinin *Allium cepa* testi ile sitotoksik etkisi araştırılmış, Penoxsulam'ın kök büyümesi ve mitototik indeksi düşürdüğü, kromozom aberasyonlarına ve DNA hasarına neden olarak sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur (Liman & Özkan, 2019).

Asetolaktat sentaz inhibitörleri herbisit ailesinin hayvansal dokularda toksisitesini belirlemek için yapılan çalışmalardan bazıları şunlardır;

Sıçanlarda 500 mg/kg/gün subakut muamele proksimal tübüler epitelyum hücrelerde hasara neden olmuştur. Daha yüksek dozda muamelenin 1000 mg/kg/gün proksimal tübül hücreleri nekrozuna neden olduğu bildirilmiştir. Yine farelerde 1000 mg/kg/gün subkronik muamele renal toplayıcı kanal epitelyum hücrelerinde hipertrofiye neden olmuştur. Subkronik noel değeri farede 100 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. 1 ve 2 yıl süreli kronik toksisite testlerinde böbrek dokusunun etkilendiği, subkronik etkide görüle benzer sonuçlar elde edilmiştir. B6C3F1 farelerine 1000 mg/kg/gün konsantrasyonda 2 yıl muamelesi sonucu interkalar hücrelerde hipertrofi, renal epitelyum hücrelerde sitoplazmik lipit benzer mikrovakuol düşüşü, vücut ağırlığında düşüş, kolesterol trigliserit seviyesinde değişimler tespit edilmiştir. Diğer deney hayvanlarında karaciğer, böbrek, adrenal bezler Florasulam'ın hedef organları olarak tespit edilmiştir (Billington et al., 2010).

In vitro Bakteri Reverse Mutasyon testi (ames testi), in vitro sitogenetik test Çin Hamster Over hücreleri (CHO/HGPRT testi), sıçan lenfositlerinde in vitro Kromozom Averasyon Testleri, in vivo fare kemik iliği sitogenetik testlerde genotoksik potansiyel saptanmamıştır (Billington et al., 2010).

Cyprinus carpio balığında Penoxsulam maruziyetinin incelendiği bir çalışmada,7 gün boyunca Penoxsulam'a maruz bırakılan balıkların beynindeki AChE aktivitesinin arttığı, 21 ve 72 gün sonra ise AChE aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmiştir (Cattaneo ve ark., 2011).

Sulfuron-methyl pestisitinin pirinç bitkisi aracılığıyla salınım yaparak karıştığı göldeki *Geophagus brasilliensis* balığına etkisini araştırmak amacı ile yapılan çalışmada genotoksisitenin belirlenmesi için comet yöntemi ve MN testinden yararlanılmıştır. Comet yöntemi ile pestisit salınımına maruz kalan balıkların böbrek hücrelerinde genotoksik etkiler tespit edilmiştir. Ayrıca MN testi ile balıklarda pestisitin neden olduğu asetilkolinesteraz (AChE) aktivasyonunun inhibisyonu olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, bu pestisitin genotoksik olduğu ve balıklar için tehlikeli olduğu bildirilmiştir (Benincá ve ark., 2012).

Deniz midyelerindeki biyobelirteçlerin araştırıldığı bir çalışmada, *Mytilus galloprovincialis*'e Penoxsulam pestisitinin toksik etkileri incelenmiştir. Midyeler penoxsulam'a 0,1, 3, 5, 7, 15 ve 30 gün boyunca pestisitin EC_{50}'sinden (0.05g/L) 10 kat daha az konsantrasyona maruz bırakılmıştır. Pestisit maruziyetinin sonucunda midyelerde oksidatif stres ve lizozomal anormallikler ile DNA hasarı tespit edilmiştir (Patetsini, Dimitriadis, & Kaloyianni, 2013).

Sulfonamidler'in balık embriyolarına yönelik oluşturabileceği potansiyel riskleri değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, *Danio rerio* (zebra balığı) üzerinde Sulfonamidler ile yapılan toksisite testinde antibakteriyel Sulfonamidler'in biyotoksisitesi, düşük konsantrayonları, embriyolar üzerinde öldürücü olan ve öldürücü olmayan etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, Sulfonamidler'in spontan maruziyetinin belirgin toksik etkilere neden olduğunu göstermiştir Zebra balığı embriyolarında 0.001mg/L Sulfonamid konsantrasyonunda ve 96 saat maruz bırakılan larvalar ve kontrol grubundaki larvalar arasında önemli farklar kaydedilmiştir. Düşük Sulfonamid konsantrasyonuna maruz bırakılan deneklerde malformasyon, perikardiyal ödem, yolk kesesi ödemi, hemoglutinasyonlar, kuyruk deformasyonları ve yüzücü mesanede kusurlar geliştiği tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları Sulfonamidlerin zebra balığı için toksik olduğu tespit edilmiştir (Lin, Chen, & Chen, 2013).

Danio rerio (zebra balığı) üzerinde yapılan bir toksisite çalışmasında, üç çeşit Sulfonamid'in zebra balığı üzerindeki potansiyel genotoksik etkileri araştırılmıştır. Test edilen Sulfonamidler'in balıklar üzerinde belirgin etkilere neden olduğu, balıkların Sulfonamid maruziyetine zamana bağlı tepkiler gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda Sulfodiazin (SDZ) adlı Sulfonomid'in metabolik enzim indükleyicisi olduğu

ve sucul ekosistemler için potansiyel toksikolojik risk olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, balıklarda kalp atış hızındaki değişimler Sulfonamid'lerin toksik etkileri için hassas göstergeler olarak tespit edilmiştir (Lin, Yu, Chen, & Chen, 2014).

Penoxsulam herbisitinin Asetilkolinesteraz, Tiyobarbitürik asitle reaktif maddeler ve protein karbonil üzerindeki toksik etkileri gümüş yayın balığı (*Rhamdia sp.*) ve sazanda (*Cyprinus carpio*) incelenmiştir. Asetilkolinesteraz aktivitesinin hem beyin hem de kas dokusunda inhibe edildiği, inhibisyonun sazanda, gümüş yayın balığından daha büyük olduğu bildirilmiştir. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin, gümüş yayın balığının beyin dokusunda azaldığı, ancak sazan balığının beyin dokusunda arttığı kaydedilmiştir. Ayrıca MDA'nın gümüş yayın balığının kas dokusunda önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Oksidatif hasarın bir başka ölçüsü olan protein karbonil seviyeleri, her iki balık türünün de beyninde ve sazan balığının kas dokusunda arttığı gözlenmiştir. Gümüş yayın balığının Penoxsulam toksisitesine karşı sazandan daha iyi savunma mekanizmalarına sahip olduğu bildirilmiştir (Murussi ve ark., 2014).

Triazolopirimidin herbisit sınıfındaki diğer herbisitlerin genotoksik etkileri bazı sucul organizmalarla yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Aynı gruptan Penoxsulam herbisiti *Procambarus clarkii* (kerevit) üzerinde 20–40 µg/L konsantrasyonlarda çalışılmış, comet test metodu ile genotoksik etkisi ortaya konmuştur (Costa, Pereira, Santos, Pacheco, & Guilherme, 2018).

Sulfonamid sınıfında bulunan herbisit olan Penoxsulam herbisitinin *Oreochromis niloticus* üzerinde 96 saat LC_{50} değeri 8,948 mg/L olarak saptanmıştır. LC_{50} değerinin 1/5 ve 1/10 konsantrasyonuna maruz bırakılan balıklarda hematolojik indekslerin değiştiği, immunotoksik etki gösterdiği, oksidan ve antioksidan dengesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Galal, Reda, & Mohamed, 2018).

Su yabani otlarını kontrol etmek için kullanılan herbisitin toksik etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada Penoxsulam herbisiti *Hypomesus transpacificus* balığında test edilmiştir. Çalışmada, balık beyninde Asetilkolinesteraz(AChE) aktivitesi ölçüldü. Balıklar Penoxsulam'a 6 saat maruz bırakıldıktan sonra Penoxsulam herbisitinin hem erkek hem de dişi balıklarda beyin AChE aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Jin ve ark., 2018).

Triazolopyrimidin sınıfı gibi asetolaktatsentaz inhibisyonuna neden olan Sulfonilurea grubu herbisiti Pyrazonesulforon-etil tatlı su balığı *Oreochromis mossambicus* üzerinde akut muamelesinin hematolojik ve biyokimyasal parametleri etkilediği, subletal seviyelerde doza ve zamana bağlı total eritrosit sayısında, hemoglobin miktarında, lökosit sayısında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Solungaç, karaciğer ve böbrek dokularında histolojik değişimlere neden olduğu bildirilmiştir. Balıkların kan eritrosit analizlerinde MN frekansında ve diğer morfolojik anormalliklerde artışa neden olarak klastojenik ve anojenik genotoksik potansiyel etkisi tespit edilmiştir. Balık eritrositlerinde zamana ve doza bağlı MN frekansında artış gözlenmiş, 7 ve 14 gün muamele sonrası eritrositlerde apoptozis oranının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Upadhyay, 2019).

BÖLÜM 4

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1.Test Organizmasının Toplanması

Çalışmada kullanılan test materyali *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859) (Cyprinodontiformes; Poeciliidae), Trakya Üniversitesi, Balkan Yerleşkesi göletinden (41°38'45"N, 26°37'21"E) kepçe yardımı ile toplanarak, Deney Hayvanları Birimi, Sucul Deney Hayvanları Laboratuvarına getirildi. Balıkların iki hafta boyunca laboratuvar şartlarında 20-21 °C de 100 litrelik akvaryumlarda, aktif karbon filtreden geçirilen ve klorize, havalandırılmış şebeke suyunda 2 hafta boyunca adaptasyonu sağlandı. Akvaryum suyunun çözünmüş oksijen, pH ve ısı parametreleri günlük olarak ölçüldü. Balıkların ortalama boy ve ağırlıkları 0.14±0.1 (ort.±SS) g ve 23.9±3.5 (ort±SS) mm olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun TÜHADYEK-2019/21 protokol numaralı 2019/08/01 kararı ile onaylanmıştır.

4.2. Florasulam Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi

Florasulam herbisitinin önceki çalışmalardan elde edilen LC_{50} konsantrasyonu olan 100 mg/L'nin 1/4 oranında seyreltilmiş konsantrasyonu (25 mg/L) in vivo olarak *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat olmak üzere toksik etkisi araştırılmıştır.

Deneyde Florasulam ((CAS: 145701-23-1. Sigma-Aldrich), (N-(2, 6-Difluorophenyl)-8-fluoro-5-methoxy-[1, 2, 4]triazolo[1, 5-c]pyrimidine-2-sulfonamide)) kullanılmıştır. Balıklara, musluk suyu (negatif kontrol) ve 25 mg/L konsantrasyonda Florasulam içeren akvaryumlarda 24, 48, 72 saat süre ile muamele edilmiştir.

4.3. Aminopiralid Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi

Aminopiralid herbisitinin önceki çalışmalardan elde edilen LC_{50} konsantrasyonu olan 100 mg/L'nin 1/4 oranında seyreltilmiş konsantrasyonu (25 mg/L) in vivo olarak *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat olmak üzere toksik etkisi araştırılmıştır. Deneyde Aminopiralid ((CAS no: 150114-71-9. Sigma-Aldrich),(2-pyridine carboxylic acid, 4-amino-3,6-dichloro)) kullanılmıştır. Balıklara, musluk suyu (negatif kontrol) ve 25 mg/L konsantrasyonda Aminopiralid içeren akvaryumlar da 24, 48, 72 saat süre ile muamele edilmiştir.

4.4. Ticari formülasyonun *Gambusia holbrooki* Üzerinde Test Edilmesi

Aminopiralid ve Florosulam herbisitlerinin Ticari formulasyonunun (Lancelot® Super**)** *Gambusia holbrooki* (sivrisinek balığı) üzerindeki genotoksik etkileri incelenmiştir.

Yapılan ön çalışma ile Lancelot® Super'in *Gambusia holbrooki* üzerinde 72 saat LC_{50} değeri hesaplandı. Buna göre, Lancelot® Super geniş konsantrayon aralığı (0-600 mg/L) *Gambusia holbrooki* üzerinde 72 saat muamele edilerek LC_{50} değeri 300 mg/L olarak hesaplanmıştır. Tespit edilen LC_{50} konsantrasyonunun 1/2, 1/4, 1/8 oranında sulandırılmış konsantrasyonları test organizması üzerinde araştırılmıştır. Çalışmada bir negatif kontrol grubu, üçü farklı dozaj grubu olmak üzere toplam 4 grupta Lancelot® Super *Gambusia holbrooki* üzerinde toksik etkisi test edilmiştir. Birinci dozaj grubu 37,5 mg/L, ikinci dozaj grubu 75 mg/L ve üçüncü dozaj grubu 150 mg/L olmak üzere Lancelot® Super dozaj grubları oluşturularak 24, 48, 72 saat muameleler sonrası genotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

4.5. Preparatların Hazırlanması ve İncelenmesi

24, 48, 72 saat süre maruz bırakılan her gruptan 3'er balık buz üzerinde soğuk şok immobilizasyonunun hemen ardından, kranial maserasyonla ötenazi uygulandı ve

balık kaudal venadan kan süprüntüleri alınarak preparatlar hazırlandı (J. A. Jenkins, J. G. Nickum, the, & Bart, 2014).

Kaudal venadan alınan kan süprüntüleri ile hazırlanan preparatlar havada 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı. 24 saat havada kurutulmasının ardından preparat yıkama kabına preparatlar alındı ve metanol ile 10 dakika boyunca fiske edildi, ardından preparatlar kurutulmak üzere tekrar 24 saat havada bırakıldı. Preparatların havada kurutulma işlemi tamamlandığında, preparatları ışık ve floresan mikroskobunda incelemek için ayrı ayrı tampon çözelti ve boyalar hazırlandı.

Işık ve floresan mikroskobunda incelemek için ayrı boyalar kullanılırken, kullanılan tampon aynıdır. Tampon olarak Sorensen Fosfat Tampon'u kullanıldı. Sorensen Fosfat Tomponu'nu hazırlamak için iki ayrı solüsyon hazırlandı. Solusyonlar A ve B solusyonu olarak adlandırılır. A solüsyonu 3,12 gr $NaH_2PO_4.2H_2O$ bileşimine 100 ml distile su eklenerek, B solüsyonu ise 2,84 gr Na_2HPO_4 bileşimine 100 ml distile su eklenerek ayrı ayrı karıştırma kaplarında iyince çözüldü. Karışımlar çözüldükten sonra A solüsyonundan 51 ml, B solüsyonundan 49 ml ve karışımın pH'ı 6,8 olacak şekilde ayrı bir karıştırma kabında birleştirildi.

4.5.1. Işık Mikroskobunda İncelenecek Preparatların Hazırlanması

Hazırlanan Sorensen fosfat tamponundan 80 ml preparat boyama kabına aktarıldı ve üzerine 1,5 ml Giemsa boya eklendi. İyice karıştırılarak preparatlar boyanmak üzere kaba aktarıldı. Preparatlara 20 dakika boyama işlemi uygulandı. Boyama işleminin ardından preparatlar boyama kabından çıkartıldı ve baş aşağı olacak şekilde havada kurutuldu.

4.5.2. Floresan Mikroskobunda İncelenecek Preparatların Hazırlanması

Hazırlanan Sorensen fosfat tamponundan 80 ml preparat boyama kabına aktarıldı ve Soresen'in fosfat tamponunda hazırlanan Akridin Turuncusu (AO; 0.01 g/100 ml) ile boyandı. Preperasyon Ueda ve ark. göre yapıldı (Ueda ve ark., 1992).

4.6. Nükleer Anormaliler, Mikronükleus, PCE ve NCE Sayımı

Sitoplazmalarında ribozom içeren olgunlaşmamış eritrositler PCE olarak kabul edilir. Sitoplazmalarında ribozom bulunmayan olgun eritrositler NCE olarak kabul edilir. PCE'ler sitoplazmadaki akridin turuncusunu kırmızımsı bir renkle yansıtan RNA nedeniyle NCE'lerden farklı şekilde boyanır(Suzuki ve ark., 1989).

Balık eritrositlerinde çentikli, loblu, tomurcuk çekirdeklerin, MN, binükleus, PCE ve NCE sayıları tespit edilir (Velmurugan, Selvanayagam, Cengiz, & Unlu, 2007). NA'lar, Carrasco ve arkadaşlarına göre sınıflandırıldı (Carrasco et al., 1990). Eritrositlerin nükleer membranında gözlenen içe doğru çökmeler tomurcuk nükleus olarak tanımlanmıştır. Eritrositlerde tomurcuk nükleuslardan daha fazla gözlenen içe doğru çöküntülü eritrositler ve çok sayıda gözlenen loblar loblu nükleus olarak tanımlandı. Vakuol içeren ve hücre zarının içeriye doğru keskin girintisi çentik nükleus olarak tanımlanır. MN ana çekirdek ile aynı boyama modelini gösteren dairesel küçük kromatin materyali içeren küçük nükleuslardır. Ana nükleusun üçte bir veya beşte bir çapından daha küçük, nükleusla aynı renkte boyanan, sitoplazma içindeki yapılar MN olarak kabul edilir (Alsabti & Metcalfe, 1995).

PCE frekansı Pacheco ve Santos'a göre şu şekilde hesaplandı (M. Pacheco & Santos, 2002).

$$\text{PCE frequency (‰)} = \frac{\text{No. PCEs}}{\text{No.PCEs+NCEs}} \times 1000$$

MN ve NA'ların her 1000 hücredeki frekansları belirlendi (‰). Muamele ve kontrol gruplarının ortalama değerleri arasındaki istatistiksel farklılık, Student t-testine göre, muamele süreleri arasındaki farklılık TUKEY testine göre belirlendi. ($p < 0.05$ anlamlılık seviyesine göre).

BÖLÜM 5

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

5.1. Ticari formülasyonun Farklı Konsantrasyonlarının *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları

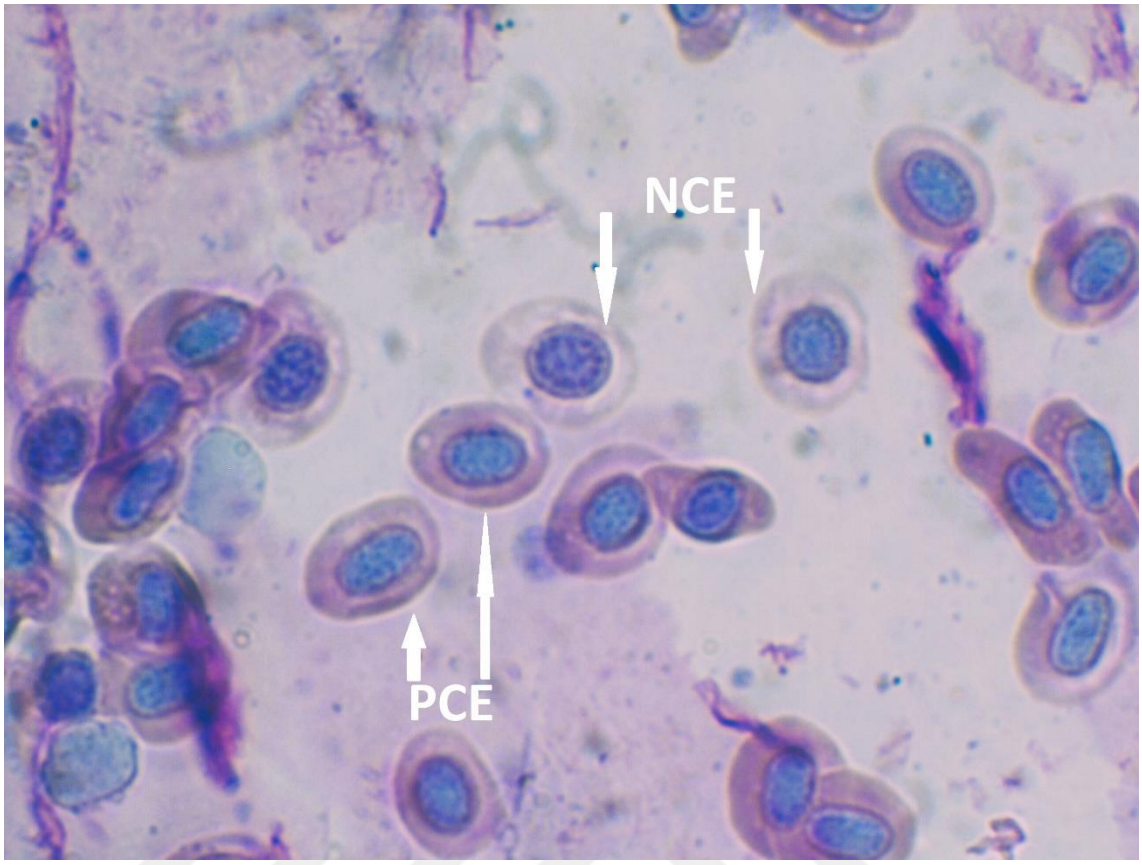
Çalışmamız sonucunda Lancelot® Super herbisitinin *Gambusia holbrooki* üzerinde sebep olduğu nükleer anormalliklerin incelenmesi ile, çentik, lob, tomurcuk, MN ve binükleatlar saptanmıştır. Tespit edilen anormalliklerin görüntüleri Şekil 5.1. ve Şekil 5.2'de verilmiştir.

Gözlenen anormalliklerin 37,5 mg/L, 75 mg/L ve 150 mg/L konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Konsantrasyonlar ve muamele süresi arttıkça, total anormallik frekansında kontrole göre anlamlı artış olduğu saptanmıştır. 24 ve 72 saat muamele gruplarında tüm konsantrasyonlarda, 48 saat muamele grubunda 75-150 mg/L konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Anormallikler incelendiğinde diğerlerine oranla en fazla görülen anormalliğin çentik frekansında saptandığı, çentik frekansının zamana ve konsantrasyonlara bağlı olarak artış gösterdiği; 24 saatlik sürede 37,5 mg/L, 75 mg/L ve 150 mg/L konsantrasyonlarda, 48 saatlik sürede 75mg/L, 150 mg/L konsantrasyonlarda ve 72 saatlik sürede 150 mg/L konsantrasyonda kontrol gruplarına göre anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir.

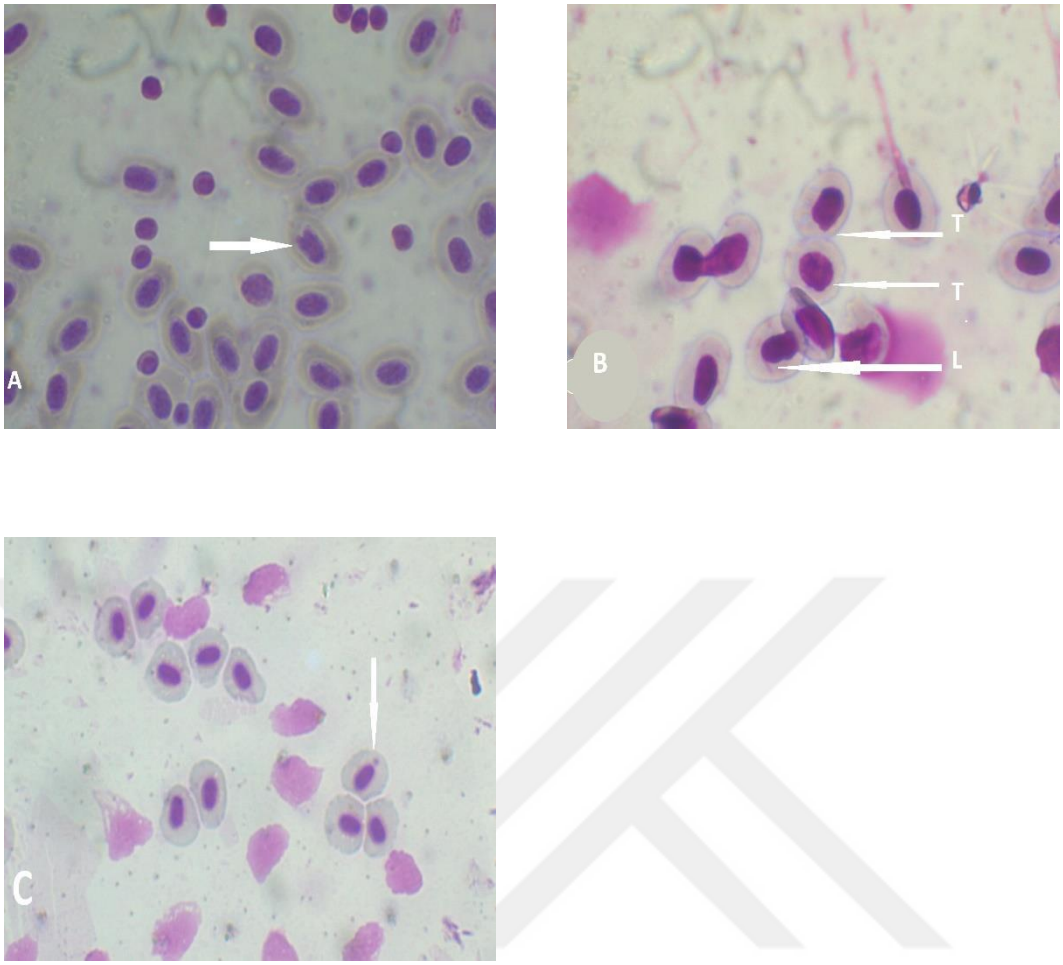
Lob frekansının 48 ve 72 saatlik sürenin 150 mg/L konsantrasyonunda anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır.

Binükleus frekansının 24 saat ve 48 saatlik sürelerde kontrol ve konsantrasyon gruplarında artmış olduğu ancak bu artışın anlamlı olmadığı; 72 saat sürede ise 37,5 mg/L ve 150 mg/L konsantrayonlarında kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu saptanmıştır.

MN frekansının tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. Tomurcuk frekansı 72 saat sürelerde, kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Lancelot® Super herbisiti muamelesi sonrası MN ve tomurcuk frekansının 24, 72 saat muamelesinde MN frekansı ile tomurcuk frekansı arasındaki korelasyonun çok yüksek olduğu saptanmıştır (Pearson korelasyon; 0,99). Lancelot® Super muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği Şekil 5.3.'te verilmiştir.



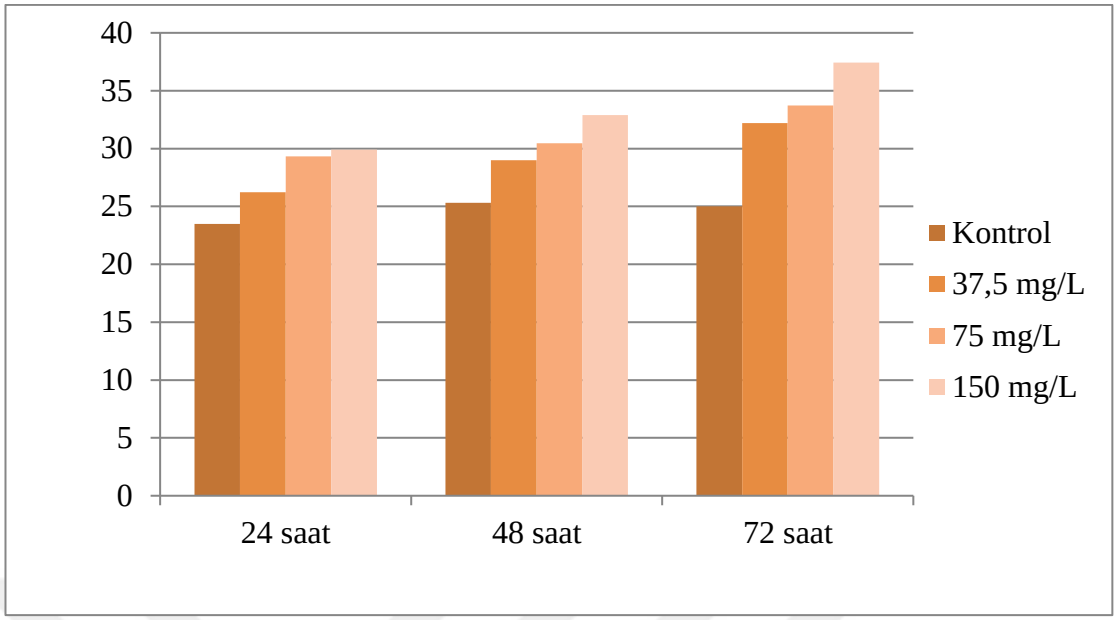
Şekil 5.1. Polikromatik ve normakromatik eritrositlerin ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 5.2. Nükleus anormalliklerinin ışık mikroskobu görüntüleri (A: Çentik anormalliği, B: Lob (L); Tomurcuk (T) anormallikleri, C: Mikronükleus anormalliği,)

Lancelot® Super	Total Anormallik Frekansı (‰)	Çentik Frekansı (‰)	Lob Frekansı(‰)	Mikronükleus Frekansı(‰)	Tomurcuk Frekansı(‰)	Binükleat Frekansı(‰)
24 saat						
Kontrol	23,50±0,76	13,93±0.81	4,81±0,21	0,41±0,14	3,65±0,48	0,69±0,42
37,5 mg/L	*26,23±1,33	*15,87±0.21	5,36±0,40	**1,01±0,16	3,05±0,63	0,92±0,21
75 mg/L	**29,33±1,58	*18,05±1.54	4,99±0,63	**1,24±0,13	3,60±0,41	1,43±0,57
150 mg/L	***29,90±0,56	*17,53±0.45	4,99±0,84	**1,47±0,42	4,44±0,56	1,51±0,43
48 saat						
Kontrol	25,30±1,39	15,22±1,16	4,81±0,21	0,45±0,08	3,74±0,41	1,06±0,08
37,5 mg/L	29,00±2,81	17,44±1,24	4,85±0,77	**1,47±0,20	4,02±0,49	1,20±0,52
75 mg/L	*30,45±2,59	*17,72±0,16	5,04±0,44	**1,84±0,56	4,67±1,26	1,17±0,25
150 mg/L	***32,94±0,68	*17,5±0,90	*6,3±0,56	***2,56±0,34	3,84±0,69	2,26±0,80
72 saat						
Kontrol	25,02±0,49	15,83±1,10	4,53±0,56	0,55±0,14	3,09±0,68	1,01±0,21
37,5 mg/L	**32,19±2,30	18,00±1,11	5,59±0,42	***2,17±0,16	4,62±0,71	*1,80±0,24
75 mg/L	*33,73±3,78	17,91±0,84	5,96±0,73	***2,26±0,21	4,62±0,98	2,96±2,41
150 mg/L	***37,43±0,85	**19,48±0,69	**7,07±0,63	***3,28±0,42	*5,32±0,90	*2,26±0,62

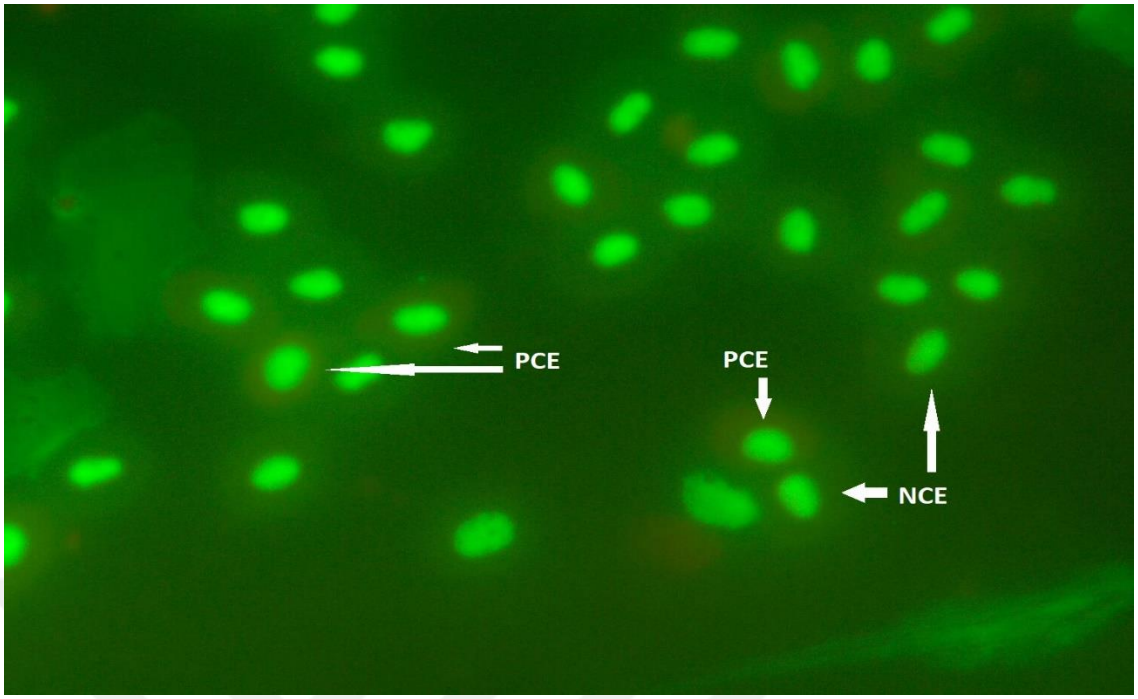
Çizelge 5.1. Ticari formülasyonun 37,5 mg/L, 75 mg/L, 150 mg/L konsantrasyonlarda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları (t-test *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001)



Şekil 5.3. Lancelot® Super muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği

5.2. Aminopiralid Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları

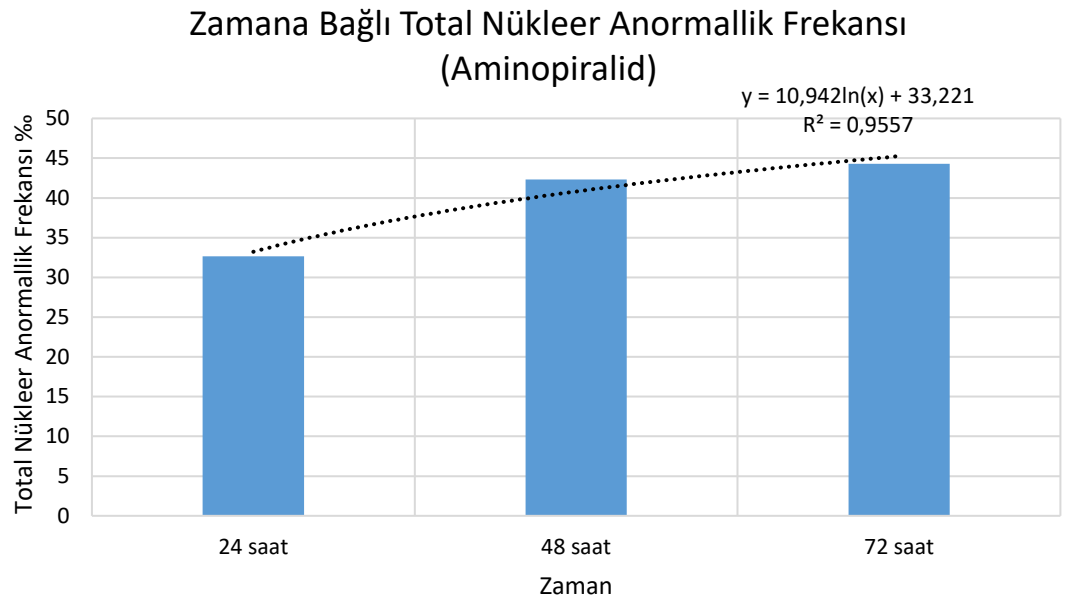
Bu çalışmada Aminopiralid herbisiti 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia. hoolbroki* sivrisinek balıklarına muamele edilerek 24, 48 ve 72 saat sonra alınan örneklerden sürtme kan preparatları hazırlanmış, nükleer anormallikler incelenmiş ve nükleer anormallik frekansları saptanmıştır. Nükleer anormalliklerin incelenmesi sonucunda, çentik, lob, tomurcuk, MN, binükleatlar ve PCE'ler tespit edilmiştir. PCE ve NCE'lerin görüntüleri Şekil 5.4.'te verilmiştir. Çentik ve lob frekansında kontrole göre 48 ve 72 saatte anlamlı artış olduğu, tomurcuk frekansının 24 ve 48 saatteki kontrollere göre anlamlı, MN ve binükleat frekansında da 24, 48 ve 72 saat sonrası kontrole göre anlamlı artışının olduğu tespit edilmiştir. Nükleer anormallik frekansları Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir. Total anormallikler incelendiğinde 48 ve 72 saatte anlamlı artış gözlenmiştir. Total Nükleer anormallik frekansında zamanla artış gözlenmiştir (Şekil 5.5.) (Pearson korelasyon testi; ,935). PCE frekansında ise 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde, bu sürelerin kontrol gruplarına göre anlamlı artış tespit edilmiştir, PCE frekansı grafiği Şekil 5.6'da verilmiştir.



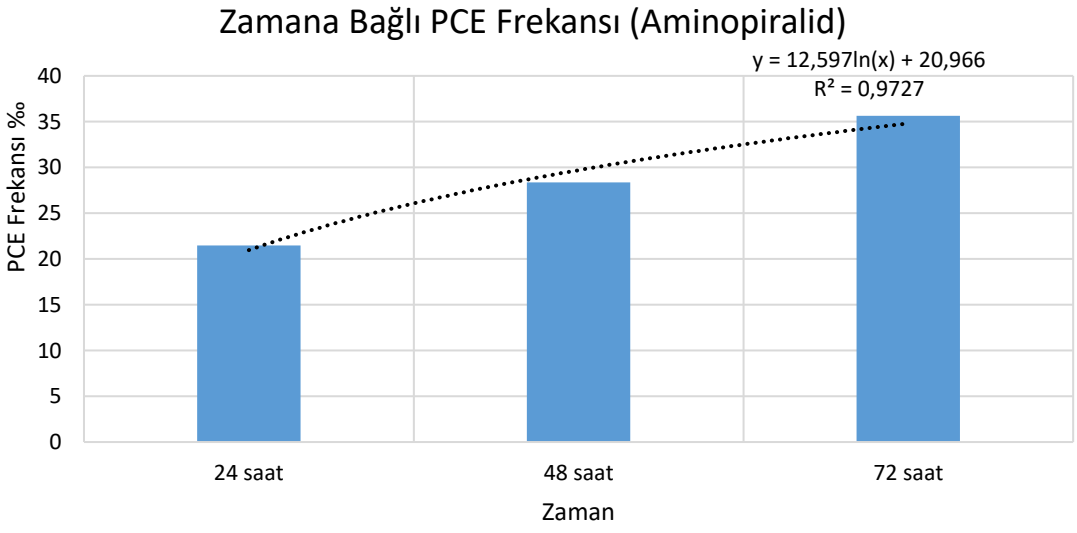
Şekil 5.4. Polikromatik ve normakromatik eritrosit floresan mikroskop görüntüleri

Aminopiralid	Total anormallik frekansı (‰)	Çentik frekansı (‰)	Lob frekansı(‰)	Tomurcuk frekansı(‰)	Micronukeus frekansı(‰)	Binukleat frekansı(‰)	PCE Frekansı(‰)
24 saat							
Kontrol	29,4±6,0	16,5±2,9	8,1±2,3	4,0±1,5	0,4±0,6	0,42±0,6	7,31±0,93
25 mg/L	32,7±6,2	16,3±3,1	7,3±2,7	*5,8±2,3	*1,3±1,3	**2±1,3	***21,46±3,39
48 saat							
Kontrol	29,6±5,1	15,2±3,8	7,3±2,2	5,6±1,3	0,6±0,6	0,8±0,6	8,55±1,23
25 mg/L	***42,3±9,3	*19,3±3,8	*10,1±3,2	**8,2±3,5	**2±1,6	***2,8±1,5	***28,36±2,33
72 saat							
Kontrol	31,3±8,5	16,0±4,1	7,7±2,8	5,8±2,0	0,8±1,0	0,8±1,0	10,86±2,03
25 mg/L	**44,3±10,1	*20±4,1	*10,8±3,5	7±3,2	***3,3±1,8	***3,2±1,8	***35,65±4,57

Çizelge 5.2. Aminopiralid'in 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları (t-test *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001)



Şekil 5.5. Aminopiralid muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği (Pearson korelasyon testi; ,935)



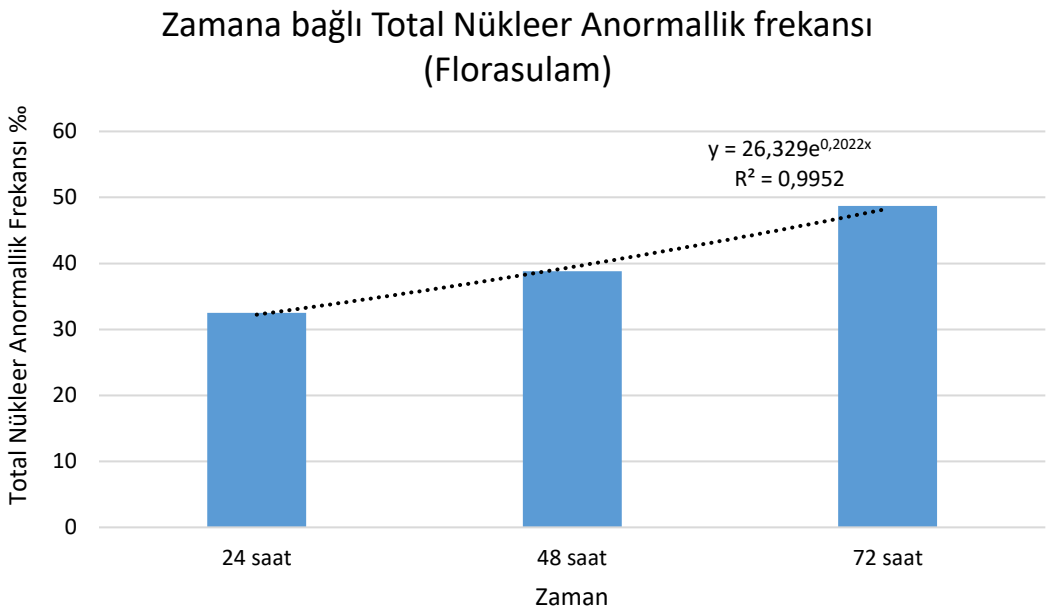
Şekil 5.6. Aminopiralid muamelesi sonrası gözlenen PCE frekansının zamana bağlı artış grafiği (Pearsonkorelasyon testi; 0.90)

5.3. Florasulam Herbisitinin *Gambusia holbrooki* Üzerindeki Muamele Sonuçları

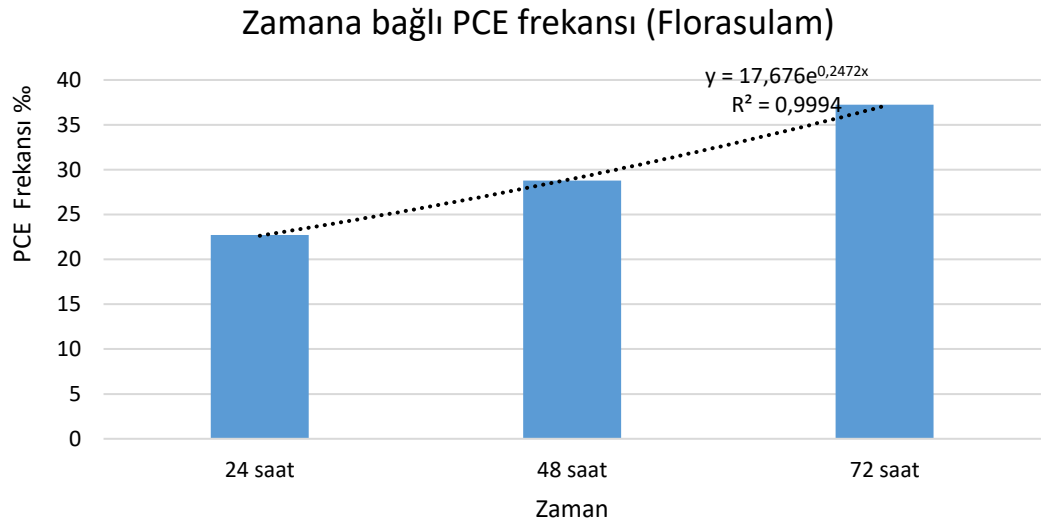
Bu çalışmada Florasulam herbisiti 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia hoolbroki* sivrisinek balıklarına muamele edilerek 24, 48 ve 72 saat sonra alınan örneklerden sürtme kan preparatları hazırlanmış, nükleer anormallikler incelenmiş ve nükleer anormallik frekansları saptanmıştır. Nükleer anormalliklerin incelenmesi sonucunda, çentik, lob, tomurcuk, MN, binükleatlar ve PCE'ler tespit edilmiştir. Gözlemlenen anormalliklerin frekansları Çizelge 5.3.'de verilmiştir. Çentik, tomurcuk, MN, binukleat frekanslarında kontrole göre 48 ve 72 saatte anlamlı artış olduğu, lob frekansında 72 saat sonra anlamlı artış olduğu, PCE frekansında ise 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde, bu sürelerin kontrol gruplarına göre anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (Pearson korelasyon testi; ,992). Total anormallikler incelendiğinde 24, 48 ve 72 saatte kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Total nükleer anormallik frekans grafiği Şekil 5.7.'de, zamana bağlı PCE frekans grafiği 5.8.'de verilmiştir. Zamana bağlı olarak MN frekansı ve tomurcuk frekansı artışı anlamlı ilişki göstermektedir (Pearson korelasyon; 0,96).

Florasulam	Total anormallik frekansı (‰)	Çentik frekansı (‰)	Lob frekansı(‰)	Tomurcuk frekansı(‰)	Micronukeus frekansı(‰)	Binukleat frekansı(‰)	PCE frekansı (‰)
24 saat							
Kontrol	27,3±3,4	14,8±2,2	7,5±1,8	4,0±1,2	0,6±0,7	0,4±0,6	6,48±0,93
25 mg/L	*32,5±7,3	16,8±3,1	7,8±2,3	*5,8±2,2	1,0±1,1	1,1±1,0	***22,71±2,78
48 saat							
Kontrol	27,5±4,8	14,4±2,3	7,1±2,9	5,2±1,5	0,4±0,6	0,4±0,6	9,83±1,22
25 mg/L	**38,8±9,8	*17,3±3,8	9,6±3,5	**8,1±2,9	**2,1±1,4	**1,8±1,1	***28,78±3,43
72 saat							
Kontrol	31,3±1,8	16,0±2,4	8,3±2,0	5,4±1,5	0,6±0,7	0,8±1,0	11,08±1,99
25 mg/L	***48,7±8,9	*19,6±3,5	**12,0±3,3	***11,6±3,5	***2,4±1,2	**3,1±1,6	***37,23±3,28

Çizelge 5.3. Florasulam'ın 25 mg/L konsantrasyonda *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat süreler sonunda kan dokuda gözlenen nükleer anormalliklerin frekansları (t-test *P≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001)



Şekil 5.7. Florasulam muamelesi sonrası gözlenen total nükleer anormalliklerin zamana bağlı artış grafiği (Pearson korelasyon testi; ,992).



Şekil 5.8. Florasulam muamelesi sonrası gözlenen PCE frekansının zamana bağlı artış grafiği (Pearsonkorelasyon testi; 0,88)

BÖLÜM 6

6. TARTIŞMA

Aminopiralid ve Florasulam herbisitlerinin ticari formülasyonu olan Lancelot® Super herbisitinin 37,5 mg/L, 75 mg/L, 150 mg/L konsantasyonlarının 24, 48 ve 72 saat sürelerle *Gambusia holbrooki* üzerindeki muamelesi sonrası NA'lar saptanmıştır. Belirlenen NA'ların total anormallik frekansının zaman ve konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Lancelot® Super'in etken maddelerinden biri olan ve oksin herbitleri sınıfına ait olduğu bilinen Aminopiralid herbisitinin 25 mg/L konsantrasyonunun *Gambusia holbrooki* üzerinde 24, 48, 72 saat sürelerle genotoksik etkisinin araştırıldığı bu çalışmada nükleer anormalliklerin incelenmesi sonucu çentik, lob, tomurcuk, MN ve binükleatlar tespit edilmiştir. Gözlemlenen nükleer anormalliklerin zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Nükleer anormalliklerin zamana göre artışı Aminopiralid'in potansiyel genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim Aminopiralid ile yapılan diğer çalışmalarda da benzer şekilde Aminopiralid herbisitinin genotoksik olduğu saptanmıştır. Aminopiralid in vitro ames testi, CHO/HGPRT, in vivo fare MN testlerinde negatif sonuç vermesine rağmen, in vitro sıçan lenfosit kromozom aberasyon testinde pozitif sonuç verdiği, klastojenik etkili olduğu ileri sürülmektedir (USEPA, 2005). Aminopiralid'in akut toksisite (LD_{50}) ve oksidasyon ürünleri ile ekotoksik etki tahmini çalışmaları, degradasyon sırasında oluşan bileşiklerin balıklarda toksik etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Yang et al., 2021).

Benzer şekilde Aminopiralid herbisitinin dahil olduğu oksin grubu herbisitleri ile yapılan çalışmalarda genotoksik potensiyaline ilişkin yayınlar bulunmaktadır. Oksin herbisitlerinin balıklar üzerinde kısa sureli (De Arcaute et al., 2016) ve uzun sureli muameleleri sonucu genotoksik etkiler tespit edilmiştir. Oksin herbisitlerinin *Boana pullchella* kurbağa yavruları üzerinde 96 saat süre sonunda MN frekansını arttığı kaydedilmiştir (Natale et al., 2018). Benzer şekilde, yaptığımız çalışmada da MN frekansının zamana bağlı olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği saptanmıştır. Oksin herbisit ailesine ait olan Pikloram ile yapılan bir çalışmada, *Rhinella arenarum* (kurbağa) larvaları eritrositlerinde nükleer anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir (Lajmanovich et al., 2013). Oksin herbisit grubuna dahil olan bir diğer herbisit 2,4-Diklorofenoksiasetik asit, klorofenoksilik bileşikler sınıfından bir herbisit olup genotoksisitesi çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur. 2,4-D'nin 10, 20, 40 mg/L konsantrasyonlarının *Astyanax lacustris* üzerinde 24, 48, 72 saat muamelesi sonucunda, pestisitin kromozom aberasyonlarına sebep olduğu, mitotik indeksi düşürdüğü, DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Zafra-Lemos et al., 2021), 2,4-D ve 2,4-D içeren ticari ürünlerin CHO-K1 (Çin hamster over) hücrelerinde 6-10 mg/L aralığında genetik hasara neden olduğu, ticari formülasyonu ile hücre bölünmesi üzerinde etkili olduğu, her iki formülasyonun da CHO hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik etkili oldukları bildirilmiştir (Laborde et al., 2020). In vivo Wistar farelerinde 2,4-D kronik muamelesi MN ve DNA hasarını indüklemiştir (de Azevedo Mello et al., 2020).Benzer şekilde *Gambusia holbrooki* üzerinde yaptığımız çalışmada da Aminopiralid'in 24, 48, 72 saat muamelesi sonucunda genotoksik olduğu, NA'lere sebebiyet verdiği ve MN frekansını arttırdığı saptanmıştır.

Bakteri ve hayvan sistemleri kullanılarak 2,4-D ve Dikamba gibi oksin herbisitlerinin; MN oluşumunu arttırdığı (Holland et al., 2002), kromozom aberasyonlarına sebebiyet verdiği (Amer & Aly, 2001), kardeş kromatid değişimlerini arttırdığı (González et al., 2006; Soloneski et al., 2007), *Drosophila melangoster*'de somatik mutasyon oluşturduğu (Kaya et al., 1999) ve ames testiyle belirlenen gen mutasyonları meydana getirdiği saptanmıştır (Charles et al., 1999). *Cnesterodon decemmaculates* balığında Dikamba'nın DNA tek zincir kırılmasını arttırdığı, genomik kararsızlık meydana getirdiği saptanmıştır (de Arcaute et al., 2014, 2016).

Lancelot® Super'in etken maddelerinden diğeri olan ve Triazolopirimidin sınıfına dahil olduğu bilinen Florasulam'ın *Gambusia holbrooki (Girard 1859)* üzerinde 25 mg/L konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saatlik genotoksik etkisinin araştırıldığı bu çalışmada nükleer anormalliklerin incelenmesi sonucu çentik, lob, tomurcuk ve binükleatlar tespit edilmiştir. Meydana gelen nükleer anormallikler konsantrasyon ve muamele süresine bağlı olarak kontrol grubuna göre artış göstermiştir.

Florasulam herbisitinin sıçan ve fareler üzerinde oral yolla genotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, proksimal tübül epitelyum hücrelerinde hasara neden olduğu, renal toplayıcı kanal epitelyum hücrelerinde hipertrofiye neden olduğu belirlenmiştir. (Billington et al., 2010).

Florasulam herbisitinin dahil olduğu Triazolopirimidin herbisit sınıfındaki diğer herbisitlerin sucul organizmalarda benzer genotoksik etkili oldukları önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Aynı gruptan Penoxsulam herbisitinin *Procambarus clarki* (kerevit) üzerinde 20–40 µg/L konsantrasyonlarda comet test metodu ile genotoksik etkili olduğu (Costa et al., 2018), *Mytilus galloprovincialis* (midye) üzerinde oksidatif stres ve lizozomal anormallikler ile DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Patetsini et al., 2013). Sulfuron-methyl pestisitinin *Geophagus brasilliensis* balığına etkisinin comet yöntemi ile incelendiği bir çalışmada, pestisit salınımına maruz kalan balıkların böbrek hücrelerinde genotoksik etkiler tespit edilmiştir (Benincá et al., 2012). Triazolopirimidin sınıfı gibi asetolaktatsentaz inhibisyonuna neden olan Sulfonilurea grubu herbisiti olan Pyrazonesulforon-etil'in tatlı su balığı *Oreochromis mossambicus* üzerindeki muamelesi, balıkların kan eritrosit analizlerinde MN frekansında ve diğer morfolojik anormalliklerde artışa neden olarak klastojenik ve anojenik genotoksik potansiyel etkisi tespit edilmiştir (Upadhyay, 2019). Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde MN frekansında zamana ve doza bağlı artış olduğu kaydedilmiştir. Triazolopirimidin grubu herbisitleri sucul organizmalar ve hayvansal dokular üzerinde benzer genotoksik etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde çalışmamızda, Florasulam ve Lancelot® Super'in *Gambusia holbrooki* balığına muameleleri sonucunda zamana bağlı olarak MN frekansı ve tomurcuk frekansı arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir (Florasulam Pearson korelasyon; 0,96), (Lancelot® Super Pearson korelasyon; 0,99). Yapılan çalışmalar

nükleus tomurcuklanması ile MN oluşumu arasında paralel bir artışın olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar nükleus tomurcuklanmasını, gen amplifikasyonu oluşumu ve çift iplik DNA kırılmaları neticesinde kırılma-birleşme-kırılma siklusu olarak tanımlamışlardır (Fenech & Crott, 2002).

Bu çalışmada Florasulam ve Aminopiralid herbisitlerinin 25 mg/L konsantrasyonlarının 24, 48, 72 saat sürelerle *Gambusia holbrooki* üzerindeki muamelesi sonucu, olgun olmayan eritrositlerin dolaşıma salınmasından dolayı PCE frekansının arttığı, NCE sayısının üç günlük muamele süresinde azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumu, muameleden sonra solunum zorluğu nedeniyle eritrosite olan ihtiyacın ortaya çıkması sebebi ile olabileceğini bildirmişlerdir. Solunum stresinin, daha fazla olgun olmayan eritrositin dolaşıma salınmasına ve PCE frekansının daha yüksek gözlenmesine neden olmasıyla açıklamışlardır. *Cyprinus carpio* balık dokularında oksitetrasiklinin bizim de test ettiğimiz çalışma süresi olan 72 saat sürede PCE frekansını arttırdığını saptamışlardır (Sharma, Thakur, Verma, & Sharma, 2019). Sulfonamid sınıfında bulunan Penoxsulam herbisitinin *Oreochromis niloticus* üzerinde 96 saat LC_{50} değerinin 1/5 ve 1/10 konsantrasyonuna maruz bırakılan balıklarda oksidan ve antioksidan dengesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Galal et al., 2018). Benzer şekilde (Murad, Houston, & Samson, 1990)'da oksijen talebindeki artış, kan oksijen taşıma kapasitesinin düşmesi, geçiçi hipoksi oluşması gibi solunum stresinden dolayı, 96 saate kadar olgun olmayan eritrositlerin bölünmesi sebebi ile PCE frekansının arttığını bildirmişlerdir. Bununla beraber, 96 saatten sonra genetik materyaldeki hasar nedeni ile PCE frekansının düştüğünü ileri sürmektedirler. Pacheco ve Santos (2002), *Anguilla anguilla L.* üzerinde benzo[a]pyrne (BaP), dehidroabietic asit (dhaa) karışımlarını 3, 7, 30 gün boyunca çalışmışlar. 3. ve 7. günlerde olgun olmayan eritrositlerin kontrole göre muamele gruplarında sayısının arttığını, sonraki günlerde düştüğünü bildirmişlerdir (M. Pacheco & Santos, 2002). Çalışmamızda kısa süreli 1, 2 ve 3 günlük muamelelerde bu araştırmacıların çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Muhtemelen solunum stresi nedeni ile olgun olmayan eritrositlerin dolaşıma salınması, çalışmamızda ‰PCE frekansının artışını açıklamaktadır.

Lancelot® Super ve etken maddeleri Aminopiralid, Florasulam'ın balık eritrosit testinde gözlenen nükleer anormalliklerin süreye bağlı olarak artış gösterdiği, 48 ve 72

saat muameleler sonrası tüm anormalliklerde kontrole göre anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir. Aminopiralid ve Florasulam'ın düşük konsantrasyondaki 24, 48, 72 saat akut muamelesi sonrası olgun eritrosit sayısını (normakromatid eritrosit = NCE) azaltarak, dolaşıma yeni katılan (polikromatik eritrosit = PCE) sayısını arttırdığı saptanmıştır. Genotoksisite belirteçlerinden olan nükleer anormalliklerin 72 saat sürede arttığı görülüyorken, hücre savunma mekanizması gereği muhtemel solunum stresi nedeniyle eritrosit sayısının yükselmesinden kaynaklan PCE frekansının arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak nükleer anormalliklerin konsantrasyona bağlı artışı Aminopiralid ve Florasulam pestisitinin potansiyel genotoksik etkisinin bulunduğunu göstermektedir. Pestisitler içerisinde bulunan etken maddelerin konsantrasyonlara bağlı olarak toksik etkilerinin ortaya konması, pestisitlerin daha kontrollü kullanılabilmesini sağlamayı amaçlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

Ağar, S., Aydınoğlu, H., Temel, O., İkizünal, K., & Ece, H. (1991). Pestisit kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceği. *Türk. entomol. derg, 15*, 247-256.

Akman, Y., Ketenoğlu, O., Evren, H., Kurt, L., & Düzenli, S. (2000). Çevre kirliliği (çevre biyolojisi). *Palme Yayıncılık, 274*.

Alcaraz, C., & García-Berthou, E. (2007). Life history variation of invasive mosquitofish (Gambusia holbrooki) along a salinity gradient. *Biological Conservation*, *139*(1-2), 83-92.

Alsabti, K., & Metcalfe, C. D. (1995). Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water. *Mutation Research-Genetic Toxicology, 343*(2-3), 121-135.

Alves, T. A., Roberto, C. E. O., Pinheiro, P. F., Alves, T. A., Henrique, M. K., Ferreira, A., et al. (2021). Searching an auxinic herbicide to use as positive control in toxicity assays. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, 93*.

Amer, S. M., & Aly, F. A. (2001). Genotoxic effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2, 4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *494*(1-2), 1-12.

Anderson, D., Jenkinson, P., Dewdney, R., Francis, A. J., Godbert, P., & Butterworth, K. (1988). Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the UK population. *Mutation Research/Genetic Toxicology, 204*(3), 407-420.

Arellano, A., Santoyo, S., Martın, C., & Ygartua, P. (1999). Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *European journal of pharmaceutical sciences, 7*(2), 129-135.

Atamanalp, M., & Yanık, T. (2001). Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri. *Su Ürünleri Dergisi, 18*(3).

Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow Phoxinus phoxinus and mollie Poecilia latipinna: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 467*(2), 177-186.

Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 49*(3), 221-225.

Badr, A., Zaki, H., Germoush, M. O., Tawfeek, A. Q., & El-Tayeb, M. A. (2013). Cytophysiological impacts of Metosulam herbicide on Vicia faba plants. *Acta physiologiae plantarum, 35*(6), 1933-1941.

Baumann, P. A. (2008). Herbicides: How They Work and the Symptoms They Cause. *Texas FARMER Collection*.

Benincá, C., Ramsdorf, W., Vicari, T., de Oliveira Ribeiro, C. A., de Almeida, M. I., De Assis, H. C. S., et al. (2012). Chronic genetic damages in Geophagus brasiliensis exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. *Environmental monitoring and assessment, 184*(4), 2045-2056.

Billington, R., Gehen, S. C., & Hanley Jr, T. R. (2010). Toxicology of triazolopyrimidine herbicides *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1865-1885): Elsevier.

Bond, G., Wetterstroem, N., Roush, G., McLaren, E., Lipps, T., & Cook, R. (1988). Cause specific mortality among employees engaged in the manufacture, formulation, or packaging of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and related salts. *Occupational and Environmental Medicine, 45*(2), 98-105.

Bozdağ, A. (2009). *2, 4-d ve dikamba herbisitlerinin fasulye (Phaseolus vulgaris L.) köklerindeki genotoksik etkilerinin rapd ve comet assaylerle belirlenmesi.* Fen Bilimleri Enstitüsü.

Bukowska, B. (2003). Effects of 2, 4-D and its metabolite 2, 4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 135*(4), 435-441.

Carman, S. M., Janssen, J., Jude, D. J., & Berg, M. B. (2006). Diel interactions between prey behaviour and feeding in an invasive fish, the round goby, in a North American river. *Freshwater Biology, 51*(4), 742-755.

Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an Insitu Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47*(11), 2123-2136.

Cattaneo, R., Clasen, B., Lucia Loro, V., de Menezes, C. C., Moraes, B., Santi, A., et al. (2011). Toxicological responses of Cyprinus carpio exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. *Journal of Applied Toxicology, 31*(7), 626-632.

Cenkci, S., Ciğerci, İ. H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A., & Terzi, H. (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in Brassica rapa L. *Environmental and experimental botany, 67*(3), 467-473.

Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., & Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 705*(1), 11-19.

Chandrasekhar, M., Prasad, G. S., Venkataramaiah, C., Raju, C. N., Seshaiah, K., & Rajendra, W. (2019). Synthesis, spectral characterization, docking studies and biological activity of urea, thiourea, sulfonamide and carbamate derivatives of imatinib intermediate. *Molecular diversity, 23*(3), 723-738.

Charles, J. M., Cunny, H. C., Wilson, R. D., Bus, J. S., Lawlor, T. E., Cifone, M. A., et al. (1999). Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 444*(1), 207-216.

Chow, S. Y., & Odell, L. R. (2017). Synthesis of N-sulfonyl amidines and acyl sulfonyl ureas from sulfonyl azides, carbon monoxide, and amides. *The Journal of organic chemistry, 82*(5), 2515-2522.

Costa, R., Pereira, J. L., Santos, M. A., Pacheco, M., & Guilherme, S. (2018). The role of contamination history and gender on the genotoxic responses of the crayfish Procambarus clarkii to a penoxsulam-based herbicide. *Ecotoxicology, 27*(7), 908-918.

Countryman, P. I., & Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 41*(2-3), 321-331.

Courtenay Jr, W., & Meffe, G. (1989). Small fishes in strange places: a review of introduced poeciliids. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae).* 319-331.

de Arcaute, C. R., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2014). Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3, 6-dichloro-2-metoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish Cnesterodon decemmaculatus. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 773*, 1-8.

De Arcaute, C. R., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2016). Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish Cnesterodon decemmaculatus. *Ecotoxicology and environmental safety, 128*, 222-229.

de Azevedo Mello, F., Silva, B. B. M., Barreiro, E. B. V., Franco, I. B., Nogueira, I. M., Chagas, P. H. N., et al. (2020). Evaluation of genotoxicity after acute and chronic exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2, 4-D) in rodents using machine learning algorithms. *The Journal of Toxicological Sciences, 45*(12), 737-750.

Demirel, S., & Zamani, A. G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi, 12*(3), 123-127.

Ellingham, T. J., Christensen, E. A., & Maddock, M. B. (1986). In vitro induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of the oyster toadfish and American eel. *Environmental mutagenesis, 8*(4), 555-569.

Erguden, S. (2013). Age, growth, sex ratio and diet of eastern mosquitofish Gambusia holbrooki Girard, 1859 in Seyhan Dam Lake (Adana/Turkey).

Espandiari, P., Thomas, V., Glauert, H., O'brien, M., Noonan, D., & Robertson, L. (1995). The herbicide dicamba (2-methoxy-3, 6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Toxicological Sciences, 26*(1), 85-90.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455*(1-2), 81-95.

Fenech, M., & Crott, J. W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 504*(1-2), 131-136.

Galal, A. A., Reda, R. M., & Mohamed, A. A.-R. (2018). Influences of Chlorella vulgaris dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in Oreochromis niloticus exposed to sub-lethal concentrations of penoxsulam herbicide. *Fish & shellfish immunology, 77*, 445-456.

Galetti, P., Aguilar, C., & Molina, W. (2000). An overview of marine fish cytogenetics. *Marine genetics*, 55-62.

Garaj-Vrhovac, V., & Zeljezic, D. (2002). Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *22*(4), 249-255.

Giray Kurt, A. (2007). *Callisto Herbisitinin Zea mays L.(Mısır)'ın Martha F1 Kültür formunda total glutatyon, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve pigment içeriği üzerine etkileri.*

Gomez, L., Soler, F., Martinez, S., Gazquez, A., Duran, E., & Roncero, V. (1999). 2, 4–D Treatment in Tench (Tinca tinca L.): Pathological Processes on the Excretory Kidney. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 62*(5), 600-607.

González, N., Soloneski, S., & Larramendy, M. (2006). Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells in vitro. *Toxicology in Vitro, 20*(8), 1481-1487.

Goodsell, J. A., & Kats, L. B. (1999). Effect of introduced mosquitofish on Pacific treefrogs and the role of alternative prey. *Conservation Biology, 13*(4), 921-924.

Göksu, M. Z. L. (2003). *Su kirliliği (ders kitabı)*: Nobel Kitabevi.

Gunsolus, J., & Curran, W. (1991). Herbicide Mode of Action and Injury Symptoms, North Central Regional Extension Publication 377. *Washington, DC: US Department of Agriculture Cooperative Extension Services*.

Güler, Ç., & Pestisitler, Ç. Z. (1997). Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52. *Basım. Ankara: TC Sağlık Bakanlığı, Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü yayını*, 9-10.

Halliop, J., Tochman, A., & Latalski, M. (1980). Ultrastructural studies and neutrophil myeloperoxidase determination in rats with acute 2, 4-dichlorphenoxyacetic acid poisoning. *Acta Haematologica Polonica, 11*(4), 249-257.

Hardell, L., & Eriksson, M. (1999). A case–control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer, 85*(6), 1353-1360.

Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., et al. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 123*(1), 61-118.

Hibiya, T. (1982). *Atlas of fish histology*: Kodansha.

Holland, N. T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L. W., Blair, A., Hubbard, A., et al. (2002). Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 521*(1-2), 165-178.

Ibrahim, M., Bond, G., Burke, T., Cole, P., Dost, F., Enterline, P., et al. (1991). Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2, 4-D. *Environmental health perspectives, 96*, 213-222.

Innal, D., & Erk'akan, F. (2006). Effects of exotic and translocated fish species in the inland waters of Turkey. *Reviews in Fish Biology and Fisheries, 16*(1), 39-50.

Isaksson, R., Kumpiņa, I., Larhed, M., & Wannberg, J. (2016). Rapid and straightforward transesterification of sulfonyl carbamates. *Tetrahedron Letters, 57*(13), 1476-1478.

J. A. Jenkins, C., H. L. Bart, Jr., J. D. Bowker, P. R. Bowser, J. R. MacMillan,, J. G. Nickum, J. D. R., P. W. Sorensen, and G. W. Whitledge on behalf of the, the, A.

F. S. J. W. R. a. B. E. W. o. b. o., & Bart, A. I. o. F. R. B. a. H. L. (2014). *Guidelines for the Use of Fishes in Research*. American Fisheries Society

Bethesda, Maryland

Jin, J., Kurobe, T., Ramírez-Duarte, W. F., Bolotaolo, M. B., Lam, C. H., Pandey, P. K., et al. (2018). Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (Hypomesus transpacificus). *Aquatic Toxicology, 197*, 79-88.

John, P., & Prakash, A. (2003). Bioaccumulation of pesticides on some organs of freshwater catfish Mystus vittatus. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 70*(5), 1013.

Kara, A., & Gençer, D. N. Pestisitler ve Enzimler Üzerine Etkisi.

Kaya, B., Yanikoglu, A., & Marcos, R. (1999). Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2, 4-D and 4-CPA in the Drosophila wing spot test. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, 19*(4), 305-312.

Kingman, A., & Moore, J. (1982). Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in Ascophyllum nodosum (Phaeophyta).

Klinkhardt, M. B. (1991). A brief comparison of methods for preparing fish chromosomes: an overview. *Cytobios, 67*(270-271), 193-208.

Krishna, G., & Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455*(1-2), 155-166.

Krumholz, L. A. (1948). Reproduction in the western mosquitofish, Gambusia affinis affinis (Baird & Girard), and its use in mosquito control. *Ecological Monographs, 18*(1), 1-43.

Laborde, M. R., Larramendy, M. L., & Soloneski, S. (2020). Cytotoxic and genotoxic assessments of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in in vitro mammalian cells. *Toxicology in Vitro, 65*, 104783.

Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl,

bispyribac-sodium, and picloram on Rhinella arenarum tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution, 224*(3), 1-13.

Lambert, I. B., Singer, T. M., Boucher, S. E., & Douglas, G. R. (2005). Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 590*(1-3), 1-280.

Lerda, D., & Rizzi, R. (1991). Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). *Mutation Research Letters, 262*(1), 47-50.

Liman, R., & Özkan, S. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity in Allium cepa L. root meristem cells exposed to the herbicide penoxsulam. *Celal Bayar University Journal of Science, 15*(2), 221-226.

Lin, T., Chen, Y., & Chen, W. (2013). Impact of toxicological properties of sulfonamides on the growth of zebrafish embryos in the water. *Environmental toxicology and pharmacology, 36*(3), 1068-1076.

Lin, T., Yu, S., Chen, Y., & Chen, W. (2014). Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 38*(2), 444-452.

Littorin, M., Hansson, M., Rappe, C., & Kogevinas, M. (1994). Dioxins in blood from Swedish phenoxy herbicide workers. *Lancet, 344*(8922), 611-611.

Lloyd, L., & Tomasov, J. (1985). Taxonomic status of the mosquitofish, Gambusia affinis (Poeciliidae), in Australia. *Marine and Freshwater Research, 36*(3), 447-451.

Lundgren, B., Meijer, J., & Depierre, J. W. (1987). Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases and proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to p-chlorophenoxyacetic acid, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid. *Biochemical pharmacology, 36*(6), 815-821.

Ma, C., Martin, S., Trask, B., & Hamlin, J. (1993). Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells. *Genes & Development, 7*(4), 605-620.

MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., et al. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian

bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology, 189*(2), 103-112.

Mengüç, Ç. (2018). Herbisit toksisitesi ve yabancı otlara karşı alternatif mücadele stratejileri. *Turkish Journal of Weed Science, 21*(1), 61-73.

Mohammed, K., & Ma, T. (1999). Tradescantia-micronucleus and-stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 426*(2), 193-199.

Morrison, H., Savitz, D., Semenciw, R., Hulka, B., Mao, Y., Morison, D., et al. (1993). Farming and prostate cancer mortality. *American journal of epidemiology, 137*(3), 270-280.

Murad, A., Houston, A., & Samson, L. (1990). Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish, Carassius auratus L. *Journal of fish biology, 36*(3), 289-305.

Murussi, C. R., Thorstenberg, M. L., Leitemperger, J., Costa, M., Clasen, B., Santi, A., et al. (2014). Toxic effects of penoxsulam herbicide in two fish species reared in southern Brazil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 92*(1), 81-84.

Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on Boana pulchella (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety, 147*, 471-479.

Nigro, M. L., Palermo, A., Mudry, M., & Carballo, M. (2003). Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology in vitro, 17*(1), 35-40.

Özdaş, E., Utku, A., Uyanikgil, Y., Meral, B., Yavaşoğlu, A., Biçer, S., et al. (2006). Bir Herbisit Olan 2, 4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in Sıçanlarda Testis Dokusu Üzerine Etkisi. *Ege Tıp Dergisi, 45*(3), 168-174.

Özdemir, G., & Ceylan, B. (2007). Biyolojik istila ve Karadeniz'deki istilacı türler. *Aquaculture Studies, 2007*(3).

Özuluğ, M., Saç, G., & Gaygusuz, Ö. (2013). İstilacı Özellikteki Gambusia holbrooki, Carassius gibelio ve Pseudorasbora parva (Teleostei) TÜRLERİ İÇİN TÜRKİYE'DEN YENİ YAYILIM ALANLARI. *Meriç ALBAY, 28*, 1-22.

Pacheco, M., & Santos, M. (1996). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of Anguilla anguilla L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. *Fresenius Environmental Bulletin, 5*(11), 746-751.

Pacheco, M., & Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (Anguilla anguilla L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety, 53*(3), 331-347.

Palmeira, C. M., Moreno, A. J., & Madeira, V. M. (1994). Interactions of herbicides 2, 4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and applied pharmacology*, *127*(1), 50-57.

Patetsini, E., Dimitriadis, V., & Kaloyianni, M. (2013). Biomarkers in marine mussels, Mytilus galloprovincialis, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquatic toxicology, 126*, 338-345.

Pathiratne, A., & George, S. G. (1998). Toxicity of malathion to Nile tilapia, Oreochromis niloticus and modulation by other environmental contaminants. *Aquatic Toxicology, 43*(4), 261-271.

Prado, M. D., De Prado, R., & Franco, A. R. (2004). Design and optimization of degenerated universal primers for the cloning of the plant acetolactate synthase conserved domains. *Weed science, 52*(4), 487-491.

Pyke, G. H. (2005). A review of the biology of Gambusia affinis and G. holbrooki. *Reviews in Fish Biology and Fisheries, 15*(4), 339-365.

Rishi, K., & Grewal, S. (1995). Chromosome aberration test for the insecticide, dichlorvos, on fish chromosomes. *Mutation Research/Genetic Toxicology, 344*(1-2), 1-4.

Rojas, E., Herrera, L. A., Sordo, M., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Rodríguez, R., et al. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs, 4*(6), 637-640.

Rupp, H. (1997). Mosquito control with Gambusia affinis. *Journal of the American Mosquito Control Association, 13*(3), 296.

Saari, L., Cotterman, J., & Thill, D. (2018). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides *Herbicide resistance in plants* (pp. 83-140): CRC Press.

Schmid, W. (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis *Chemical mutagens* (pp. 31-53): Springer.

Schmoldt, A., Iwersen, S., & Schlüter, W. (1997). Massive ingestion of the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA). *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 35*(4), 405-408.

Seligmann, I. C., Lima, P., Cardoso, P., Khayat, A. S., Bahia, M. O., Buchi, D. d. F., et al. (2003). The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. *Genet Mol Res, 2*(2), 223-228.

Sevim, R. (2011). Toksikoloji: Pestisitler. *Akdeniz Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, 17s*.

Sharma, M., Thakur, J., Verma, S., & Sharma, P. (2019). Cytotoxic and genotoxic effect of oxytetracycline on fish Cyprinus carpio after acute exposure. *Asian J Pharm Chem Res, 12*, 134-137.

Shibasaki, T., Ooishi, T., Yamanouchi, N., Murafuji, T., Kurotobi, K., & Sugihara, Y. (2008). A new efficient route to 2-substituted azulenes based on sulfonyl group directed lithiation. *The Journal of organic chemistry, 73*(20), 7971-7977.

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., & Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of cell biology, 140*(6), 1307-1320.

Shimura, M., Onozuka, Y., Yamaguchi, T., Hatake, K., Takaku, F., & Ishizaka, Y. (1999). Micronuclei formation with chromosome breaks and gene amplification caused by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus. *Cancer Research, 59*(10), 2259-2264.

Silveira, M. A. D., Ribeiro, D. L., de Castro Marcondes, J. P., & d'Arce, L. P. G. (2016). Sulfentrazone and flumetsulam herbicides caused DNA damage and instability in Allium cepa test. *International Journal of Education and Applied Research, 2*(8), 1-7.

Simoniello, M. F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., et al. (2009). Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish Prochilodus lineatus (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83*(2), 155-158.

Soloneski, S., González, N. V., Reigosa, M. A., & Larramendy, M. L. (2007). Herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes. *Cell Biology International, 31*(11), 1316-1322.

Soyöz, M., & Özçelik, N. (2003). Zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 10*(1).

Stevens, M. Y., Chow, S. Y., Estrada, S., Eriksson, J., Asplund, V., Orlova, A., et al. (2016). Synthesis of 11C-labeled sulfonyl carbamates through a multicomponent reaction employing sulfonyl azides, alcohols, and [11C] CO. *ChemistryOpen, 5*(6), 566.

Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A., et al. (1989). The Micronucleus Test and Erythropoiesis - Effects of Erythropoietin and a Mutagen on the Ratio of Polychromatic to Normochromatic Erythrocytes (P/N Ratio). *Mutagenesis, 4*(6), 420-424.

Sweilum, M. A. (2006). Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) and water quality of ponds. *Aquaculture Research, 37*(11), 1079-1089.

Taspinar, M. S., Aydin, M., Arslan, E., Yaprak, M., & Agar, G. (2017). 5-Aminolevulinic acid improves DNA damage and DNA Methylation changes in deltamethrin-exposed Phaseolus vulgaris seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry, 118*, 267-273.

Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A., et al. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 388*(1), 85-95.

Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., & Sofuni, T. (1992). A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Science and Technology, 25*(11), 235-240.

Upadhyay, A. A. (2019). *Toxicological Studies of Herbicides Pyrazosulfuron-Ethyl on Fresh Water Fish: A Sub-Acute Study*. Maharaja Sayajirao University of Baroda (India).

USEPA, U. S. o. P., Pesticide Environmental Protection and Toxic Substances Agency (7501C). . (2005). *Pesticide Fact Sheet, Aminopyralid.*

Üstün, F. (2007). Albendazol'ün olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*(s 100).

Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of Cirrhinus mrigala. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 24*(3), 286-291.

Vineis, P., Terracini, B., Ciccone, G., Cignetti, A., Colombo, E., Donna, A., et al. (1987). Phenoxy herbicides and soft-tissue sarcomas in female rice weeders: a population-based case-referent study. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 9-17.

Von Ledebur, M., & Schmid, W. (1973). The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 19*(1), 109-117.

Walters, D. M., & Freeman, B. J. (2000). Distribution of Gambusia (Poeciliidae) in a southeastern river system and the use of fin ray counts for species determination. *Copeia, 2000*(2), 555-559.

Walton, W., Henke, J., & Why, A. (2012). A handbook of global freshwater invasive species. *Gambusia affinis (Baird & Girard) and Gambusia holbrooki Girard (mosquitofish)*, 261-272.

Widel, M., Kolosza, Z., Jedruu, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., & vwierniak, A. (2001). Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma; the updated analysis. *International journal of radiation biology*, *77*(5), 631-636.

Williams, R., & Metcalfe, C. (1992). Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquatic toxicology, 23*(3-4), 193-202.

Woods, J. S., & Polissar, L. (1989). Non-Hodgkin's lymphoma among phenoxy herbicide-exposed farm workers in western Washington State. *Chemosphere, 18*(1-6), 401-406.

Yalçınkaya, M. (2006). *Bir Herbisit olan 2, 4-d (diklorofenoksiasetik asit)'nin Poecilia reticulata p., 1859'da Medulla spinalis Üzerine Etkileri.* Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, 97s.

Yang, X., Cao, X., Zhang, L., Wu, Y., Zhou, L., Xiu, G., et al. (2021). Sulfate radical-based oxidation of the aminopyralid and picloram herbicides: The role of amino group on pyridine ring. *Journal of Hazardous Materials, 405*, 124181.

Yener, Y., & Dikmenli, M. (2009). Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food and Chemical Toxicology, 47*(8), 2120-2123.

Zafra-Lemos, L., Cusioli, L. F., Bergamasco, R., Borin-Carvalho, L. A., & de Brito Portela-Castro, A. L. (2021). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in Astyanax lacustris (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 865*, 503335.

Zarev, V. Y. (2012). Some life-history traits of Gambusia holbrooki (Pisces: Poeciliidae) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica, 64*(3), 263-272.

Zeljezic, D., & Garaj-Vrhovac, V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis, 16*(4), 359-363.

Zeljezic, D., & Garaj-Vrhovac, V. (2002). Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere, 46*(2), 295-303.

Zhao, J., Yu, Y., Yang, X., Yan, X., Zhang, H., Xu, X., et al. (2015). Phosphorescent iridium (III) complexes bearing fluorinated aromatic sulfonyl group with nearly unity phosphorescent quantum yields and outstanding electroluminescent properties. *ACS applied materials & interfaces, 7*(44), 24703-24714.

Zoll, C., Ferrier, V., & Gauthier, L. (1990). Use of aquatic animals for monitoring genotoxicity in unconcentrated water samples *Mechanisms of environmental mutagenesis-carcinogenesis* (pp. 233-244): Springer.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : AKATA, DİLHAN

Uyruğu : T.C.

Eğitim Bilgileri

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fakültesi (2.48/4)	2015
Lise	Özel Aka Fen Lisesi	2008

Yabancı Dil

İngilizce