

**DODİN'E MARUZ BIRAKILAN ALABALIKLARIN
KARACİĞER KAS VE SOLUNGAÇ DOKULARINDA
İLAÇ BİRİKİMİNİN BELİRLENMESİ VE DOKULARIN
HİSTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Semih BÜYÜKSOYLU

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Selim ERDOĞAN

2. Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Erkan ÖZGÜR

Yüksek Lisans Tezi – 2018

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DODİN'E MARUZ BIRAKILAN ALABALIKLARIN KARACİĞER KAS VE
SOLUNGAÇ DOKULARINDA İLAÇ BİRİKİMİNİN BELİRLENMESİ VE
DOKULARIN HİSTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Semih BÜYÜKSOYLU

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Selim ERDOĞAN
2. Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Erkan ÖZGÜR**

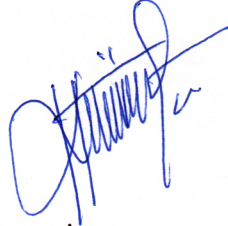
Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL/ 2017-640 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2018**

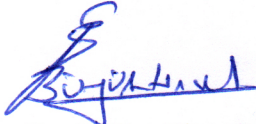
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Semih BÜYÜKSOYLU'nun "Dodin'e Maruz Bırakılan Alabalıkların Karaciğer, Kas ve Solungaç Dokularında İlaç Birikiminin Belirlenmesi ve Dokuların Histolojisi Üzerine Etkileri "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/07/2018



Doç. Dr. Halil İbrahim ULUSOY
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL
İnönü Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Selim ERDOĞAN
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2018 tarih ve 2018/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Pestisit	3
2.1.1 Pestisitlerin Sınıflandırması.....	3
2.1.1.1. Herbisitler.....	4
2.1.1.2. İnsektisitler.....	5
2.1.1.3. Fungusitler	7
2.2 Dünyada , Türkiyede ve Malatyada Pestisit Kullanımı	9
2.3 Pestisitlerin Çevreye Etkileri	12
2.4 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	14
2.5 Pestisitlerin Su Ürünleri İle Alım Yolları	16
2.5.1 Gökkuşaağı Alabalığı Özellikleri	17
2.6 Örneklerden Pestisitlerin Ekstraksiyonu.....	18
2.6.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi	18
2.6.2 Sıvı-Sıvı Dağılım Mikroekstraksiyonu	18
2.6.3 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	19
2.6.4 Hızlandırılmış (Basınçlandırılmış) Çözücü Ekstraksiyonu	19
2.6.5 Mikrodalga Yardımıyla Gerçekleştirilen Ekstraksiyon	19
2.6.6 Sokslet Ekstraksiyonu.....	19

2.6.7 Ultrasonik Ekstraksiyon.....	20
2.6.8 Katı Faz Ekstraksiyonu	20
2.6.9 Katı Faz Mikro-Ekstraksiyon.....	20
2.6.10 Matriks Katı Faz Dağılım	20
2.6.11 QuEChERS Metodu.....	21
2.7 Pestisit Analiz Yöntemleri	25
2.8 Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği	28
2.8.1 Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti.....	28
2.8.2 Tekrarlanabilirlik ve Gerçeklik	28
2.8.3 Tekrar Üretilirlik ve Gerçeklik	28
2.8.4 Gerçeklik Belirsizliği	30
2.8.5 Birleşik Standart Belirsizlik (Uc) (Toplam Belirsizlik).....	30
3.MATERYAL VE METOT	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Araştırma Yerleri	31
3.1.2 Akvaryum Suyu	31
3.1.3 Deney Akvaryumları.....	31
3.1.4 Kullanılan Kimyasallar, Araç ve Gereçler	32
3.1.5 Balık Örnekleri.....	33
3.2 Metot	33
3.2.1 Balıkların Deneye Hazırlanması.....	33
3.2.2 Pestisit Hazırlanması.....	33
3.2.3 Deneyin Uygulaması.....	33
3.2.4 Histolojik Preparatların Hazırlanması.....	34
3.2.5 Balık Örneklerin Alınması.....	34
3.2.5.1 Balıklardan Pestisit Kalıntı Analizi için Örneklerinin Alınması	34
3.2.5.2 Balıklardan Histolojik Analiz için Örneklerin Alınması	35

3.2.5.3. Deneysel Akvaryumlarının Temizlenmesi.....	35
3.2.6 Analizler.....	36
3.2.6.1 Ekstraksiyon Analizi İşlemi.....	36
3.2.6.2 Yıkama İşlemi.....	36
3.2.6.3 Histoloji Analizi İşlemleri.....	39
3.2.6.4 LC-MS-MS Cihazı Çalışma Koşulları ve Kalibrasyonu	41
3.2.6.5 Örneklerin LC-MS-MS Cihazına Verilmesi.....	43
3.2.6.6 Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması.....	46
4. BULGULAR.....	50
4.1 Validasyon Bulguları.....	50
4.2 LC-MS-MS Analiz Bulguları	50
4.3 Histoloji Analiz Bulguları.....	55
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	76
Ek 1 Özgeçmiş	76
Ek 2 Etik Kurul	77

TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunu bana Yüksek Lisans Tezi olarak veren, laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Proje yürütücümüz ve danışman hocam Doç. Dr. Selim ERDOĞAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen 2. Danışman hocam Dr.Öğretim Üyesi Mustafa Erkan ÖZGÜR'e çok teşekkür ederim.

Histoloji analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Aslı ÇETİN TAŞLIDERE ve ekibine çok teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında bana yardımcı olan ve her konuda bana destek olup sıkıntılarımı paylaşan arkadaşım Hasan UCUZAL'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmama mali yönden destek veren İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine çok teşekkür ederim.

ÖZET

Dodin'e Maruz Bırakılan Alabalıkların Karaciğer, Kas, Solungaç Dokularında İlaç Birikiminin Belirlenmesi ve Dokuların Histolojisi Üzerine Etkileri

Amaç: Bu araştırma; tarımsal alanlarda yaygın olarak kullanılan bir fungusit olan Dodin (n- dodecylguanidinium acetate)'in Dünya'da ve Türkiye'de geniş bir dağılım gösteren gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'larındaki biyobirikim düzeyini ortaya koymaktır.

Materyal ve Metot: Gruplar; Kontrol (K) ve Deney Grupları I, II, III ve IV (I-0.01 ppm, II-0,1 ppm, III-0.5 ppm ve IV-1 ppm) gruplarına ayrıldı. Deney, dozlamadan itibaren 96 saat sürdü. 96 saatlik akut toksikoloji değerleri, LC50, EC50 ve dokulardaki biyo birikimleri belirlendi. Balıkların kas, solungaç ve karaciğer numuneleri QUECHERS metoduna göre ekstrakte edilerek ekstraktlardaki Dodin miktarı LC-MS-MS ile analiz edildi.

Bulgular: Çalışma boyunca uygulanan Dodin dozlarında deney gruplarında toplam bireylerin %50'sini öldüren doz gözlenmemiştir. Buna rağmen ilk 48 saat içinde 1 ppm doz içeren grupta 3 ölüm meydana gelirken 6 balıkta dengesizlik, yüzmede bozukluk, ani sıçrama hareketleri gibi davranışlar gözlenmiştir. Aynı durum 0.5 ppm doza sahip grupta 3 balıkta gözlenmiştir. Dolayısıyla yapılan probit analiz sonucunda LC50 değerinin 1.07 ppm'e, EC50 değerinin ise 0.84 ppm'e denk geldiği hesaplanmıştır. Buna göre tüm gruplarda yapılan uygulamalarda akvaryumlardaki Dodin konsantrasyonu artıkça balık dokularındaki biyo birikimlerinde artışı gözlemlenmiştir.

Sonuç: Kaslarda en fazla birikim 622.35 ± 91.59 ppb olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber 0.01 ile 0.1 mg/L dozlarda meydana gelen Dodin birikim miktarlarında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p > 0.05$), 0.5 ile 1 ppm dozlarda istatistiksel olarak fark önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Karaciğerde en fazla birikim 1 ppm'lik Dodin dozuna sahip grupta 344.18 ± 85.12 ppb olarak tespit edilirken, 0.5 ppm'lik Dodin içeren gruba göre (321.61 ± 57.15 ppb) istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Yine 0.01 ile 0.1 ppm dozlar arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Solungaçlarda ise 1 ppm'lik grupta Dodin birikimi 959.96 ± 52.29 ppb olarak tespit edilirken, bu miktar hem kendi içinde hem de kas ve karaciğer gruplarında biriken Dodin miktarlarından fazla olduğu gözlemlenmiştir. Solungaçlarda Dodin birikimi her grup için istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Histolojik değerlendirmesinde; Dodin konsantrasyonları artıkça karaciğer dokularında bozulma, sinüzoidal dilatasyon, vasküler konjesyon, ödem ve yer yer kanama gözlenirken, solungaçlarda; anevrizma, ödem, hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, sekonder lamellerde hiperplazi ve hücre hipertrofisi oranlarında artış ve ek olarak sekonder lamellerde apikalden başlayarak ilerleyen kaynaşma (füzyon) olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dodin, Fungusit, Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), LC-MS-MS, QUECHERS

ABSTRACT

Determination of Drug Accumulation in the Liver, Muscle and Gill of Trout that are Exposed to Dodine and its Effects on the Histology of the Tissues

Aim: The purpose of this research is to show bioaccumulation levels of a fungicide Dodin (n-dodecylguanidini acetate), which is commonly used in the agricultural field especially in apricot and vegetable cultivation, in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) which has a wide distribution in the world and Turkey.

Material and Method: Groups; Control (K) and Experimental Groups I, II, III and IV (I-0.01 ppm, II-0,1 ppm, III-0.5 ppm and IV-1 ppm) groups. The experiment continues for 96 hours from dosing. The 96 hour acute toxicological values were calculated from the LC50, the EC50 and the NOEC and bioaccumulation in tissue were identified. Muscle, gill and liver samples of fish were extracted according to QUECHERS method and its liquid chromatography was analyzed by mass spectrometer (LC-MS-MS).

Results: Dodine doses applied throughout the study did not show a dose killing 50% of the total individuals in the experimental groups. However, there were 3 deaths in the group with 1 ppm dose during the first 48 hours, behaviors such as unstability, anomaly in swimming, sudden jumping movements were observed in six fishes. The same situation was observed in three fishes in the group with 0.5 ppm dose. Therefore, it was calculated that the probit analysis yielded an LC50 value of 1.07 ppm and an EC50 value of 0.84 ppm. Accordingly, in all groups, as the concentration of Dodine in aquariums increased, the bioaccumulation in fish tissues also increased.

Conclusion: The maximum accumulation in the muscle was 622.35 ± 91.59 ppb. However, while there was no statistically difference in the amount of Dodine accumulation occurring between 0.01 and 0.1 ppm doses ($p > 0.05$), statistically significant difference ($p < 0.05$) was found between doses of 0.5 and 1 ppm. Dodine accumulation in the liver was 344.18 ± 85.12 ppb in the group with Dodine dose of 1 ppm, but no statistically significant difference was observed according to the group containing 0.5 ppm Dodine (321.61 ± 57.15 ppb) ($p > 0.05$). There was also no statistically significant difference between 0.01 and 0.1 ppm doses. Dodine accumulation in the 1 ppm group of gill was 959.96 ± 52.29 ppb, which was found to be higher than Dodine accumulation that of itself and in the muscle and liver groups. Dodine accumulation in the gill was statistically different ($p < 0.05$) for each group. In the histological evaluation; as Dodine concentrations increased, deterioration of liver tissues, sinusoidal dilatation, vascular congestion, edema and occasional bleeding were observed. In the gill tissues were observed aneurysm, edema, cell infiltration, dilatation of vessels, hyperplasia and hypertrophy of the secondary lamellae, as well as the fusions progressing from apical to secondary lamellae.

Key words: Dodin, Fungicide, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), LC-MS-MS QUECHERS.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Avrupa Birliği
°C	: Santigrat derece
dak.	: Dakika
DDT	: Diklorodifenil trikloroetan
EC50	: Ekili Konsantrasyon
EPA	: Amerika Çevre Koruma Ajansı
FAO	: Birlesmis Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GTHB	: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
GC-MS	: Gaz Kromotografi- Kütle Spektrofotometre
g	: Gram
LC50	: Letal Konsantrasyon
LD50	: Ölümcül Doz
LC-MS-MS	: Sıvı Kromotografi -Kütle Spektrofotometre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MRL	: En yüksek kalıntı limiti
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
PSA	: Polimer seconder amin
ppm	: Milyonda 1 (bir) kısım
ppb	: Milyarda 1 (bir) kısım
PSA	: Polimer seconder amin
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Dodin bileşiğinin molekül şekli.....	9
Şekil 2.2. Dünyada tarım ilacı kullanımı kg/ha (2005-2009)	9
Şekil 2.3. Pestisitlerin doğadaki hareketleri	17
Şekil 2.4. Gökkuşluğu alabalığı (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>).....	17
Şekil 3.1. Deney akvaryumları	32
Şekil 3.2. Balıklardan pestisit kalıntı analizi ve histolojik analizler için örneklerinin alınması.....	34
Şekil.3.3. Pestisit kalıntılarını ozan jenaratörü ile giderme	35
Şekil.3.4. Ozon ile parçalanarak zararsız hale getirilen atık su analiz Kromatogramı... 35	
Şekil 3.5. Ekstraksiyon işlemi	37
Şekil 3.6. Yıkama işlemi.....	38
Şekil 3.7. Bloklanmış ve lamel arasına yapıştırılmış doku örnekleri	39
Şekil 3.8. Histoloji analizi işlemleri	40
Şekil 3.9. LC-MS-MS Cihazı	41
Şekil 3.10. Dodin kütle Kromatogramı.....	41
Şekil 3.11. a) 2 ppb , b) 10 ppb, c) 50 ppb, d) 100 ppb, e) 200 pbb Kalibrasyon çözelti kromatogramları ve f) kalibrasyon grafiği.....	43
Şekil 3.12. a) Grup I'deki elde edilen kas kromatogramı, b) Grup II'deki elde edilen kas kromatogramı, c) Grup III'deki elde edilen kas kromatogramı, d) Grup IV'deki elde edilen kas kromatogramı.....	44
Şekil 3.13. a) Grup I'deki elde edilen karaciğer kromatogramı, b) Grup III'deki elde edilen karaciğer kromatogramı, c)Grup IV'deki elde edilen karaciğer kromatogramı.....	45
Şekil 3.14. a) Grup I'deki elde edilen solungaç kromatogramı, b) Grup III'deki elde edilen solungaç kromatogramı, c)Grup IV'deki elde edilen solungaç kromatogramı.....	46

Şekil 4.1. Kasta biriken Dodin miktarındaki değişimler değişimler	53
Şekil 4.2. Karaciğerde biriken Dodin miktarındaki değişimler	53
Şekil 4.3. Solungaçta biriken Dodin miktarındaki değişimler.....	54
Şekil 4.4. Dozların dokulardaki etkilerinin logaritmik ilişkisi	54
Şekil 4.5. Kontrol grubu (A), 0,01 ppm Dodin grubu (B), 0,1 ppm Dodin grubu(C), 0,5 ppm Dodin grubu (D), 1 ppm Dodin grubu (E) kas doku örnekler A, B, C, D, E: H-E; X 20	55
Şekil 4.6. Kontrol grubu (A, B) karaciğer dokusu normal histolojik görünümde izlendi. A: H-E; X20, B: H-E; X40	56
Şekil 4.7. 0,01 ppm Dodin grubu (A, B) karaciğer doku örnekleri, 0,1 ppm Dodin grubu karaciğer doku örnekleri (C, D). A, C: H-E; X20, B, D: H-E; X40	57
Şekil 4.8. 0,5 ppm Dodin grubu (A, B) karaciğer doku örnekleri, 1 ppm Dodin grubu karaciğer doku örnekleri (C, D). A, C: H-E; X20, B, D: H-E; X40	58
Şekil 4.9. Kontrol grubu, primer lameller (PL), sekonder lameller (SL) (A), 0,01 ppm Dodin grubu (B), 0,1 ppm Dodin grubu (C), 0,5 ppm Dodin grubu (D), 1 ppm Dodin grubu (E). A, B, C, D, E: H-E; X20.....	59

TABLULAR DİZİNİ

Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 2.1. Dodinin genel özellikleri.....	8
Tablo 2.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi.....	9
Tablo 2.3. 2006-2013 yıllarında Türkiye’de insektisit, fungusit, herbisit ve toplam pestisit tüketimi.....	11
Tablo 2.4. Malatya’da hastalıklara ve zararlılara karşı mevsimsel olarak kullanılan tarım ilaçları.....	12
Tablo 3.1. Laboratuvar şartlarında kurulan akvaryumdaki suyun kimyasal özellikler.	31
Tablo 3.2. LC-MS-MS cihazı çalışma koşulları	41
Tablo.3.3. Dodin geçiş kütleleri (m/z)	42
Tablo 3.4. Tayin limiti ve ölçüm limiti	47
Tablo 3.5. Tekrarlanabilirlik ve gerçeklik.....	47
Tablo 3.6. tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik	48
Tablo 3.7. Gerçeklik belirsizliği.....	49
Tablo 3.8. Birleşik standart belirsizlik (Uc) (toplam belirsizlik)	49
Tablo 4.1. Balıkların ortalama ağırlık ve boyları.....	51
Tablo 4.2. Dodine karşı tahmin edilen LC50 ve EC50 miktarları	51
Tablo 4.3. Kas, karaciğer ve solungaçlarda biriken Dodin miktarları	52

1.GİRİŞ

Binlerce yıl doğayla uyumlu bir biçimde yapılan bitkisel, hayvansal ve tarımsal uygulamalar çevreye zarar vermemiş ve çevre sorunlarına neden olmamıştır. Ancak çağımızdaki hızlı nüfus artışı, insanlığın karşılaştığı en büyük sorunlardan biri olan beslenme problemini de beraberinde getirdiğinden dolayı, mevcut gıda açığını kapatabilmek için birim alandan daha fazla ürün alabilmek yoluna gidilmiş ve tarıma giren yapay unsurlar, doğal ortamı bozan ve çevre sorunlarını yaratan bir sektör haline gelmiştir. Bu yapay unsurlardan biri de tarım ilacı olarak adlandırılan pestisitlerdir. Pestisitler; böcekler, su, yabancı otlar ve bitki hastalıkları dâhil zararlıları kontrol etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Doğal yollardan elde edilen pestisitler yüzyıllardır kullanılmaktadır, ancak modern sentetik tarım ilaçlarının yaygın üretimi ve kullanımı 1940'lardan sonra başlamıştır. Sentetik pestisitler böcek ilaçlarının üretimi de aynı tarihlerde başlamıştır. Üretilen ilk bileşiklerden biri olan diklorodifenil trikloroetan (DDT) Zeidler tarafından 1874 yılında sentezlendi ve böcek öldürücü özellikleri Paul Müller tarafından 1939'da tarif edildi (1). 1940'tan sonra yaygınlaşan pestisitlerin üretimi, pazarlanması ve süregelen kullanımı günümüze kadar artmıştır. Bu süreçle birlikte pestisitlere insanların ve çevrenin maruz kalma miktarı da artmıştır. Bu da olumsuz etkilere sebep olmuştur. Bu etkiler her zaman acil ve belirgin yaralanmalarla ilgili olmayıp, zaman içinde canlı yapısında birikimlere ve ölümcül hastalıklara sebep olabilmektedir (2).

Tarım ürünlerinde verimi artırıp avantaj sağlasa da, pestisitlerin gerçek seçicilik olmadan herhangi bir biyolojik sisteme müdahale etmek için kasten yaratılan zehirli kimyasallar olduğu açıktır. Genel popülasyon bu bileşiklere maruz kalmasına rağmen, akut olarak en çok etkilenen çiftçilerdir ve yüksek risk grubuna girmektedirler (3).

Pestisitlerin yarattığı diğer bir etki ise genotoksik tehlikesidir. Genotoksik bileşikler doğrudan veya dolaylı olarak DNA veya klastojenik olay üzerinde etkilidir. Genotoksik potansiyel, üreme etkileri ve toksisite gibi kronik veya uzun vadeli etkiler için birincil bir risk faktörüdür. Genetik materyalin zararlı çevresel koşulların bir sonucu olarak meydana gelen çeşitli zararlar arasında, nokta dönüşümü ve kromozomal hücre dönüşümü yol açabilmektedir. Pestisit maruziyeti sinir iltihabına, psikiyatrik bulgulara, hepatorenal bozukluklara, nörolojik ve nörodejeneratif, bağışıklık, metabolik ve endokrinaya yol açabilmektedir. Benzer şekilde, bazı zirai ilaçların genotoksik bir

etkisini takiben çiftçilerde artmış lösemi ve mesane kanseri insidansı ile bağlantılı olmuştur (4).

Pestisitlerin olumsuz etkileri artıkça pestisit kalıntı tayinleri ve sağlık üzerine olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar da artmıştır. Ticha ve arkadaşlarının elmalarda bulunan çeşitli böcek ilacı kalıntılarının araştırıldığı bir çalışmada deneysel hasat öncesi rejimde uygulanan pestisit preparatlarında yer alan 21 aktif içerikten, hasat sırasında sadece altı fungusit (kaptan, siprodinil, Dodin, pirimetanil, tebuconazol, tolyfluanid) ve bir insektisit (phosalone) LC-MS / MS veya GC-MS ile tespit edilmiştir. Depolama periyodu sırasında arta kalan art arda 5 ay sonra sadece fungusit Dodin ve insektisit phosalone tespit edilmiştir (5). Yine diğer bir çalışmada ise Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) akut toksisite verilerine göre Dodin'in tatlı su balıkları için oldukça zehirli olduğu ve akut maruziyet esasına göre deniz balıkları için orta derecede toksik olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, mevcut veriler, Dodin'in, deniz omurgasızları ve deniz yumuşakçaları için oldukça toksik olduğunu ve tatlı su omurgasızlarına çok fazla toksik olduğunu göstermektedir (6).

Sonuç olarak, Dodin ile ilgili literatür çalışmalarının büyük çoğunluğunun; meyveler, sebzeler, yüzey suları, yer altı suları ve toprak ile ilgili örnek matrislerinde olduğu görülmektedir. Ancak, balıkların akut toksikolojisi üzerine çok az çalışmaya rastlanmıştır.

Yapılan Dodin ile ilgili literatür çalışmalarının büyük çoğunluğunun; meyveler, sebzeler, yüzey suları, yer altı suları ve toprak ile ilgili örnek matrislerinde olduğu görülmektedir. Ancak, balıkların akut toksikolojisi üzerine çok az çalışmaya rastlanmıştır. Yine, Malatya'nın tarımsal alanlarında özellikle de kayısı ve sebze yetiştiriciliğinde fungusid olarak yaygın biçimde kullanılan Dodin (n-dodecylguanidinium acetate)'in sulak habitatlara ve balıklara karşı oluşturabileceği toksik etki değerlendirilmesi çalışması mevcut değildir. Bu nedenle, genel bir risk değerlendirmesi için, laboratuvar koşullarında Dodin'nin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki akut toksikolojisi çalışılarak, balıkların kas, karaciğer ve solungaç gibi dokularındaki biyobirikim düzeyini ve histolojik tahribatını ortaya koymayı amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisit

İnsan faaliyetleri tarafından üretilen küresel çevre sistemindeki değişimler, enerji ve doğal kaynaklar harcamasına ve yaşam standartlarının gittikçe güçsüz hale gelmesine neden olmaktadır (7).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisitleri, insan hastalıkları ya da hayvan türlerinin taşıyıcıları da dâhil olmak üzere herhangi bir zararlıyı önlemek, yok etmek ya da kontrol etmek; istenmeyen bitkiler ya da hasara neden olan veya başka şekilde müdahale eden diğer zararlıların kontrolü için uygulanabilen herhangi bir madde ya da madde karışımı olarak tanımlanır. Tarım ürünleri, ahşap ve ahşap ürünler veya hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, depolanması, taşınması veya pazarlanması ve hayvanların bünyelerinde bulunan zararlıların ortadan kaldırılması için de kullanılır (8,9). Böylelikle pestisitlerin amacı bazı canlıları yok etmek ve aynı zamanda geniş bir ölümcül olabilecek belirli bir biyosit grubunu oluşturmaktır.

Bir böcek ilacı, herhangi bir zararlı maddenin hasarını önleme, yok etme, itme veya eskimeye yönelik maddeler veya madde karışımını ifade eder. En çok kullanılan böcek ilacı böcek öldürücüleri, herbisitleri, fungusitleri ve rodentisitleri içerir. Diğer az bilinen böcek ilacı büyüme düzenleyiciler, bitki defoliantları, yüzey dezenfektanları ve bazı yüzme havuzu kimyasallarını içerir (10). En yaygın olarak böcek ilacı, sağlık sektöründe ve tarımsal ürünlerde kullanılır. Zehirli zararlılarla zirai mücadele ilaçları öldürülen sivrisinekler gibi hastalığın taşıyıcılarını öldürmek için halk sağlığında yararlıdırlar. Doğal olarak böcek ilacı, insanlar da dâhil olmak üzere diğer hedef dışı organizmalar için potansiyel olarak toksiktir. Dolayısıyla onları güvenli bir şekilde kullanmak ve düzgün bir şekilde atmak gereklidir (11).

2.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırması

Pestisit, böcek öldürücü, herbisit, fungusid, rodentisit, odun koruyucusu, bahçe kimyasalları ve zararlıları öldürmek ya da zararlılardan korumak için kullanılan çeşitli dezenfektanları sınıflandıran yaygın bir terimdir (10). Bu pestisitlerin fiziksel, kimyasal ve özdeş özelliklerinde bir sınıftan diğerine farklılık gösterir. Sentetik zirai ilaçlar, insan yapımı kimyasallardır ve doğada görülmezler. İhtiyaçlara göre çeşitli sınıflara ayrılırlar. Bunlar; formülasyon şekillerine, kullanıldıkları zararlı grubuna, etki şekillerine ve bileşimindeki etkili madde grubuna göre sınıflandırılmaktadırlar. Kullanıldıkları zararlı

grubuna göre sınıflandırmada böcek öldürücüler, mantar öldürücüler, bakterisitler, herbisitler, rodentisitler, algasitler, larvikitler, nematisitler, termitisitler gibi gruplar bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılanları herbisitler, insektisitler ve fungusitlerdir. Fungisitler mantarları yok etmek için kullanılan maddelerdir ve Dodin fungusitler sınıfında bulunan bir pestisitir (12).

2.1.1.1. Herbisitler

Yaklaşık yüzyıl öncesine kadar insanlar, yemlerin bitki örtüsü ile rekabet edip etmediğini göz önüne alarak, bitkilerinin verimli bir şekilde yetiştirilmesi için yabancı otları kaldırmak ve uygun koşullar sağlamak için mekanik yöntemler kullanmışlardır. Bu da yabancı otların, kullanılabilen bitkilerin olmadığı yerlerde büyüyen bitkiler olduğu anlamına gelir. Herbisitler ve bunların biyokimyasal etki mekanizmalarıyla ilgili araştırmalar, bitkilerdeki birkaç biyokimyasal yolun detaylarını çözmeye yardımcı olmuştur. Tarihsel olarak, çeşitli kimyasalların fotosentez ve solunum üzerindeki etkileri 1878'den beri araştırılmıştır. Daha sonra, kloroform, solunumu etkilemeyen konsantrasyonlarda fotosentezi tersine engelleyen bir madde olarak tanımlanmıştır (13).

Çoğu modern herbisit, düşük memeli toksisitesine sahiptir. Çünkü yeni herbisitler için yapılan araştırmalar, memeliler tarafından paylaşılan metabolik yolları etkileyen kimyasalları genellikle reddeder. Çoğu durumda, düşük memeli toksisitesi, bu kimyasalların, fotosentez, esansiyel aminoasitler biyosentez veya klorofil biyosentez gibi memelilerde mevcut olmayan biyokimyasal yollara müdahale etmesi ile ilgilidir. Bitkilerdeki ve memelilerdeki benzer hedef siteleri etkileyen, bipiridilitlerin haricinde, piyasada bulunan diğer herbisitler, memeliler için en az toksikliğe sahiptirler. Çünkü memeliler tarafından hızla metabolize edilir ve atılırlar. Herbisitler memeli dokusunda birikmediğinden, biyosentetik yolları etkileyemez (14).

Herbisitler de karotenoid sentezini inhibe edebilir. Karotenoidler serbest radikal süpürücü olduklarından, klorofili fotoooksidasyondan korurlar (ağartıcı herbisitler). Ağartıcı herbisit olarak tanımlanan ilk bileşiklerden biri, piridinazinon SAN 6706'dir (15). Daha sonra benzer fonksiyonlarla tanımlanan diğer bileşikler arasında fluridon, difunon, diklormat ve aminotriazol bulunur (13). Herbisitlerde toksisitenin çoğu, aktif herbisitten değil, herbisitin formülasyonuna dâhil edilen ilgili yüzey aktif madde ile ilgili olabilir (16).

Herbisitlerin avantajları:

- ✓ İstenmeyen bitkileri öldürürler.
- ✓ Bitkilerin suyu, besin maddeleri ve güneş ışığını alan otları yok ederek bitkilerin yetişmesine yardımcı olurlar.
- ✓ Diğer yöntemlerin kullanılmadığı yakından ekilen mahsullerde kullanılabilirler.
- ✓ Çoğu zaman herbisit bir uygulaması yeterlidir.
- ✓ Kullanımı kolaydır.
- ✓ Herbisitler nispeten ucuzdur ve manuel zararlı otlardan daha ucuzdur.
- ✓ Seçici olmayan herbisitler, daha sonra evlerin ve yolların inşa edilebileceği alanları temizler.
- ✓ Hastalık taşıyan bitkileri yok edebilirler.
- ✓ Bazıları biyolojik olarak parçalanabilir ve çürümeden sonra nispeten zararsız hale gelir.

Herbisitlerin dezavantajları:

- ✓ Bazı herbisitler biyolojik olarak parçalanamazlar ve uzun süre zararlı olabilirler.
- ✓ Hepsi en azından biraz zehirlidir.
- ✓ Hastalıklara neden olabilirler; Hatta kazara veya intihar amaçlı ölümlere (paraquat gibi) neden olabilirler.
- ✓ Yağmur suyu akıntısına taşınabilir veya onları kirleten yer altı su kaynaklarına sızıntı yapabilirler.
- ✓ Otçular, herbisitlerle ıslah edilen bitkileri yiyebilir ve daha sonra bu otçular etçil hayvanlar tarafından yenilir. Zehirli herbisit konsantrasyonunda artan gıda zincirinden geçerek bu hayvanlara ve insanlara zararlı olur (11).

2.1.1.2. İnsektisitler

İnsektisitler böceklere karşı kullanılan pestisitlerdir. Modern insektisitlerin çoğu, sinir sistemini (böceklerin boyutlarına göre) yeterince büyük bir dozla zehirleyerek hareket eder. En yaygın böcek öldürücü sınıfları Organoklorürler, Pyrethroids, Organofosfatlar ve Carbamates'dir. Böcek öldürücü ilaçlar, böcek gelişiminin herhangi bir aşamasını hedeflemek için geliştirilebilir ve temasta nötralize edilebilir veya maruz

kaldıktan sonra gecikmeli bir etkiye sahip olabilir. Böceklerin, hayvanların ve insanlardaki sinir sistemi arasındaki benzerlikler nedeniyle böcek öldürücüleri, zararlı olmayan organizmalar üzerinde sıklıkla zararlı etkilere sahiptir. Örneğin, organofosfat zirai ilaçlarına (Diazinon, malathion ve klorpirifos gibi) akut insan maruziyetinin belirtileri kas seğirme, titreme, uyuşmazlık, baş dönmesi, mide bulantısı ve solunum problemleri içerir (17).

Organofosfatlar çoğu ev ve endüstriyel kullanıma sahip kimyasallardan oluşan bir gruptur. Ancak yaygın olarak böcek öldürücü olarak kullanılırlar ve birtakım zehirlenmelerden sorumludurlar. Ana mekanizma enzim asetilkolinesterazı bloke ederek böceklerin ölümüyle sonuçlanan sinir ve solunum zararlarına neden olmakla birlikte, insanlar için de tehlike arz etmektedir. Organoklorür insektisitlerin kullanımının kesilmesinden sonra, en çok kullanılan Pestisitler haline geldi ve Birleşik Devletler'deki pestisit kullanımının % 70'inden sorumludurlar.

Organofosfatlar ilk olarak 1940'larda oldukça toksik biyolojik savaş ajanları olarak geliştirildi. Bu bileşik grubuna Sinir Ajanlar, modern türevleri Sarin, soman ve VX olarak adlandırılır. Araştırmacılar, bazı türlerin özelliklerini hedefleyecek, böylece istenmeyen etkilerini sınırlayabileceklerini ümit eden birçok bileşik oluşturdu. Organofosfatların ve Karbamatların kimyasal yapıları çok farklı olsa da, mekanizmalar aynıdır. Gerekli asetilkolinesteraz enzimini engelleyerek asetilkolin reaksiyondan uzaklaştırırlar. Organofosfatlar çoğunlukla sinir ağları veya kimyasal silahlar ve böcek ilacı ile ilişkili olsalar da çeşitli ortamlarda kullanılırlar, ancak bazen endüstriyel ortamlarda da kullanılırlar (18).

Klorlu hidrokarbonlar, Diklorodifenil trikloroetan (DDT)'nin böcek öldürücü özelliklerinin keşfedilmesinden sonra 1940'lı yıllarda geliştirildi. Bu serinin diğer örnekleri lindane, Klorobenzilat, metoksiklor ve siklodienlerdir (aldrin, dieldrin, klordan, heptaklor ve endrin içerir). Bu bileşiklerin bazıları oldukça kararludur ve uzun bir süre etkiye sahiptir; bu nedenle, uzun süre korunmanın gerekli olduğu durumlarda özellikle değerlidirler. Zehirli eylemleri tam olarak anlayamamıştır. Ancak sinir sistemini bozduğu bilinmektedir. Karbamatlar, karbamil, metomil ve karbofuran gibi bileşikler içeren nispeten yeni bir insektisit grubudur. Hayvan dokularından hızla detoksifiye edilir ve yok edilir. Toksikliklerinin, organofosfatlar için biraz benzer bir mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (19).

20. yüzyılın ortalarında sentetik organik böcek öldürücülerin ortaya çıkması, böceklerin ve diğer eklembacaklı zararlıların kontrolünü çok daha etkili hale getirdi ve

bu tür kimyasallar, çevresel dezavantajlarına rağmen modern tarımda temel olmayı sürdürüyor. Modern insektisit, ürün kayıplarını önlemek, ürün kalitesini yükseltmek ve tarım maliyetini düşürmek suretiyle, 1945-65 döneminde Dünya'nın bazı bölgelerinde mahsul verimini yüzde 50 oranında artırdı. Ayrıca hem insanların hem de evcil hayvanların sağlığının iyileştirilmesinde önemli olmuştur; sıtma, sarı humma ve tifüs, diğer bulaşıcı hastalıklar arasında Dünya'nın çeşitli yerlerinde kullanımı ile büyük ölçüde azalmıştır (20).

Ancak böcek öldürücülerin kullanımı da, çevre kirliliği ve zararlı türlerindeki direnç gelişimi gibi başta olmak üzere birçok ciddi sorunla sonuçlanmıştır. Böcek öldürücüler zehirli bileşikler olduğundan zararlı böceklerin yanı sıra diğer organizmaları da olumsuz yönde etkileyebilirler. Aslında bazı böcek öldürücülerin çevreye biriktirilmesi, hem yaban hayatı hem de insanlar için ciddi bir tehdit oluşturabilir. Çoğu böcek ilacı kısa ömürlüdür veya onları tüketen hayvanlar tarafından metabolize edilir. Ancak bazıları ısrarcıdır ve büyük miktarlarda uygulandığında çevreye yayılırlar. Bir böcek ilacı uygulandığında, bunun büyük bir kısmı toprağa ulaşır ve yeraltı suları doğrudan veya dolaylı yollardan kirlenebilir. Ana kirletici maddeler, DDT, aldrin, dieldrin ve heptaklor gibi klorlu hidrokarbonlardır. Tekrarlanan püskürtme nedeniyle, bu kimyasallar şaşırtıcı derecede büyük miktarlarda (10 döngü başına 10-100 libre) topraklarda birikebilir ve yem hayvan zincirleri ile ilişkilendirildiklerinde yaban hayatı üzerindeki etkisi büyük ölçüde artar. DDT ve akrabalarının kararlılığı, besin zincirinin üst kısmındaki diğer hayvanlarda beslenme oluşturan böceklerin vücut dokularında birikimine neden olur ve bunlara toksik etkileri olur. Kartal, şahin gibi kuşlar genellikle en çok etkilenir ve popülasyonlarındaki ciddi düşüşler DDT ve pestisitlerin etkileri ile ilgilidir. Sonuç olarak, 1960'larda bu kimyasalların kullanımı sınırlandırıldı ve birçok ülkede 1970'lerde tamamen yasaklandı (21).

İnsanlarda insektisit zehirlenmesi vakaları doğrudan maruz kaldıkları tarım işçilerine karşı toksik etkileri nedeniyle parathion'un kullanımı 1991'de Birleşik Devletlerde büyük ölçüde kısıtlanmıştır (22).

Bazı böcek öldürücü ilaçların ağır kullanımı ile ilgili problemler nedeniyle mevcut böcek kontrolü uygulamaları, entegre kontrol adı verilen bir yaklaşımla biyolojik yöntemlerle kullanımını birleştirmektedir (23).

2.1.1.3 Fungisitler

Mikroorganizmaların yararlı faaliyetleri üzerine fungusitlerin etkisini anlamak, tarımda kullanılan fungusit ile ilgili tehlikeleri değerlendirmek için önemlidir. Mahsul

verimliliği ve ekonomik getiri, iyi mantar patojenleri kontrol eden ancak yararlı organizmaları koruyan ürünlerin kullanılması ile en üst düzeye çıkacaktır. Farklı organizmalar özdeş veya benzer mekanizmalara ve bileşenlere sahip olabilir ve spesifik olmayan bağlanma bölgelerini hedefleyen fungusitler doğrudan hedef olmayan organizmaları etkileyebilir. Örneğin, karboksilik asit fungusitlerinin toksisitesi, DNA izoizomeraz II üzerinde bu kimyasalların bağlanma kabiliyetinden, DNA'nın protein sentezine ve DNA replikasyonuna izin vermek için gevşemesine ve rüzgarına neden olan yaygın bir enzim olarak türetilir. Bu enzim mantarlarda değil, aynı zamanda prokaryotik hücrelerde bulunur (24). Bazı glikopiranozil antibiyotik fungusitler, amino asitler sentezini engelleyebilecek bakteriler için toksiktir (25).

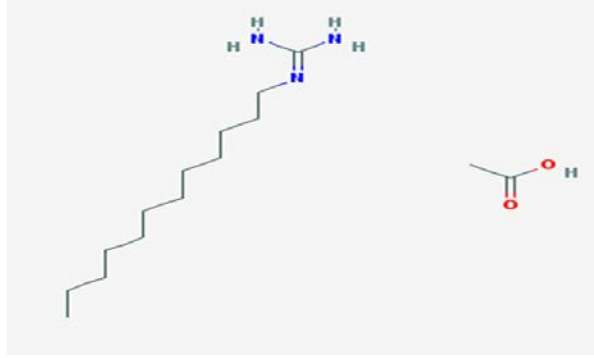
Bu fungusitler aynı zamanda bazı nonfungal yüksek ökaryotik organizmalar için toksiktir (26). Dolaylı nontarget etkileri de mümkündür. Mikroorganizmalar işlevsel ya da beslenme bakımından birbirleriyle bağlantılıdır ve bir mikrobiyal topluluğun bir bileşenindeki değişiklikler tüm toplumun yapısını etkileyebilir. Bu, bitki metabolizması üzerinde etkisi olan ve bitki metabolizması durumundan etkilenen bitki ile ilişkili mikroorganizmalar için özellikle geçerlidir (27–29).

Dodin: Dodin ilk kez 1956 yılında Amerikan Cyanamid tarafından tescillendi. Dodin ağız ve deri yoluyla ve solunumla absorbe edilebilmektedir. Yapılan araştırmalarda insanlara ve diğer hayvanlara özellikle de balıklarda ve arılara karşı toksik olduğu saptanmıştır (30).

Dodine ağız ve deri yoluyla ve solunumla absorbe edilebilmektedir. Yapılan araştırmalarda insanlara ve diğer hayvanlara özellikle de balıklarda ve arılara karşı toksik olduğu saptanmıştır. Dodinin insanlar üzerindeki Ölümcül doz (LD50) değeri 1000 mg/kg dır. Zehirlilik sınıfı III tür. Zehirlenme belirtileri karın ağrısı, kusma, gözde ve deride kaşınmadır (6). Tarım alanlarında mantar öldürücü olarak kullanılan ilk fungusit bir bileşiklerdendir. Dodin'in moleküler yapısı ve genel özellikleri Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Dodinin genel özellikleri

Dodin	
IUPAC	n-dodecylguanidinium acetate
Kimyasal Formül	$C_{15}H_{33}N_3O_2$
Aktivite	Fungusit



Şekil 2.1. Dodin bileşiğinin molekül şekli.

2.2. Dünya’da, Türkiye’de ve Malatya’da Pestisit Kullanımı

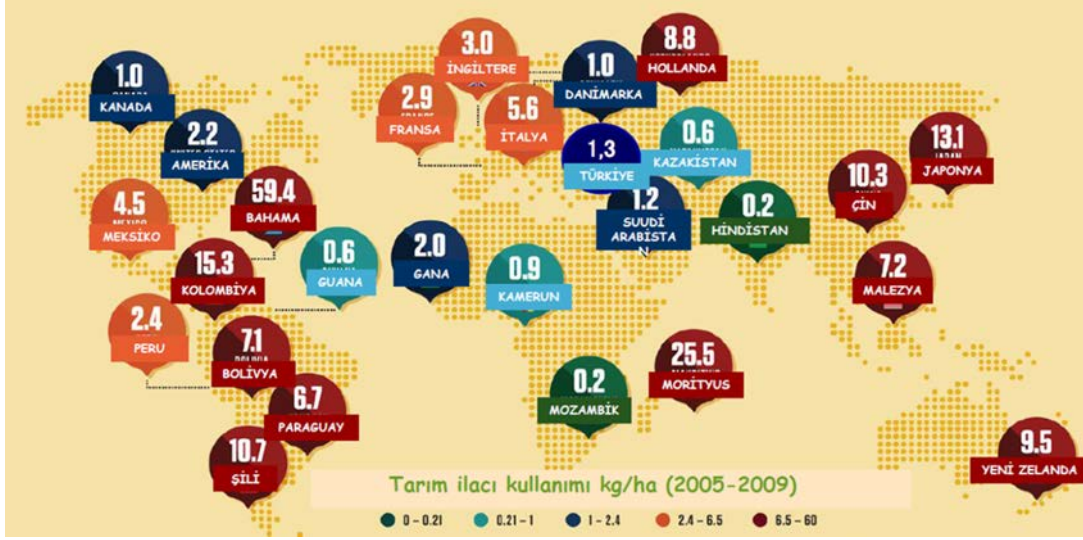
Türkiye’de etkili madde olarak yıllara göre pestisit tüketimi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB) ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi

Yıllar	Tüketim (Ton)	Birim Alana Tüketim (g/ha)
1978	8 396	506
1983	12 146	708
1989	10 875	571
1993	12 566	663
1997	13 083	703
2000	12 458	683
2004	13 146	726
2006	18 258	1047
2007	18 944	1118
2008	20 032	1209
2009	15 412	950
2010	20 121	1234
2011	27 521	1752
2012	25 460	1071
2013	24 565	1032

1978-2004 döneminde ülkemizde pestisit tüketimi olarak 8 bin ton ile 14 bin ton arasında değişim göstermiştir. Bu dönemde hektara tüketim, yine etkili madde olarak 500 g ile 700 g’lar arasında olmuştur. Ancak 2006 yılında ülkemizde pestisit tüketimi 18 bin tonu geçmiş, 2008’de 20 bin tona ulaşmış, 2011 yılında 27521 tonu bulmuştur. 2012 ve 2013 yıllarında tüketimde bir miktar düşüş gözlenmiş; ancak, 2009

yılı hariç tutulursa, 2008'den itibaren tüketim 20 bin tonun üzerinde gerçekleşmiştir. Birim alana tüketim, 2006 yılında 1 kg'ı aşmış ve yine 2009 dikkate alınmazsa, tüketim sürekli 1 kg'ın üzerinde gerçekleşmiştir. Hatta 2011 yılında 2 kg'a yaklaşmıştır (31). Aslında, Tablo 2.2'de özetlenen 'birim alana tüketim' değerleri gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında, ülkemizdeki tüketimin yüksek olmadığı anlaşılır. Örneğin hektara tüketim ABD'de 2.2 kg, Fransa'da 2.9 kg, İtalya'da 5.6 kg, Hollanda'da 8.8 kg, Çin'de 10.3 kg ve Japonya'da da 13.1 kg olarak bilinmektedir (32).



Şekil 2.2. Dünya'da tarım ilacı kullanımı kg/ha (2005-2009)

Ancak Türkiye'deki tüketim değerleri iki açıdan irdelenmelidir. Birincisi, tarım ilaçları ülkemizde bir miktar bilinçsiz ve bir miktar da kontrolsüz kullanılmaktadır (33,34). İkincisi ise, tüketimin % 60'dan fazlası Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerimizde gerçekleştirilmektedir (32). Bu üç bölgemiz hem beslenmemizde, hem de ihracatımızda önemli yer tutan sebze ve meyvelerin yetiştiği alanlar olması yanı sıra, TÜİK (2013) verilerine göre, nüfus yoğunluğu açısından da ülkemizin en kalabalık yörelerindedir. Bu açılardan düşünüldüğünde Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerimizdeki pestisit tüketiminin gelişmiş ülkelerin, örneğin ABD'nin ya da Fransa'nın düzeyinde olduğu ancak; oluşturabileceği sorunların ise, bu ülkelere göre daha ciddi olabileceği söylenebilir.

En önemli pestisit sınıfları olan insektisitlerin, fungusitlerin ve herbisitlerin GTHB verilerine göre, 2006-2013 yıllarındaki tüketimleri ve toplam pestisit tüketimi ile karşılaştırılması Tablo 2.3'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Türkiye’de 2006-2013 yıllarında insektisit, fungusit, herbisit ve toplam pestisit tüketimi (Ton)

Yıllar	İnsektisit*	Fungisit*	Herbisit*	Diğerleri*	Toplam Tüketim
2006	3 406 (% 18.65)	4 432 (% 24.27)	5 400 (% 29.57)	5 020 (% 27.49)	18 258
2007	3 568 (% 18.83)	4 945 (% 26.10)	4 630 (% 24.48)	5 793 (% 30.57)	18 944
2008	3 219 (% 16.06)	4 901 (% 24.46)	5 581 (% 27.86)	6 331 (% 31.60)	20 032
2009	5 290 (% 34.31)	2 197 (% 14.25)	2 234 (% 14.49)	5 691 (% 36.92)	15 412
2010	2 953 (% 14.67)	7 559 (% 37.56)	6 145 (% 30.54)	3 464 (% 17.21)	20121
2011	3 958 (% 14.38)	9 287 (% 33.74)	10396 (%37.77)	3 880 (% 14.09)	27 521
2012	3 582 (% 14.06)	8 178 (% 32.12)	8 281 (% 32.52)	5 419 (% 21.28)	25 460
2013	3 687 (% 15.00)	8 230 (% 33.50)	7 873 (% 32.04)	4 775 (% 19.43)	24 565

* Parantez içindeki değerler, toplam tüketim içindeki oranı göstermektedir.

Tablo 2.3’de görüldüğü gibi, bazı iniş-çıkışlara karşın insektisit tüketiminde 2006’ya göre 2013’de bir artış var gibi görünüyorsa da, toplam pestisit tüketimi içinde, oransal olarak azalış eğilimindedir. Bunun aksine, fungusit ve herbisit tüketimi bazı dalgalanmalara karşın, gerek miktar bazında, gerekse oransal olarak artış göstermektedir. ‘Diğerleri’ sütununda ise, ‘kış mücadele ilaçları ve yağlar’, ‘nematisitler ve fümigantlar’, ‘akarisitler’ ile ‘rodentisitler ve mollussisitler’ yer almaktadır (31, 33, 34). Malatya’da hastalıklara ve zararlılara karşı mevsimsel olarak kullanılan tarım ilaçları aşağıdaki Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4. Malatya’da hastalıklara ve zararlılara karşı mevsimsel olarak kullanılan tarım ilaçları

Hastalık-Zararlı	Mücadele Zamanı	Kullanılan İlaçlar
Dal yanıklığı ve kızıl leke	Sonbaharda yapraklar dökülünce	%2’lik bordo bulamacı (CuSO ₄) veya % 50 metalik bakır
Kabuklu bit	İlkbaharda tomurcuklar kabarmadan önce	Methidation, Chlorpyrifos ethyl
Dal yanıklığı ve kızıl leke	Tomurcuklar kabardığında	% 1’lik bordo bulamacı (CuSO ₄) veya % 50 metalik bakır
Monilya	1.İlaçlama çiçeklerin % 5’i açtığında 2. İlaçlama çiçeklerin % 100’ü açtığında	Benomyl, carbendazim, Dodine, captan, zinep
Kızıl leke	Meyveler zeytin çekirdeği büyüklüğüne geldiğinde	Dodin, zinep, thiram
Elma iç kurdu	Kayısı çekirdeğinin sertleştiğinde	Azinphos methyl, carbaryl fention
Yazıcı böcekler	1.İlaçlama, Nisan-Mayıs 2.İlaçlama, Temmuz-Ağustos	Carbaryl, methiocarb, Azinphos methyl

2.3 Pestisitlerin Çevreye Etkileri

Pestisitlerin etki alanını sınırlamak neredeyse imkânsızdır. Çok küçük bir alana uygulandığında bile havaya yayılır, toprağa emilir veya suda çözünür ve sonunda daha büyük bir alana ulaşır. Zirai ilaçlar tarımsal ürüne püskürtüldüğünde havadan içeri girip nihayetinde toprakta veya suda olduğu gibi diğer çevrede sonuçlanabilir. Doğrudan toprağa uygulanan böcek ilacı yıkanabilir ve yüzey akışı vasıtasıyla yakındaki yüzey su kütlelerine ulaşabilir (35). Pestisitlerin çevre sistemi üzerindeki etkileri, ekosistemin normal işleyişinde tür çeşitliliğinin kaybolmasına küçük bir sapma gösterebilir. Bazen, pestisitlerin kullanılması uzun süreli kalıcı etkilere neden olabilir ya da ölümcül ciddi etkilere neden olabilir. Örneğin, çoğu organik klorür böcek ilacı, çevreye uzun süre boyunca kalıcıdır, bu nedenle yeraltısuyu, yüzey suyu, gıda ürünleri, hava ve toprak kirlenmesine neden olur (11).

Çoğu böcek ilacı zararlıları öldürmek için kullanılmış olmasına rağmen solucan, doğal avcılar ve tozlayıcı gibi hedefe dönük olmayan organizmaları da olumsuz yönde etkilemektedir (36). Pestisit uygulamaları, solucan topluluklarında azalmaya neden

olabilir. Örneğin, karbamat böcek ilaçları solucanlar için çok toksiktir ve bazı organofosfatların, solucan topluluklarını azalttığı gösterilmiştir (37).

Ne yazık ki, parazitoidler ve predatörler (zararlı nüfus düzeyini kontrol altında tutmak için gerekli olan) gibi doğal avcı böcek öldürücülere karşı daha duyarlıdır ve ciddi şekilde etkilenmektedir (38). Bu doğal avcılarının tahrip edilmesi zararlı sorunları daha da kötüleştirebilir. Genellikle, doğal düşmanlar yoksa hedef zararlıyı kontrol etmek için ilave insektisit spreyleri gerekir. Ek olarak, böcek öldürücü ilaçlar yırtıcı hayvan davranışını ve büyüme hızı, gelişim zamanı ve diğer üreme işlevlerini de içeren yaşam öyküsü parametrelerini de etkileyebilir (11).

Arılar, meyve sinekleri, bazı böcekler ve kuşlar gibi polinatörler, böcek öldürücü uygulamalarının ve habitat değişikliklerinin neden olduğu çevresel streslerden etkilendiği için, ekosistem süreçlerinin biyoindikatörleri olarak birçok yönden kullanılabilirler (39). Pestisit kullanımı, yeterli toplayıcı popülasyonunun olmaması nedeniyle böcek tozlama düzenleyicilerinin doğrudan kaybına ve bitkilere dolaylı olarak zarar verebilir (40).

Biyçeşitlilik genellikle sağlıklı biyolojik sistemlerin bir ölçüsü olarak düşünülür. Dengelerde yaşayan organizmaların sayısı ne kadar çok olursa, o çevre o kadar sağlıklı olur. Farklı bir çevre, hepsinin birbirine bağlı olduğu birçok yaşam biçimini sürdürür. Bunlar mikroplardan böceklere, karıncalar, böcekler ve arılardan kuşlara, tilkiler, kurtlar, vahşi köpekler, aslanlar, kaplanlar ve ayılar gibi yırtıcı hayvanlar gibi büyük hayvanlara kadar değişebilir. Böyle bir sistem, hiç kimsenin hâkim olamayacağı şekilde dengesini sürdürebilme yeteneğine sahiptir. Bazen zararlı, diğer zararlıları tüketip kontrol ederek biyolojik bir sisteme faydalı olabilir. Bu nedenle, pestisit kullanarak tek bir türün bile ortadan kaldırılması önemli değişiklikler yapabilir ve bu ortamda birçok başka değişikliğin soyu tükenmesine neden olabilir. Bazı durumlarda, bir pestisit, tüm topluluğun işleyişi için gerekli olan bir türü ortadan kaldırabilir veya istenmeyen türlerin hâkimiyetini artırabilir veya toplulukta bulunan türlerin sayısını ve çeşitliliğini azaltabilir. Bu, türler arasındaki mevcut beslenme bağlantılarını kopartarak toplumdaki besin ağlarının dinamiklerini bozabilir (11).

Hedef olmayan pestisitlerin tarım uygulamasından ve diğer kaynaklardan önemli bir kısmı toprakta birikebilir. Ayrıca, böcek ilacının rasgele ve tekrar tekrar kullanılması bu toprağın birikimini arttırmaktadır. Zemin özellikleri ve toprak mikroflorası, çeşitli bozunma, taşıma ve adsorpsiyon / desorpsiyon işlemlerinde geçebilen zirai mücadele ilaçlarından dolayı etkilenir (41). Parçalanmış böcek ilacı toprakla ve yerli

mikroorganizmaları ile etkileşime girer, böylece mikrobik çeşitliliği, biyokimyasal reaksiyonları ve enzimatik aktiviteyi değiştirir (41, 42).

Mikrobiyal çeşitlilik ve toprak biyokütlesindeki herhangi bir değişiklik sonunda toprak ekosisteminde bozulmaya ve toprak verimliliğini kaybetmeye neden olur. Pestisit uygulaması bazı grup mikroorganizmaları da engelleyebilir veya öldürebilir ve diğer grupları rakiplerinden daha fazla çıkarabilir (39). Belirli toprak mikroorganizmalarını ve/veya enzimleri aktive/deaktif ederek azot fiksasyonu, nitrifikasyon ve amonyaklaştırma da dâhil olmak üzere toprakları hayati biyokimyasal reaksiyonları olumsuz şekilde etkilerler (41, 42).

Pestisitlerin toprak kalitesini ve verimliliğini belirleyen önemli bir toprak mülkü olan toprak organik maddesinin mineralizasyonunu etkilediği de bildirilmiştir.

Pestisit kalıntıları, su ve insanlar da dâhil olmak üzere biyolojik topluluklar için ciddi bir tehdit oluşturduğu için büyük bir endişe kaynağıdır. Pestisitlerin kazara dökülme, endüstriyel atık su, yüzey akışı ve böcek öldürücü ile muamele edilen topraklardan taşınması, püskürtme operasyonundan sonra sprey ekipmanının yıkanması, göletler, göller, akarsular ve nehir suyuna sürüklenmesi gibi havaya karışabilecek çeşitli yollar vardır. Pestisitler genellikle yağmur veya sulama ile indüklenen drenaj veya akarsu ile tarlalardan çeşitli su depoları içine taşınırlar (43).

Benzer şekilde havadaki pestisitlerin varlığı, sprey sürüklenmesini, işlemden geçirilen yüzeylerden uçucu hale gelmeyi ve pestisitlerin hava yoluyla uygulanmasını içeren faktörlerin birçoğundan kaynaklanabilir. Sürüklenme derecesi aşağıdakilere bağlıdır: damlacık ebadı ve rüzgâr hızı. Buharlaştırma oranı, böcek ilacı muamelesinden sonra geçen zamana, böcek ilacının ortam sıcaklığına, rutubet ve rüzgâr hızına ve bileşenlerin buhar basıncına yerleştiği yüzeye bağlıdır. Pestisit bileşiklerinin uçuculuk veya yarı değişkenlik özellikleri benzer şekilde büyük kentlerin atmosferik kirliliğine neden olan önemli bir risk oluşturmaktadır (44).

2.4 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Tarım ve kamu sağlığı sektöründe pestisidlerin yararlı sonuçlarına rağmen, bunların kullanımı, zararlı çevresel ve halk sağlığı etkilerini de beraberinde getirir. Pestisitler, yüksek biyolojik etkinlikleri ve toksisitesi nedeniyle çevre kirleticileri arasında eşsiz bir konumda bulunuyorlar. Çoğu böcek ilacı zararlılarla diğer rastlantısal yaşam biçimlerini ayırmaz. Yanlış kullanıldığında, insanlar, hayvanlar, diğer canlı organizmalar ve çevre için potansiyel olarak zararlıdır. Yaklaşık 5000-20.000 kişinin öldüğü ve her yıl pestisit nedeniyle yaklaşık 500.000 ila 1 milyon kişinin zehirlendiği

tahmin edilmektedir (45, 46). Zehirlenmelerden ötürü en az yarısı bilinç kaybına neden olmaktadır ve bilinç kaybı olanların % 75'i tarım işçileridir. Geri kalanı ise yiyecek kirliği nedeniyle zehirlenmektedir.

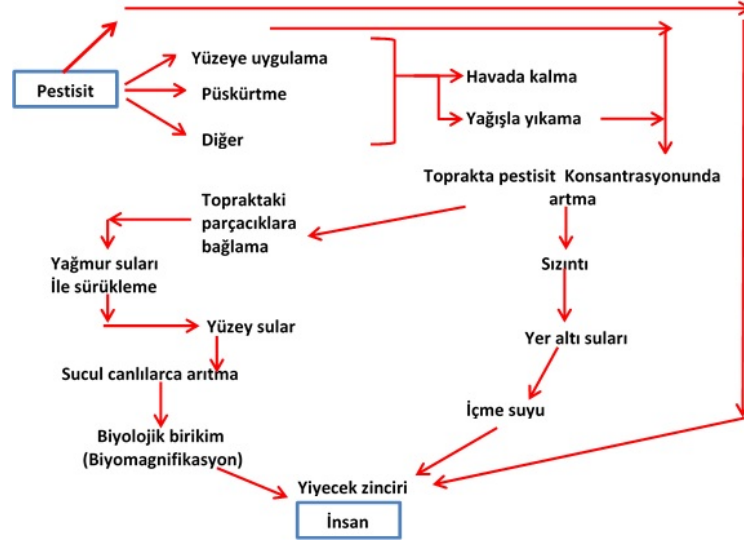
Pestisitler, pestisit içeren kirli hava, toz ve buharın teneffüs edilmesi; kontamine yiyecek ve su tüketerek oral maruziyet ve böcek ilacı ile doğrudan temas ve dermal olarak maruz bırakma yoluyla insan vücuduna girebilir (11). Pestisitler özellikle meyve ve sebze üzerine püskürtülerek, içme suyuna dönüşebilecek topraklara ve yer altı sularına salınırlar. Kimyasalların toksisitesi, maruz kalmanın uzunluğu ve büyüklüğü, insan sağlığı üzerindeki zararlı etkinin derecesini belirler (47). Kimyasalların zehirliliği, toksik maddenin doğasına, maruz kalma yollarına (oral, dermal ve inhalasyon), doz ve organizmaya bağlıdır.

Toksisite akut veya kronik olabilir. Akut toksisite, bir maddenin absorbe edildikten sonra hızla gelişen zararlı etkilere, yani birkaç saat veya günde birine neden olma kabiliyetidir. Kronik toksisite, bir maddenin uzun süre maruz kalmasından kaynaklanan olumsuz sağlık etkilerine neden olan bir maddenin yeteneğidir. LD50, popülasyonun genetik olarak homojen olduğu test popülasyonunun %50'sini öldürmek için gereken organizmanın birim ağırlığı başına zehirin tek maruz kalma dozu olarak tanımlanır. Kilogram vücut ağırlığı başına miligram olarak ifade edilir. LC50, kimyasalın, deney popülasyonunun genetik olarak homojen olduğu test popülasyonunun %50'sinde mortaliteye neden olan harici ortamdaki (genellikle hava veya su içeren deney hayvanlarını) konsantrasyonudur. Herhangi bir giriş yoluyla tek bir maruz kalmadan meydana gelen zararlı etkilere "akut etkiler" denir. Maruz kalmanın dört yolu dermal (cilt), teneffüs (akciğerler), oral (ağız) ve gözlerdir. Akut toksisite, test hayvanlarının dermal toksisitesi, soluma toksisitesi ve oral toksisitesi incelenerek belirlenir. Buna ek olarak, göz ve cilt tahrişi de incelenir. Akut hastalık genellikle temas veya pestisit maruz kaldıktan kısa bir süre sonra görünür. Tarımsal alanlardan pestisit sürüklenmesi, uygulama esnasında pestisitlere maruz kalma ve kasıtlı veya kasıtsız zehirlenme, genellikle insanlarda akut hastalığa neden olur (48, 49). Pestisit zehirlenmesine bağlı olarak baş ağrısı, vücut ağrısı, deri döküntüsü, konsantrasyon yetersizliği, mide bulantısı, baş dönmesi, görme bozukluğu, kramplar, panik ataklar ve şiddetli vakalarda koma ve ölüm gibi çeşitli belirtiler oluşabilir. Her yıl dünya çapında böcek ilacı nedeniyle akut zehirlenme vakalarının yaklaşık 3 milyonu bildirilmektedir. Bu 3 milyon pestisit zehirlenmesi vakasının 2 milyondan biri intihar girişimi, diğerleri ise mesleki ya da kaza sonucu zehirlenme vakaları (50). Bir süre boyunca tekrarlanan

küçük dozlardan kaynaklanan tüm zararlı etkilere "kronik etkiler" denir. Bazı böcek ilaçlarına maruz kalındığından şüphelenilen kronik etkiler arasında doğum kusurları, fetusa toksisite ve benign veya malign tümörler, genetik değişiklikler, kan hastalıkları, sinir bozuklukları, endokrin bozulma ve çoğalma etkileri sayılabilir. Bir pestisit kronik toksisitesi akut toksisiteye göre laboratuvar analizi yoluyla tespit edilmesi daha zordur. Zehirli madde miktarlarına uzun süre tekrar eden ve tekrarlanan maruz kalma (birkaç yıl ila on yıllar olabilir) insanlarda kronik hastalığa neden olur. Semptomlar hemen fark edilmez, ancak daha sonraki bir aşamada ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, özellikle kirlenmiş yiyecek ve su veya tarlalardan pestisitlerin sürüklenmesinden dolayı genel nüfusun eşit olarak etkileneceği bildirilmiştir (51). Yakın geçmişte birçok çalışma pestisit maruziyeti ile sinir, üreme, renal, kardiyovasküler ve solunum sistemlerini etkileyen insan kronik hastalıklarının görülme sıklığı arasında bir bağlantı kurmuştur (52).

2.5. Pestisitlerin Su Ürünleri İle Alım Yolları

Sudaki pestisit kalıntıları, insanlar da dâhil olmak üzere biyolojik topluluklar için ciddi bir tehdit oluşturduklarından büyük bir endişe kaynağıdır. Pestisitlerin kazara dökülme, endüstriyel atık sular, yüzey akması ve pestisitle muamele edilmiş topraklardan taşınması, püskürtme işleminden sonra sprej ekipmanının yıkanması, havuzlara, göllere, akarsulara ve nehir suyuna sürüklenmesi, hava spreji gibi suya girebilmesinin farklı yolları vardır. Pestisitler genellikle tarlalardan farklı su rezervuarlarına veya yağmur veya sulama ile indüklenen drenajlarda hareket ederler. Biyolojik ayıklama, gıda zincirinin her bir ardışık seviyesinde pestisitlerin birikmesidir. Bazı pestisitler besin zincirinde biyobirikime neden olur. Örneğin, sudaki küçük miktarlarda bir böcek ilacı mevcutsa, böcekler ve küçük deniz canlıları tarafından tüketilen su bitkilerince emilebilir. Bunlar ayrıca kontamine olurlar. Gıda zincirindeki her adımda pestisit konsantrasyonu artar (43) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Pestisitlerin doğadaki hareketleri

2.5.1. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Özellikleri

Pasifik kıyılarındaki tatlı sularda yaşar. *Oncorhynchus mykiss* bireyleri, muhtemelen 11 yıla kadar, vahşi doğada ise 6 ila 8 yıl yaşarlar. Denizlere giren alt türleri vardır. Doğal olarak ülkemizde bulunmaz. Ancak ülkemizde su ürünleri yetiştirme tesislerinde üretimi yapılmaktadır. Vücut diğer türlere göre daha tıknaz ve çok sayıda siyah nokta ile kaplı olup, ortası gökkuşluğu renginde bantlıdır. Kuyruk ve yağ yüzgeçleri beneklidir. Yumurtlama mevsiminde erkekler parlak grimsi siyah, dişiler ise daha soluk renklidir.



Şekil 2.4. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Yaşam için tatlı su veya ılıman bölgedeki deniz sularını tercih eder. Çelik kafa denilen anadromöz form, tatlı su dağlarında gelişimini tamamlar ve sonra yetişkin hayatlarını okyanusta geçirmek üzere göç eder. Tatlı suda serin suyu tercih ederler, ancak 24 °C'ye kadar su sıcaklıklarına toleranslı oldukları bilinmektedir. Üretken derelerin riffles ve havuzları yaşamaları için iyi bir bitki örtüsüne sahiptir. En önemlisi, yumurtalarını bırakmaları için çakıl yatakları gerektirir. Yavru alabalıklar, düşük hızlı suyu tercih eder ve çok hızlı suyla öldükleri bilinmektedir. Fiziksel şekilleri cinsiyete, yaşa ve yaşam alanına göre değişir. Alt kısımlar vücudun üst orta bölümünde pembemsi kırmızı bir şeritle gümüşü olma eğilimindedir, ancak bu şerit koyudan aydınlığa

değişebilir. Yerleşik yaşayanlar ve yumurtlayan türlerinde kafalar daha belirgin olan pembe çizgilerle daha açık renktedirler; okyanusa giden alabalıklarda ise okyanus ortamına karışmak üzere daha koyu ve gümüş renktedir. Çoğu, yan çizginin üzerinde siyah lekelerle sahiptir ve yan çizginin oldukça altında, daha yoğun lekelenme şeklinde oluşmuştur. Yavru balıkların kenarlarında 8 ila 13 parr işareti vardır ve olgunlaştıkça gümüşü olurlar. *Oncorhynchus mykiss* larvaları, denizde yaşama hazırlanmak için bir dizi morfolojik değişikliğe giderler ve yumurtlamak için yukarı doğru göç etmeden önce 2 ila 3 yıl yetişkin yaşamlarını geçirirler. Dişi balıklar uygun yuva sitelerini bulurken, erkek balıklar ise alanı korur. Dişi, anal yüzgeçiyile yuvayı (kızıl olarak adlandırılır) kazar ve Erkek paralel bir pozisyonda katılır. Erkek ve dişi ağızlarını açar, sırtlarını kemer ve yumurtaları ve spermleri aynı anda bırakır ve yumurtalar döllenir. Dişi daha sonra yuvayı çakıllarla kaplar ve yumurtalarını biriktirene kadar birkaç kez tekrarlanır (53).

2.6. Örneklerden Pestisitlerin Ekstraksiyonu

Geçmişten bugüne uygulanan klasik ekstraksiyon yöntemi, organik çözücüler kullanılarak bir blender veya homojenizatör yardımıyla pestisitlerin polar olmayan örneklerden ayrılmasıdır. En çok kullanılan organik çözücüler, asetonitril, aseton, etil asetat ve metanoldür. Suyla karışabilen asetonitril gibi çözücülerin, farklı oranlarda sulu karışımları kullanılarak yüksek su içeriğine sahip örneklerin de ekstraksiyonu başarıyla sağlanabilmektedir. Bunun yanında hayvansal kaynaklı gıda örnekleri için diklorometan ve hekzan da çok tercih edilen organik çözücülerdendir (54, 55).

2.6.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi

Kolay uygulanabilir olması ve bazı analitlerde yüksek başarı sağlamasına rağmen, fazla miktarda çözücü harcanması, çözücülerin yeterince uzaklaştırılmaması, uzun zaman alması gibi istenmeyen yanları mevcuttur. Çok düşük miktarlarda maddenin aranıyor olması ve son yıllardaki izin verilen en yüksek kalıntı limitlerinin ölçülebilmesi için Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi (Liquid-Liquid Dispersion Extraction, LLE) ile birlikte uygun bir temizleme yönteminin uygulanmasını zorunlu kılmaktadır (56).

2.6.2. Sıvı-Sıvı Dağılım Mikroekstraksiyonu

Oldukça basit bir uygulama olan bu yöntemde uygun çözücü içine karıştırılan az miktardaki örnek çalkalanmakta, oluşan bulanık çözelti santrifüj edilmekte ve üstte kalan bölüm doğrudan kromatografi cihazına enjekte edilmektedir. Su gibi çok miktarda örnek hacmi gerektiren örneklerde yoğunlaştırma ve ekstraksiyon için Sıvı-Sıvı Dağılım

Mikroekstraksiyonu (Dispersive Liquidliquid Microextraction, DLLME) oldukça etkili sonuçlar alınmakta ve birçok pestisit grubu için kullanılabilir (57–59).

2.6.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Pestisitlerin çeşitli matrislerde, özellikle de bitkisel gıda örneklerinde analizi için gittikçe yaygınlaşmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE), bir çözücünün belli bir sıcaklık ve basınca (süperkritik nokta) maruz bırakılarak gaz ve sıvı fazlar arasında “akışkan” olarak adlandırılan başka bir faza dönüştürülmesi esasına dayanır. Süperkritik akışkanların diğer bilinen çözücülere göre avantajı, sıvılara özgü yoğunlukları sayesinde çok yüksek çözücülüğe ve gazlara özgü düşük vizkozite ve yüksek yayılım sayesinde güçlü ekstraksiyon yeteneğine sahip olmalarıdır (60).

2.6.4. Hızlandırılmış (Basınçlandırılmış) Çözücü Ekstraksiyonu

SFE yöntemine benzer şekilde yüksek sıcaklık ve basınç altında çözücülük kapasitesinin artırılması temeline dayanan, ancak süperkritik noktaya ihtiyaç duyulmaması nedeniyle daha basit bir yöntemdir. Hızlandırılmış (Basınçlandırılmış) Çözücü Ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE)'nin en önemli dezavantajı SFE'de olduğu gibi kurulum maliyetinin çok yüksek olmasıdır (61).

2.6.5. Mikrodalga Yardımıyla Gerçekleştirilen Ekstraksiyon

Bu yöntem basınçlı kapalı kaplar içerisindeki çözücünün mikrodalga sayesinde ısıtılarak, örneklerden hedef maddelerin ekstraksiyon yeteneğinin artırılması prensibine dayanmaktadır. Daha az ekstraksiyon zamanı, daha az çözücü kullanımı gibi önemli avantajlara sahip mikrodalga yardımıyla yapılan ekstraksiyonun dezavantajları ise ekstraksiyon sonrası etkili temizleme yöntemlerine ihtiyaç duyulması, organik çözücülerin mikrodalga enerjisini absorbe etme ve yüksek basınç ve sıcaklık altında kullanılan ekipmana zarar verme ihtimali olmasıdır (61).

2.6.6. Sokslet Ekstraksiyonu

Sokslet ekstraksiyonu toprak gibi çevresel örneklerde pestisitlerin ekstraksiyonu amacıyla da tercih edilen yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde aseton/n-hekzan karışımı veya petrol eteri yardımıyla yağların etkili bir şekilde uzaklaştırılması sağlanabilmekte ve son dönem gelişmiş sokslet cihazları yardımıyla balık gibi yağlı bileşiklerin ayrılmasının zor olduğu matrislerde bir saat gibi kısa zamanda ekstraksiyon yapılabilir. Son yıllarda mikrodalga yardımcı sokslet ekstraksiyonu yöntemi de klasik Sokslet ekstraksiyonuna ilginç bir alternatif olmuş ve çok daha az çözücü kullanıldığından işlemin oldukça hızlı olması ve çevre kirliliği riskinin en aza

indirilmesi sağlanabilmiştir. Ancak bu yöntemin en önemli dezavantajı uzun süre yüksek sıcaklığa dayanıklı olmayan n-metilkarbamatlar, sulfonil üre bileşikleri klorfenoksi asit herbisitler gibi pestisitlerin parçalanmasıdır (60, 62).

2.6.7. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik Ekstraksiyon (Ultrasonication Extraction, USE) birçok çevresel ve gıda örneğinde pestisitlerin analizi amacıyla kullanılmaktadır. USE'nin en önemli etkisi akustik enerji sayesinde özellikle gıda örneklerinin mekanik olarak temizlenmesi, istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması ve çözücü içinde asılı kalan analitin kolaylıkla ayrılabilmesidir. Ancak halen USE tekniği için kullanılacak en uygun çözeltilerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (60, 63).

2.6.8. Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction, SPE)

Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction, SPE) hem ekstraksiyon hem de temizleme amacıyla, her laboratuvar tarafından birçok diğer ekstraksiyon yöntemi ile başarıyla uygulanan bir örnek hazırlama yöntemidir.

2.6.9. Katı Faz Mikro-Ekstraksiyon

Pratik, otomatize edilebilmesi, etkinliği ve hızı ile pestisit analizlerine yeni bir boyut getirmiştir. Katı Faz Mikro-Ekstraksiyon (Solid Phase Microextraction, SPME) gaz veya sıvı kromatografi sistemlerine monte edilmiş kapalı vial veya headspace ünitelerine doğrudan konulan örneklerden, aranan maddelerin çok küçük partiküllü silika elyaf yardımıyla ayrılması tekniğidir. Örneğe göre iki çeşit SPME elyaf tipi vardır. Headspace SPME'de, elyaf materyal gaz fazdaki örnek ile temas ederken, daldırma (immersion) SPME'de ise elyaf materyal doğrudan sıvı örnek içerisine daldırılmaktadır. Son yıllarda fiber yerine ticari gaz kromatografi kolonlarına benzer silika bazlı kapillar kolonların kullanıldığı in-tube SPME tekniği çok daha etkili sonuçlar sağlaması ile öne çıkmaktadır. SPME tekniğinin en önemli dezavantajı ise ekipman maliyetinin hala çok fazla olmasıdır. Buna rağmen günümüzde çevresel (toprak ve su), bitkisel ve hayvansal gıda ve biyolojik sıvılarda pestisitlerin hızlı ve hassas analizi için yaygın ve etkili bir yöntemdir (64–66).

2.6.10. Matriks Katı Faz Dağılım

İlk olarak sık kullanılan bir SPE adsorbanı olan C18 (40 mm oktadesilsilil türevlendirilmiş silika) ile biyolojik matrikslerin homojen olarak dağılımlarının gerçekleştirilmesi ile kullanıma girmiştir. Matriks Katı Faz Dağılım (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD), genellikle havanda adsorban madde ile örneğin karıştırılması ve elde edilen karışımın küçük kolonlara doldurularak aranan pestisitlerin uygun

çözücülerle elusyonu şeklinde uygulanmaktadır. MSPD yönteminde C18 yanında C8 (oktil türevlenmiş silika), aminopropil türevlenmiş silika ve florisil gibi diğer SPE adsorbanları da kullanılabilir. Son yıllarda çoklu-kalıntı analizlerinde de başarıyla uygulanan MSPD yönteminin en önemli dezavantajı kullanılan örnek miktarının çok az olması nedeniyle analiz edilen numunenin tamamını temsil etmeme riski bulunmaktadır (67).

2.6.11. QuEChERS Metodu

Hızlı, kolay, ucuz, etkili, dayanıklı ve güvenli (QuEChERS) metodu, meyve ve sebzelerde pestisit artıklarının tayini için geliştirilen ekstraksiyon ve temizleme tekniğidir (68). Bazı geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında, QuEChERS yöntemi, emek ve çözücü tasarrufu, kısa ekstraksiyon süresi ve esnek prosedürden önemli avantajlara sahiptir (69, 70). Bu özelliklerinden dolayı, QuEChERS özütleme yöntemi artık hızla geliştirilmiş ve çeşitli ilaçların yanında, kalıcı organik kirleticilerin toprak, tortu ve su matrislerindeki analizinde kullanılmıştır (71, 72).

QuEChERS yönteminin, geleneksel yöntemlerle çoğu yöntemeye göre birçok avantajları vardır: (I) oldukça zorlu analitler de dahil olmak üzere geniş bir polarite ve uçucu madde çeşitliliği için yüksek geri kazanımlar (>% 85) sağlanır; (II) çok doğru (doğru ve kesin) sonuçlar elde edilir, (III) yaklaşık 10-40 dakika içinde tüm örneklerin ekstraksiyonu yüksek verimle mümkündür; (IV) çözücü kullanımı ve atık çok azdır (V) tek bir kişi, çok fazla eğitim veya teknik beceri olmaksızın yöntemi uygulayabilir; (VI) çok az laboratuvar yazılımı kullanılır; (VII) yöntem oldukça dayanıklıdır, çünkü ekstrakt temizleme organik asitleri çıkarmak için yapılır; (VIII) asetonitril (MeCN) dağıtıcı tarafından hemen kapatılan kırılmaz bir kaba eklenir, böylece işçiye solvent maruziyetini en aza indirir; (IX) yöntemdeki reaktif maliyetleri çok ucuzdur (73).

QuEChERS prosedürü bir dizi basit analitik adım gerektirir ve bu nedenle hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilir. Kısaca, QuEChERS, sulu bir ortamda katı bir numunenin asetonitril ile tuzdan arındırılması işlemi ve ardından geriye kalan matris girişimlerinin çoğunu çıkarmak için dispersif katı faz ekstraksiyonu (d-SPE) içerir (74). Yöntemin geliştirilmesi sırasında bazı temel yönleri önem arz etmektedir. İlk ekstraksiyon ve ekstraksiyon / bölümlendirme aşamasında göz önüne alınan ana özellik: ekstraksiyon çözücüsü ve örnek / çözücü oranı seçimi, numune miktarı, geri kazanımlar üzerinde numune pH'ının etkisi; faz ayırma indüksiyonu ve iç standardın kullanımı için kullanılan tuz türü ve miktarı (68). d-SPE ile temizleme aşamasına gelince, sorbent ve MgSO₄ türü ve miktarı ile seçicilikleri temel sorunsal konulardı. Son enstrümantal

analiz durumunda, matris etkileri üzerine temizleme aşamasının etkisi ve GC için analit koruyucularının uygulanması incelenmiştir. QuEChERS'in ilk adımı için bir çözücü olarak asetonitrilin seçilmesi, birkaç eş-ekstraksiyonunun aynı anda yapılmasını ve pestisitlerin (analitlerin) geniş kapsamlı bir şekilde ekstrakte edilebilirliği belirtilmiştir (68, 75).

Asetonitrilin bir başka avantajı, kromatografik uygulamalarla uyumluluğudur, ancak GC analizi sırasında büyük bir çözücü genişleme hacmi vermesi, nitrojene özgü GC detektörlerine müdahale etmesi ve diğer yaygın organik çözücülerden daha az uçucu olması ve böylece buharlaşma konsantrasyonu aşamalarının daha fazla zaman yapılmasıdır (75).

Aseton ve etil asetat gibi halojen içermeyen diğer çözücüler de kullanılabilir (76). Fakat QuEChERS için asetonitril kullanılması önerilir, çünkü tuzların eklenmesiyle, sudan asetondan daha kolay ayrılır. Asetonitril polaritesi, aseton ve etil asetatın daha yüksektir, bu nedenle orta ila yüksek polar pestisitlerin MeCN kullanıldığında daha iyi çözünürlük ve dolayısıyla daha yüksek geri kazanımları vardır (77).

QuEChERS yönteminde, numune miktarlarının minyatürleştirilmesinin, ekstraksiyon verimliliğini artırdığını ve daha az malzeme tüketimi ve maliyet azaltmaya katkıda bulunduğunu iddia etmektedir. Bu nedenle prosedür, yüzey alanını en üst düzeye çıkarmak ve daha iyi özütleme verimi sağlamak için kriyojenik frezeleme kullanarak 1,000 g iyi homojenize edilmiş alt-örnekler için optimize edilmiştir (74, 75). Homojenizasyon aşaması sırasında kuru buz kullanımı, daha uçucu analitlerin önlenmesinden dolayı da şiddetle tavsiye edilmektedir (74). Son ekstre konsantrasyonu eşit 1 g/ml elde etmek için, başlangıç ekstraksiyonu için numune / çözücü oranı 1: 1 (kütle / hacim) olarak belirlenmiş, bu da halen çalışılan pestisit kalıntılarının herhangi bir buharlaşma basamağı olmaksızın iyi geri kazanımlarının elde edilmesine olanak sağlamaktadır (74, 75).

Su fraksiyonunun büyük bir çoğunluğunu bağlamak için, eklenen magnezyum sülfat miktarı doyma konsantrasyonunu aşmalıdır (77). Sodyum klorür ilavesi, ekstraksiyon çözücülerinin polaritesini kontrol etmeye ve böylece ekstraksiyonun seçiciliğini artırmaya yardımcı olur (75). Diğer taraftan, bu tuzun aşırı eklenmesi, asetonitril tabakasının polar analitler bölümü için daha az kabiliyetine yol açacaktır (74, 77). Bölümleme adımı için yazarlar tarafından önerilen magnezyum sülfat ve sodyum klorürün ($MgSO_4 \cdot NaCl$) en iyi oranı 4:1'dir (74). Kullanılan magnezyum sülfatın

kalitesi de önemlidir. MgSO₄'ün toz halinde ve % 98'in üzerinde saflık derecesinde kullanılması önerilmiştir (78). QuEChERS içinde kullanılmasından önce ftalatları ve herhangi bir kalıntı suyu çıkarmak için 5 saatten fazla susuz MgSO₄ ile 500 °C' ye kadar olan ısı miktarlarını ısıtmayı önerilmiştir, ancak günümüzde tedarik edilen ürünün kalitesinin daha iyi olması nedeniyle kritik görünmemektedir (78). QuEChERS işleminin birden çok aşamasında hata oluşumunu en aza indirmek için, sıklıkla bir dahili standart eklenir. Orijinal geliştirme yönteminde, yazarlar, bu amaçla düşük yağlı matrislerden nicel ekstraksiyona maruz kalabilecek trifenilfosfat (TPP) uygulamışlardır (74). Yüksek yağ miktarları varlığında (örneğin, 10 ml asetonitril başına 0.3 g'dan fazla yağ), prosedürün sonunda iç standardın kullanılması önerilmiştir (79). Geleneksel katı faz ekstraksiyonu (SPE) gerçekleştirmek için, çeşitli miktarlarda ve çeşitte sorbent içeren kartuşlar kullanılır. SPE'nin prensibi, iki faz arasındaki analitlerin bir bölümlenmesini içeren LLE'ye benzer, ancak LLE'de olduğu gibi iki karışmaz sıvı faz yerine SPE, bir sıvı ve bir katı (emici) faz arasında bölünmeyi içerir ((79). d-SPE'de, nispeten az miktarda SPE emici içeren bir santrifüj tüpüne bir numune ekstrakt aliyat eklenir ve SPE materyalinin dağıtılması ve temizleme işlemini kolaylaştırmak için karışım çalkalanır. Daha sonra, numunenin santrifüjlenmesi, sorbentin ayrılmasını ve gelişmekte olan süpernatanın bir miktarının analiz edilmesini sağlar. d-SPE temizleme adımındaki sorbent, istenmeyen, birlikte ekstrakte edilen bileşikleri matristen korumak ve ilgilenilen analitlerin sıvı fazda kalmasına izin vermek için seçilir (76).

d-SPE, aşağıdaki gibi klasik katı faz ekstraksiyonuna karşı birkaç avantaj gösterir: (I) SPE manifold ve vakum / basınç cihazlarına gerek yoktur, (II) koşullandırma aşaması, (III) kanalizasyon, akış kontrolü, kuruma, (IV) elüsyon aşaması gerektirmez, (V) ekstrakt seyreltme ve dolayısıyla buharlaşma gerektirmez, (VII) daha az emici harcama, (VIII) daha hızlı ve daha ucuz ve (IX) gerekli olan deneyime sahip değildir. Magnezyum sülfat, istenmeyen suların çoğunu uzaklaştırmak ve daha iyi temizleme sağlamak için analit bölümlenmesini geliştirmek için d-SPE sorbenti ile eşzamanlı olarak eklenir (74).

QuEChERS prosedür genel olarak birkaç ardışık adımı gerektirir:

- ✓ Birinci aşama, homojenleştirilmiş numunenin 10 gramını bir 40 ml polipropilen (PP) santrifüj tüpüne tartmak, ardından 10 ml asetonitril ilave etmek ve numuneyi yaklaşık 1 dakika kuvvetlice çalkalamaktır.

- ✓ Daha sonra, 4 g susuz MgSO₄ ve 1 g NaCl'nin eklenmesi, yoğun çalkalama ile takip edilir.
- ✓ Bundan sonra, GC/MS yada LC/MS için bir iç standart eklenir ve sonraki tüm örnek 30 saniye çalkalanır ve santrifüjlenir. Daha sonra, üst asetonitril tabakasının 1 ml'lik bir kısım, 25 mg PSA emici ve 150 mg susuz MgSO₄ içeren bir santrifüj şişesine aktarılır.
- ✓ Daha sonra, numune el ile veya 30 s vorteks karıştırıcı ile çalkalanır ve santrifüjlenir. Elde edilen süpernatant santrifüj şişesinden alınır ve nihai ekstre doğrudan kütle spektrometresi detektörleri ile birleştirilmiş GC veya LC teknikleri ile analiz edilebilir (74).

QuEChERS prosedürleri, GC-MS / MS veya LC-MS / MS kullanılarak yağlı gıda matrisleri somon, deniz ürünleri, süt ve balık kaslarındaki polar olmayan ve yarı polar kimyasalların analizine başarıyla uygulanmıştır (80–82).

Balıklarda yapılan çalışmalarda diklorometan, etilasetat veya hekzan ekstraksiyon maddesi olarak kullanıldığında elde edilen geri kazanımlar QuEChERS metoduna göre daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle, asetonitril, matrisi tamamen dağıtan ve numune ile ekstraksiyon solventi arasındaki yüzey temas alanını arttıran tek faktör olduğu için ekstraksiyon solventi olarak seçilip ve sonuçta QuEChERS yönteminin diğer yöntemlere göre daha etkili olduğu ifade edilmiştir (83).

Balık kasları yağ matrisleri olduğundan, lipidleri gidermek için temizlik gereklidir. Bunun için en sık kullanılan katı faz, Poli Sekonder Amin (PSA)'dır. Dahası, en apolar bileşikler C18 ve GCB (Graphitized carbon black-Grafitleştirilmiş karbon siyahı) gibi katı fazlara adsorbe edilebilirler (83). Önceki çalışmalarda numunenin homojenleştirilmesinden sonra heksanın ilavesi iyi pestisit geri kazanımlarına yol açmıştır. Fakat QuEChERS yönteminde, asetonitril heksan olmadan kullanıldığında, numuneler LC-MS / MS analizine daha uygun olduğu ifade edilmiştir (84).

Günümüzde yapılan birçok çalışmada, balık kas, solungaç, karaciğer ve bir çok biyolojik matrislerde bazı pestisitlerin (azoksistrobin, klomazon, diflufenikan, dimetaklor, karbendazim, iprodion, izoproturon, mezosülfüron-metil, metazaklor, napropamid, kizalofop ve tifensülfüron-metil vs.) kalıntı düzeylerini tespit etmek için az miktarda solvent kullanılan, kolay uygulanabilir ve hızlı bir yöntem olan QuEChERS ekstraksiyonu ve LC/MS analiz metodu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda diğer metodlara göre iyi geri kazanım verimleri elde edildiği rapor edilmiştir (85).

2.7. Pestisit analiz yöntemleri

Uzun yıllardır pestisit analizleri için kullanılan ana yöntem kromatografidir. Kromatografi, karışım halindeki maddelerin hareketli ve sabit fazlar arasında dağılımına ve bu fazlarla etkileşimine dayalı olarak ayrılması tekniğidir. Analit hareketli faz yardımıyla sabit faz ile etkileşime girer ve sabit fazda farklı hızlarla hareket eder. Böylece her maddeye özel sabit fazda kalma süresi (alınma zamanı) söz konusudur ve kromatografi yöntemi ile çok geniş yelpazedeki maddelerin analizi hassas ve spesifik bir şekilde yapılabilmektedir (62, 86).

Pestisit analizleri için kullanılan yöntemler; İnce tabaka kromatografisi (Thin-layer chromatography, TLC), GC metodu, kütle spektrometri (mass spectrometry, MS) sidir. GC-MS elektron çarpışma iyonizasyon yöntemi (electron impact, EI) GC ile birlikte kullanılan çift (tandem) MS/MS cihazları, Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography, HPLC), LC-MS'dir. LC-MS yönteminde iyonizasyonun sağlandığı rutin olarak kullanılan arayüz şekilleri atmosferik basınç iyonizasyon (atmospheric pressure ionization, API), elektrospray iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyondur (APCI). API ve ESI en fazla kullanılan iyonizasyon modelleridir ve ikisi arasındaki temel fark olarak akış hızı belirtilmektedir. Yapılan çalışmalar pratik analitik uygulamalarda hassasiyet ve seçicilik açısından iki modül arasında çok önemli fark olmadığını göstermektedir. İlk LC-MS sistemlerinde arayüzün optimizasyonu çok zor ve zaman alıcı iken, sonraki tamamen bilgisayar kontrollü optimizasyon sağlayan cihazlarda bu problem hemen hemen ortadan kalkmıştır (62, 87, 88).

Bir pestisit çeşidine karşı LC-MS analizinde matriks etki oluşup oluşmadığının tespiti standard kromatogramı ile ekstraksiyon sonrası standart eklenmiş (spike edilmiş) örnek kromatogramının karşılaştırılması ile kolayca yapılabilir. Matriks etkisinin ortadan kaldırılması veya azaltılması için daha temiz bir final solüsyonu elde edilmesi amacıyla gelişmiş örnek hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesi, mobil faz kompozisyonunun değiştirilmesi, standart eklenmesi, internal standard kullanımı ve tandem MS (MS/MS) sistemlerinin kullanılması gibi uygulamalara rağmen birçok örnek çeşidinde matriks etkiye halen rastlanabilmektedir (62, 87, 88).

2015 yılında Oliveira ve ark.'nın Brezilya da Sao Francisco Nehri'ndeki balıklarda pestisit kalıntılarını belirlemek için yapılan bir çalışmada 36 balığın toksikolojik, kan örnekleri, kas, viscera havuzu ile ilgili analizler yapılmıştır. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS / MS) kullanılarak, 5 ppb tespit

limitiyle 150 farklı sınıf böcek ilacı, fungusit, herbisit ve akarisit in çoklu analiz tekniği ile varlığı değerlendirilmiştir. Çalışmada yakalanan balıklarda en yüksek seviyede organofosfor ve karbamat maddeleri tespit edilmiştir. 41 organofosforlu pestisit arasında, balık kas, iç organlarında klorpirifos, diazinon, diklorvos, disülfoton, etion, etrimfos, phosalone, phosmet ve pyrazophos tespit edilmiştir. On beş balıktan alınan dokular değerlendirildiğinde karbamat zirai ilaçlarından ve bunların metabolitlerinden (aldikarb, aldikarb sülfoksit, karbaril, karbofuran, karbosülfan, furatiyokarb, metomil ve propoksür) en az biri bulunmuştur. Mantar ilaçları (karbendazim, benalaksil, kresoksimmetil, trifloxystrobin, pyraclostrobin ve metaboliti BF 500 pyraclostrobin), herbisitler (piridat ve fluasifop-butil), akarisit (proparjit) ve piretroid (flumethrin) de tespit edilmiştir (89).

2016 yılında Tölgyessy ve ark.'nın QuEChERS ekstraksiyonu kullanılarak kefal balıkları homojenatları örneklerinde on adet klorlu maddenin (heksakloro- 1,3-butadien, pentaklorobenzen, heksachlorobenzen, heksachlorosikloheksan izomerleri, heptaklor ve heptaklor epoksitleri) belirlenmesi için çift dispersiyonlu katı faz ekstraksiyonu (dSPE) temizleme ve GC analizi geliştirilmiştir. Ekstraksiyon için, elde edilen geri kazanımlar % 54-98 aralığında olup konvansiyonel QuEChERS yönteminin lehine olmuştur (90).

2016 yılında Chang ve ark.'nın Tayvan'da yaptıkları çalışmada, deniz ürünlerindeki yasaklanmış veteriner ilaçlarının kalıntılarını ve 76 herbisiti tespit etmek için LC / MS / MS ve GC / MS / MS ile QuEChERS yöntemi kullanılmıştır. Analizler sonucunda pestisit ilaçlarından tortular kaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen verilerin pestisit kalıntılarının izlenmesinde referans olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (91).

2015 yılında Rocha ve ark.'nın Brezilya Serrado da yaptıkları bir çalışmada su, sediment, Tilapia (*Tilapia cf. rendalli*), tetra (*Astyanax sp.*) ve traira (*Hoplias malabaricus*) balıklarının kas dokusu örneklerinde aseptat, atrazin, azoksistrobin, buprofezin, karbofuran, siprokonazol, klorpirifos, difenokonazol, diuron, imidakloprid, malatyon, metamidofos, metolaklor, metribuzin, monokrotofos, monuron, tiyametoksam ve triazofosdu pestisit kalıntıları araştırıldı. Sediment numuneleri için matris katı faz dispersiyonu (MSPD) ve balık numuneleri için QuEChERS, su örnekleri için katı faz ekstraksiyon tekniği (SPE) kullanılmış ve analizler LC-MS / MS cihazı ile yapılmıştır. Yer altı su örneklerinden ikisinde atrazin tespit edildi. Fakat balık örneklerinde pestisit kalıntısı bulunamadı. Bu durumu düşük su kumu ve depolanan su

hacminin yüksek olması nedeniyle potansiyel kirleticilerin yüksek seyreltme ve dağılımı ile açıklanmıştır (92).

Kalachova ve ark. (2013) 'nın yaptığı çalışmada GC-MS / MS analiz yöntemi ve QuEChERS ekstraksiyon yöntemi kullanılarak balık (alabalık, pangasius, somon, mezgıt ve morina), balık dokuları (kas dokusu) ve balık yemlerinde 18 poliklorlu bifenil, 16 organik klorlu pestisit, 14 bromlu alev geciktirici ve 25 polisiklik aromatik hidrokarbon içeren maddeler analiz edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar, her iki matristeki tüm hedef analitlerin geri kazanımı %70 ila %120 aralığında ve tekrarlanabilirlik % 20 idi. Metot kantifikasyon sınırları sırasıyla balık kas dokusu ve balık yemi için 0.005 ila 1 µg/kg ve 0.05 ila 10 µg /kg aralığında çıkmıştır. Geliştirilen yöntem, balık ve balık yemi örneklerinde halojenli kalıcı organik kirleticilerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların belirlenmesinde başarıyla uygulandığı vurgulanmıştır (93).

2010 yılında Rawn ve ark.'nın GC-MS / MS analiz yöntemi ve QuEChERS ekstraksiyon yöntemi kullanılarak doğal piretrin (cinerin I ve II, jasmolin I ve II ve piretrin I ve II), sipermetrin ve deltamethrin pestisitleri somon balıkları ve yüzgeçlerinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, su ürünleri yetiştiriciliğinde vahşi ve yetiştirilen ürünler ile yerli ve ithal kaynaklardan olmak üzere geniş bir yelpazede balık ürünlerini araştırılmıştır. Test edilen çiftlik tarafından üretilen 18 somonun yedisinde (% 39) tespit edilebilir sipermetrin seviyeleri gözlemlenmiştir (94).

2012 yılında Daika ve ark.'nın Haydarabad ve Secunderabad şehirlerindeki çeşitli pazarlardan rastgele örnekleme ile yaptıkları bir çalışmada farklı türdeki meyveler ve sebzelerde (elma, üzüm, guava, armut, brinjal ve biber) LC-MS / MS analiz yöntemi ve QuEChERS ekstraksiyon yöntemi kullanılarak pestisit kalıntıları araştırıldı. 15 farklı böcek ilacı Fimidisid Pyraklastrobin, Dodin, Pirimicarb, Thiacloprid ve Acetamip seviyeleri elma üzerinde test edilmiştir. Dodin pestisiti için kalıntı referans limiti 5.5 olarak verilmiştir. Fakat uygulanan yıkama uygulamaları (yıkamama, ılık suyla yıkama, tuzlu suyla yıkama) sonucunda elde edilen sonuçlar kalıntı referans limitinin altında çıkmıştır (95).

2.8. Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği

2.8.1. Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti için blank numunesinin içine eser miktarda Dodin standardı eklendi. Eklenmiş blank ile 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanır. Tayin limiti aşağıdaki formüle göre hesaplanır. Tayin Limiti = 3 sd Ölçüm Limiti = 10 sd

C = Standart konsantrasyonu Sd = Standart sapma

2.8.2. Tekrarlanabilirlik ve Gerçeklik

Tekrar edilebilirlik ve gerçeklik için iki analist tarafından iki farklı derişimde Dodin standartıyla 5 bağımsız çalışma yapılır. Tekrarlanabilirlik kontrolleri % RSDr ve % RSDWR değerleri üzerinden yapılmaktadır ve ilgili % RSD değerlerinin \leq % 20 koşuluna uygunluğu kontrol edilir. SANTE dokümanı geri kazanım değerleri üzerinden gerçeklik kontrolü öngörmektedir. Her iki spike konsantrasyonundaki ortalama geri kazanım değerlerinin %70-120 aralığında olması gerekir (96, 97). RSDr değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$RSDr = \frac{Sr}{\bar{X}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (X_i - \bar{X})^2}{k-1}}}{\bar{X}}$$

2.8.3. Tekrar Üretilirlik ve Gerçeklik

Laboratuar içi tekrarüretilirlik ve gerçeklik çalışmaları için iki analist tarafından iki farklı derişimde Dodin standartıyla farklı zamanlarda 5 bağımsız çalışma yapılır. Tekrarüretilirlik kontrolleri % RSDr ve % RSDWR değerleri üzerinden yapılmaktadır ve ilgili % RSD değerlerinin \leq % 20koşuluna uygunluğu kontrol edilir. SANTE dokümanı geri kazanım değerleri üzerinden gerçeklik kontrolü öngörmektedir. Her iki spike konsantrasyonundaki ortalama geri kazanım değerlerinin % 70-120 aralığında olması gerekir. Laboratuvar-içi tekrarüretilirlik varyansı (S_{WR}^2); tekrarlanabilirlik varyansı (S_{rep}^2) ve günlerarası varyansın (S_L^2) toplamı olarak tanımlanır (96, 97).

$$\left[\begin{array}{c} \text{Laboratuar içi} \\ \text{tekrarüretilirlik} \\ \text{varyansı} \end{array} \right]^2 = \left[\begin{array}{c} \text{Tekrarlanabilirlik} \\ \text{varyansı} \end{array} \right]^2 + \left[\begin{array}{c} \text{Günlerarası} \\ \text{varyans} \end{array} \right]^2$$

$$S_{WR}^2 = S_{rep}^2 + S_L^2$$

Laboratuvar-içi tekrarüretilebilirlik çalışmaları için uyarlandığında, günler arası varyans aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$S_L^2 = \frac{S_d^2 - S_{rep}^2}{n}$$

Burada; n tekrar sayısını (yani analist sayısını), S_d^2 ise ortalama standart sapmayı verir ve aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$S_d^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

Burada;

i: Zaman (gün) tanımlayıcısı, j: Analist (tekrar) tanımlayıcısı, k : Toplam zaman (gün) sayısı, n_i : i. gündeki tekrar sayısı, \bar{X}_i : i. gün ortalaması, \bar{X} : Genel ortalamadır.

Tekrarlanabilirlik varyansı (S_{rep}^2) şu formülle hesaplanır (bu formül her bir zamana ait varyans değerleri için S_{pool}^2 hesabının genel gösteriliş biçimidir):

$$S_{rep}^2 = \frac{1}{k(n-1)} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$$

Burada;

i: Zaman (gün) tanımlayıcısı, j: Analist (tekrar) tanımlayıcısı, X_{ij} : i. gün, j. analist ölçüm sonucu, \bar{X}_i : i. gün ortalamasıdır.

S_d^2 ve S_{rep}^2 değerleri hesaplandıktan sonra ilgili formülde yerine konularak; önce günler arası varyans (S_L^2), daha sonra da laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik varyansı (S_{WR}^2) hesaplanır.

Tekrarüretilebilirlik kontrolü için RSD_{wr} değerinin hesaplanması gerekir. RSD_{wr} değeri, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasının (S_{wr}) genel ortalamaya (\bar{X}) bölünmesi ile elde edilir (96, 97). Tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik sonuçları Tablo 3.6'da verilmiştir.

$$RSD_{WR} = \frac{S_{WR}}{\bar{X}}$$

2.8.4. Gerçeklik Belirsizliği

Gerçeklik kontrolü, analiz kapsamında yetkilendirilecek tüm çalışanlar tarafından tekrarlanabilirlik ve laboratuvar-içi tekrarüretilebilirlik kontrolü çalışmaları sırasında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmalarında elde edilen ortalama geri kazanım değerleri üzerinden gerçekleştirilir (96, 97).

Gerçeklik belirsizliği aşağıda verilen formüle göre hesaplanır:

$$U_{bias} = \sqrt{RMS_{bias}^2 + U_{ref}^2}$$

Burada;

RMS_{bias} : Relatif bias değerinin ortalama karekökü (Root mean square of relative bias value)

U_{ref}^2 : Geri kazanım çalışmaları sırasında spike yapmak için kullanılan standartların birim relatif standart sapmasıdır.

2.8.5. Birleşik Standart Belirsizlik (U_c) (Toplam Belirsizlik)

Tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik relatif standart belirsizlikleri, aşağıda verilen formüle göre birleştirilerek “birleşik standart belirsizlik” değeri hesaplanır (96, 97).

$$y = p+q +r +...$$

$$U_c(y(p, q, r ...)) = \sqrt{U(p)^2 + U(q)^2 + U(r)^2 ...}$$

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Yerleri

Araştırmanın birinci bölümü; İnönü Üniversitesi Sürgü Meslek Yüksekokulu Su Ürünleri Bölümünde bulunan laboratuvarda yapıldı. Burada bulunan deney akvaryumlarındaki balıklar 96 saat boyunca farklı Dodin derişimlerine maruz bırakılarak ve sonrasında kas, solungaç ve karaciğer dokuları alındı.

Araştırmanın ikinci bölümünü ise İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D 'da bulunan Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarında aynı dokuların ekstraksiyon işlemleri yapıldı ve LC-MS-MS cihazında kantitatif analiz için hazır hale getirildi.

Araştırmanın üçüncü bölümünde balıkların histoloji analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji A.b.D'da bulunan Histoloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1.2 Akvaryum Suyu

Akvaryum suyu olarak en az 24 saat dinlendirilmiş şehir şebeke suyu kullanılmıştır. Deney süresince akvaryumlardaki su seviyesi 140 litre seviyesinde sabit tutulmuştur. Çalışma sırasında akvaryumdaki suyun kimyasal özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Laboratuvar şartlarında kurulan akvaryumdaki deney suyunun kimyasal özellikler

Kimyasal Parametreler	
pH	8.16±0.503
Çözülmüş Oksijen (O ₂)	8.55±0.36 ppm
Toplam klor	41.6 ppm
Toplam Sertlik	(CaCO ₃) 286±2.32 ppm
Mg	35 ppm
Elektriksel İletkenlik	603 µs/cm
Sıcaklık	12 ⁰ C

3.1.3. Deney Akvaryumları

Toksikoloji ünitesi sürekli hava destekli, 40x100x40 cm (160 litre) ebatlarında cam akvaryumlarda yapıldı, statik sistem (su değişimi veya dozlama yenilemesi yapılmayarak) şeklinde uygulandı. Kullanılan deney akvaryumları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Deney akvaryumları

3.1.4 Kullanılan Kimyasallar, Araç ve Gereçler

- Dodin, (1-Dodecyl-guanidiniumacetat)
- Quechers Metodu Ekstraksiyon Kiti (AOAC :2007.01)
- Quechers Dispersif SPE Kiti (AOAC :2007.01)
- Metanol, LC-MS için $\geq 99\%$
- Asetonitril, LC-MS için $\geq 99\%$
- Amonyum Format, LC-MS için $\geq 99\%$
- Asetik Asit, LC-MS için $\geq 99\%$
- Genel laboratuvar malzemeleri
- Sıvı kromatografisi (LC-MS-MS), Agilent
- Hassas Terazı, Sartırus
- Vorteks, İKA
- Santrifüj, 80-2A YUDA
- Şırınga uçlu filtreler (PTFE 0.45 μm)
- Homojenizatör, İKA Ultra Turrax T25
- Işık Mikroskobu, Lecia 280
- Görüntü Analiz Sistemi, Lecia Q Win
- Hemotoksilen Eozin Boyama Cihazı, Lecia
- Mikrotom, Lecia
- Bloklama Cihazı, Lecia
- Doku Takip Cihazı, Tissue-Tek VIP
- Su Analiz Cihazı, Hach Lange QHD

3.1.5. Balık Örnekleri

Deney materyali olarak kullanılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) örnekleri, Sürgü Kasabası yetiştirme havuzlarından sağlanmıştır. Yakalanan balıkların mümkün olduğunca birbirine yakın boy ve ağırlık değerine sahip olmasına özen gösterilmiştir. Bu şekilde balık dokularında, yaşa ve ağırlığa bağlı olabilecek varyasyonların olabildiğince azaltılması amaçlanmıştır. Denemede 32 ± 10 g ağırlığında 14.3 ± 1.5 cm uzunluğunda 100 adet gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Akvaryumlardan biri kontrol diğer dört akvaryum ise deney grupları olarak belirlenmiştir. Her akvaryuma 10 balık gelecek şekilde 5 adet akvaryuma ikişer tekrarlı yerleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Balıkların Deneye Hazırlanması

İnönü Üniversitesi Sürgü Meslek Yüksekokulu Su Ürünleri Bölümünde bulunan laboratuara getirilen balıklar, içerisinde dinlendirilerek kloru giderilmiş musluk suyu bulunan ve merkezi havalandırma sistemi ile devamlı havalandırılan $40\times 100\times 40$ cm (160 litre) boyutlarında 5 adet cam akvaryuma bırakılarak, 1 hafta laboratuvar şartlarına alışmaları sağlanmıştır.

3.2.2. Pestisit Hazırlanması

Stok Dodin çözeltisi için, analitik saflıktaki saf katı Dodin uygun miktarda tartıldıktan sonra su içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Yapılan derişim hesaplamaları alınan pestisit miktarı ile akvaryuma konulan su miktarına göre hazırlanmıştır. Akvaryumların derişimleri; kontrol grubu, 0.01 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1ppm olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.3. Deneyin Uygulaması

Balıklar rastgele olmak üzere Kontrol (K) ve Deney Grupları I, II, III ve IV (I-0.01 ppm, II-0.1 ppm, III-0.5 ppm ve IV-1 ppm) gruplarına ayrılmıştır. Dozlamadan önce ve deney süresince davranış değişiklikleri takip edilmiştir. Fotoperiyot 12:12 h olarak ayarlanmıştır. Deneyde, kontrol (C; Dodin ile dozlanmayan) ve Deney Grupları (Grup I-0.01 ppm, Grup II-0.1 ppm, Grup III-0.5 ppm ve Grup IV-1 ppm konsantrasyonlarda Dodin'e maruz bırakılan) olmak üzere kontrol dahil toplam 5 grup ve 100 gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Deneylere dozlamadan itibaren 96 saat devam edilmiştir. 96 saatlik akut toksikoloji değerleri, Letal Konsantrasyon (LC50), Ekili Konsantrasyon (EC50) değerleri ve dokulardaki (Solungaç, Kas ve Karaciğer) biyobirikimleri belirlenmiştir (98).

3.2.4. Histolojik Preparatların Hazırlanması

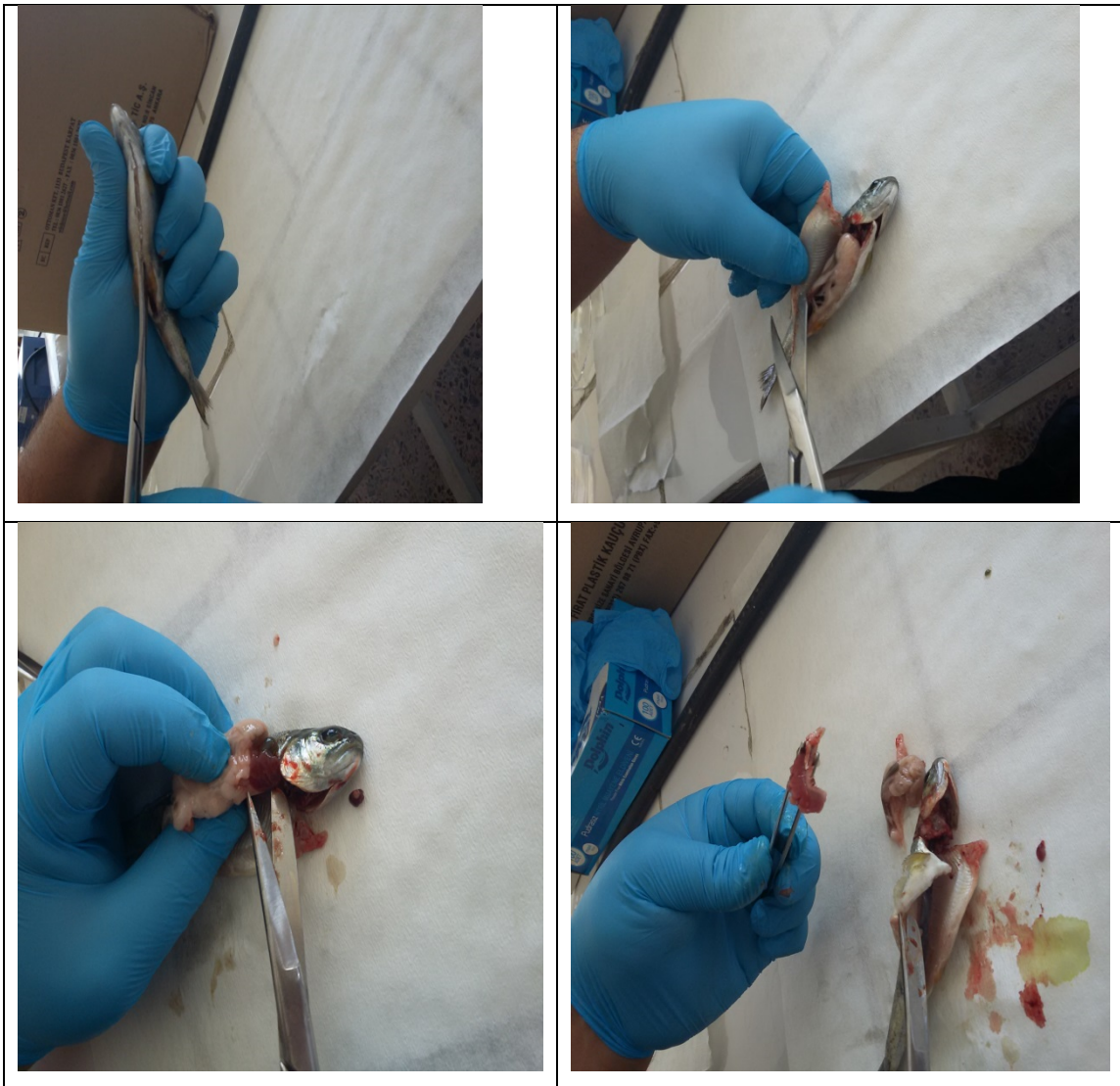
Balıkların histolojik tayini için % 10 formalin içeren çözelti hazırlanmıştır.

3.2.5. Balık Örneklerin Alınması

96 saat boyunca akvaryumda Dodine maruz bırakılan balıklar bu sürenin sonunda akvaryumdan sırayla çıkarılarak örnekler alınmıştır.

3.2.5.1. Balıklardan Pestisit Kalıntı Analizi için Örneklerin Alınması

Pestisit kalıntı analizi için her akvaryumdan 6 balık alındı. Balıkların her birinden kas dokusu, solungaç ve karaciğer alınarak tartıldı. Tartılan örnekler 50 ml tüplere alınarak ve her bir tüp etiketlendi. Örneklerin alınması Şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.2. Balıklardan pestisit kalıntı analizi ve histolojik analizler için örneklerin alınması

3.2.5.2 Balıklardan Histolojik Analiz için Örneklerin Alınması

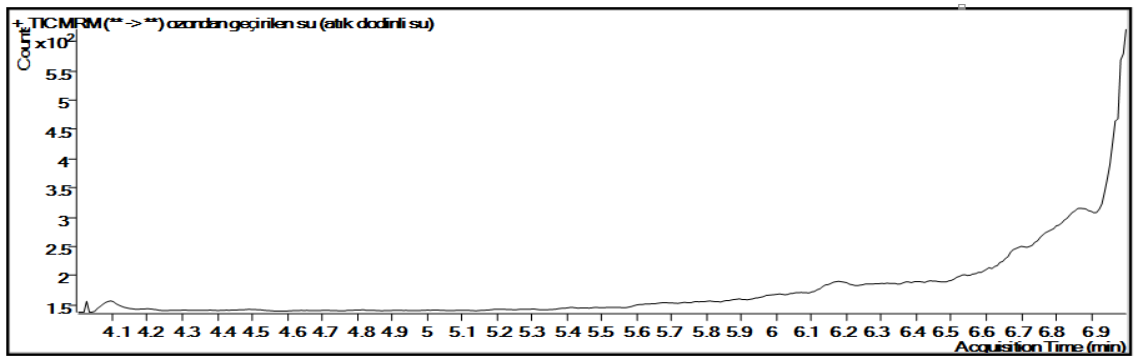
Histolojik Analiz için her akvaryumdan 4 balık alındı. Alınan balıkların her birinden kas dokusu, solungaç ve karaciğer örnekleri alınarak % 10 formalin çözeltisi içeren kaplara konularak etiketlendi.

3.2.5.3. Deney Akvaryumlarının Temizlenmesi

Balıkların alınmasından sonra deney akvaryumlarında bulununan Dodin kalıntısı içeren sular doğrudan doğaya bırakılmamıştır. Dodin ve varsa olası parçalanma ürünleri yükseltgenerek zararsız hale getirilmiştir. Bunun için pestisit içeren sular ozon jeneratoründen elde edilen ozon gazı ile muamele edilmiştir. Bu şekilde pestisitler ozon ile parçalanarak zararsız hale getirildikten sonra LC-MS-MS cihazı ile analizi yapılarak içerik tespiti yapılmış temiz çıkan sulu çözelti doğaya bırakılmıştır. Kullanılan ozon jeneratorü Şekil 3.3 ve işlem sonrası atık suyun LC-MS-MS analiz sonucu Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Pestisit kalıntılarını ozon jeneratorü ile giderme



Şekil 3.4. Ozon ile parçalanarak zararsız hale getirilen atık suyun LC-MS-MS analiz kromatogramı

3.2.6. Analizler

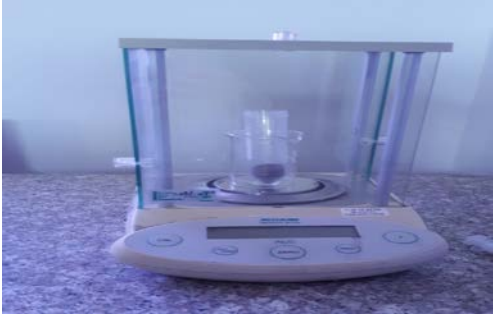
3.2.6.1. Ekstraksiyon İşlemi

Her bir balığın kas, solungaç ve karaciğer dokuları ayrı ayrı alınarak homojenizatörde homojen hale getirildi. QUECHERS metoduna göre ekstrakte edilerek sıvı kromatografisi kütle spektrometresinde (LC-MS-MS) analiz edildi. Homojinize edilmiş numune 50 ml'lik polipropilen tüpe aktarıldı ve üzerine 10 ml ultrasafsu konuldu ve üzerine 15 ml %1 asetik asitli asetonitril ilave edildi. İçerisinde 6 g MgSO₄ anhidrat ile 1.5 g sodyum asetat trihidrat bulunan kimyasal karışım eklenerek bir dakika vorteKS cihazında karıştırıldı. Ardından polipropilen tüp 4000 devire ayarlanmış santrifüje konarak 5 dak. santrifüjlendi. Santrifüjleme sonrası tüpün üzerindeki organik fazdan 5 ml mikropipetle alındı (99).

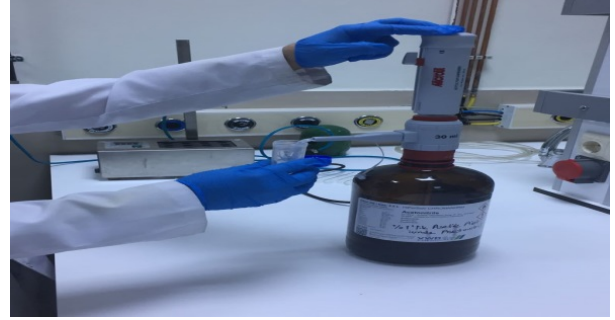
3.2.6.2. Yıkama (Clean – Up) İşlemi

Organik fazdan 5 ml mikropipetle alınarak içerisinde 1.2 g MgSO₄, 0.4 g PSA (Polimer seconder amin) bulunan 15 ml lik polipropilen tüpe koyuldu. Bir dakika vortexte karıştırıldıktan sonra 4000 devire ayarlanmış santrifüje konarak 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüjlenmiş tüpten 1.5 ml alınarak 0.45 µl'lik filtreden geçirilerek 1.5 ml'lik viallere alındı (99). Quechers Metodu ile ekstraksiyon Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterildiği gibidir. Viallere alınan numuneler içerisinde çalışılan Dodinin kalibrasyon ve validasyon çalışmalarının yapıldığı LC-MS-MS (Agilent) cihazına enjekte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi Şekil 3.5'te ve yıkama işlemi de Şekil 3.6'da verilmiştir.

EKSTRAKSİYON İŞLEMİ



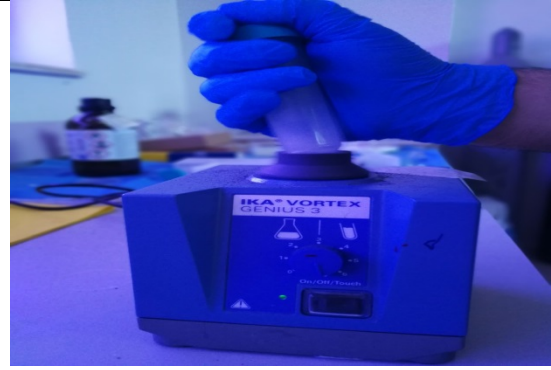
Homojenize edilmiş numune 50 ml'lik santrifüj tüpünde tartıldıktan sonra üzerine 10 ml ultra safsu eklendi.



Üzerine 15 ml %1 asetik asitli asetonitril ilave edildi.



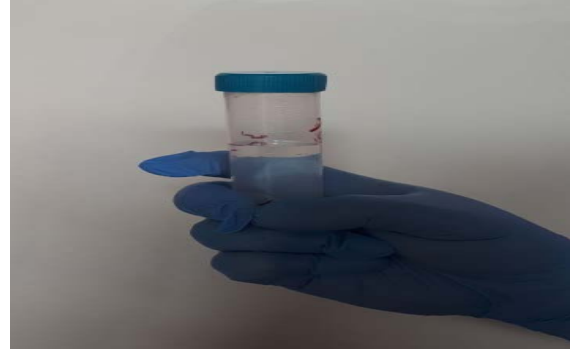
İçerisinde 6 g magnezyum sülfat anhidrat ile 1.5 g sodyum asetat trihidrat bulunan kimyasal karışım eklendi.



Vortekste karıştırıldı (1dk).



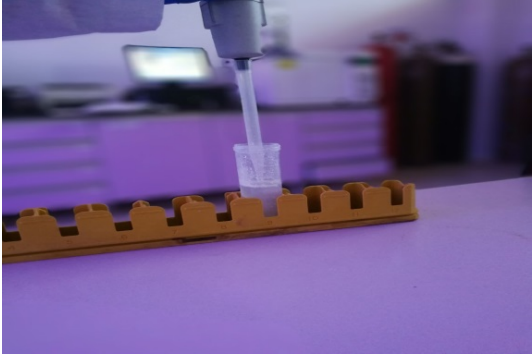
Polipropilen tüp 4000 devire ayarlanmış santrifüje konarak 5 dak. santrifüjlendi.



Santrifüjleme sonrası tüpün üzerindeki organik fazdan ekstrakt alındı.

Şekil 3.5. Ekstraksiyon işlemi

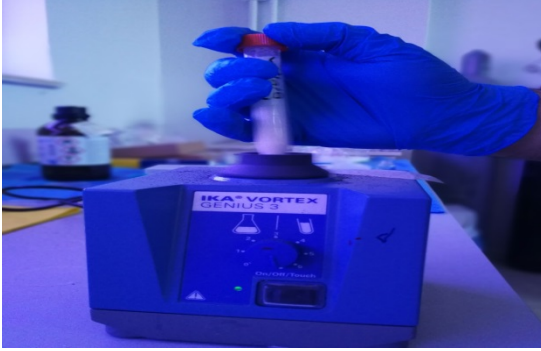
YIKAMA (CLEAN-UP) İŞLEMİ



Santrifüleme sonrası tüpün üzerindeki organik fazdan 5 ml mikropipetle alındı.



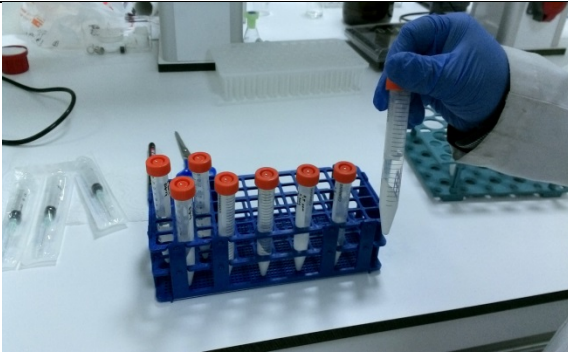
1.2 g $MgSO_4$, 0.4 g PSA (Polimer sekonder amin) bulunan 15 ml lik polipropilen tüpe aktarıldı.



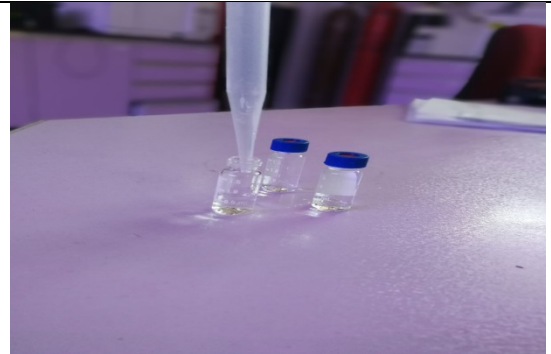
Vortekste karıştırıldı (1dk).



4000 devire ayarlanmış santrifüje konarak 5 dakika santrifüjlendi.



Santrifüjlenmiş tüpten 1.5 ml alınarak 0.45 μ l'lik filtreden geçirildi.



1.5 ml'lik viallere aktarılarak analize hazır hale getirildi.

Şekil 3.6. Yıkama (Clean – Up) işlemi

3.2.6.3 Histoloji Analizi İşlemleri

Deneysel çalışmanın sonunda histolojik değerlendirmeler için de balıklardan doku örnekleri alındı. Histolojik ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilin-Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için balıklardan alınan karaciğer, solungaç ve kas doku örnekleri % 10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Formaldehit içerisinde tespit edilen dokulara rutin histolojik doku takip işlemleri uygulandı. Takip işlemlerinden geçirildikten sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2245) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere H-E boyama metodu uygulandı ve Lecia 280 ışık mikroskobu ve Lecia Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Lecia Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotograflandı. Histolojik analiz işlemleri için yapılan işlem basamakları Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Bloklanmış ve lamel arasına yapıştırılmış doku örnekleri

HİSTOLOJİ ANALİZİ İŞLEMLERİ



Balıklardan doku örnekleri Histolojik ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı.



Formaldehit içerisinde tespit edilen dokulara rutin histolojik doku takip işlemleri uygulandı.



Takip işlemlerinden geçirildikten sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü.



Hazırlanan bloklardan mikrotom 5 μ m kalınlığında kesitler alındı.



Alınan kesitlere H-E boyama metodu uygulandı ve Leica 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi ile incelenerek fotoğraflandı.

Şekil 3.8. Histoloji analizi işlemleri

3.2.6.4 LC MS-MS Cihazı Çalışma Koşulları ve Kalibrasyonu

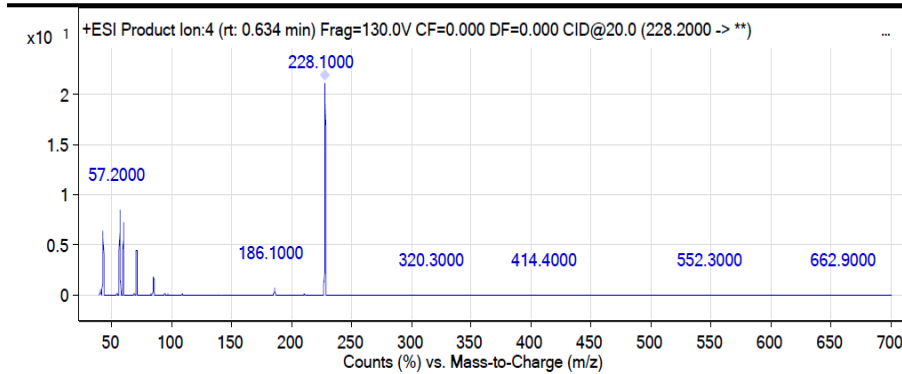
LC-MS-MS cihazı için çalışma koşulları Tablo 3.2’de, kullanılan LC-MS-MS cihazı Şekil 3.9’da, Dodin kütle kromatogramı Şekil 3.10’da ve Dodin geçiş kütleleri Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.2. LC-MS-MS Cihazı çalışma koşulları

Cihaz Modeli	G6460C
Kromatogram Tipi	TIC
İyon Kaynağı	AJS ESI
Gaz Sıcaklığı	350 °C
Gas Akışı	8 L/dk
Sisleştirici	45 psi
Sheath Gas Temp	400 °C
Sheath Gas Flow	9 L/dk
Metot Akış	0,3 ml/dk, (A) Su (B) Metanol gradient
Kolon	C ₁₈ (150 x 3 mm, 5 µm) Kolon sıcaklığı 25 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Transition (m/z) Dodin 228 > 57	Collision (V) 22
Transition (m/z) Dodin 228 > 186	Collision (V) 18



Şekil 3.9. Kullanılan LC-MS-MS Cihazı



Şekil 3.10. Dodin kütle kromatogramı

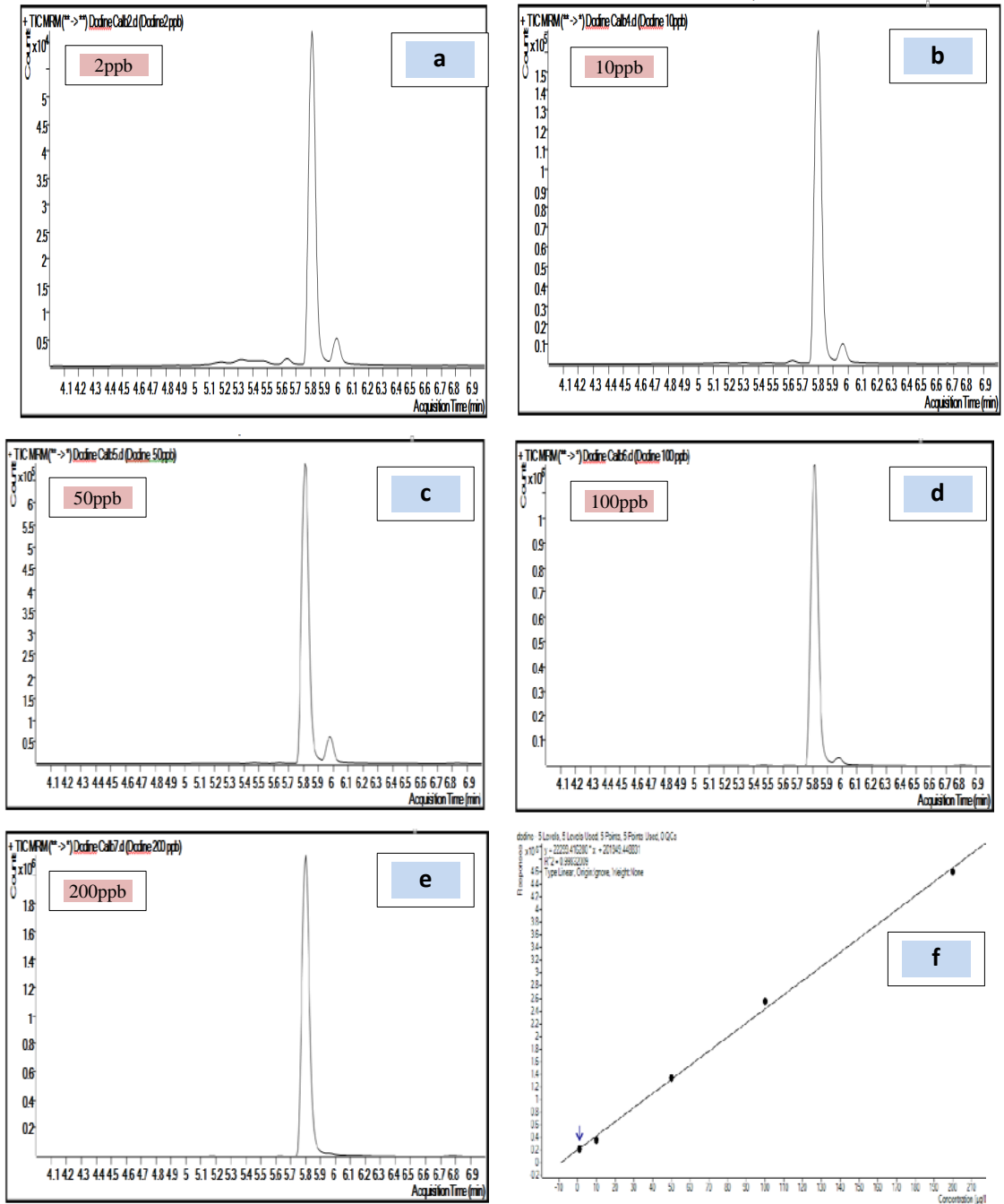
Tablo 3.3. Dodin geçiş kütleleri (m/z)

Geçiş Kütleleri (m/z)	z	Abund
40.9		619.12
43.1		6072.58
54.8		158.06
57.2		7998.58
60.1		6839.28
68.9		158.18
71.1		4235.7
85.1	1	1759.64
186.1		659.7
228.1		20020.28

Kalibrasyon özeltilerinin hazırlanması

- 2 mg Dodin alınarak 100 ml'ye saf su ile seyrettilmiş ve 20000 pbb stok 1 özeltisi,
- Stok 1 özeltiden (20000 pbb) 2.5 ml alınarak saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak 200 pbb stok 2 özeltisi,
- Stok 2 özeltiden (200 pbb) 50 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 100 pbb kalibrasyon özeltisi,
- Stok 2 özeltiden (200 pbb) 25 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 50 pbb kalibrasyon özeltisi,
- Stok 2 özeltiden (200 pbb) 5 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 10 pbb kalibrasyon özeltisi,
- Stok 2 özeltiden (200 pbb) 1 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 2 pbb kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır.

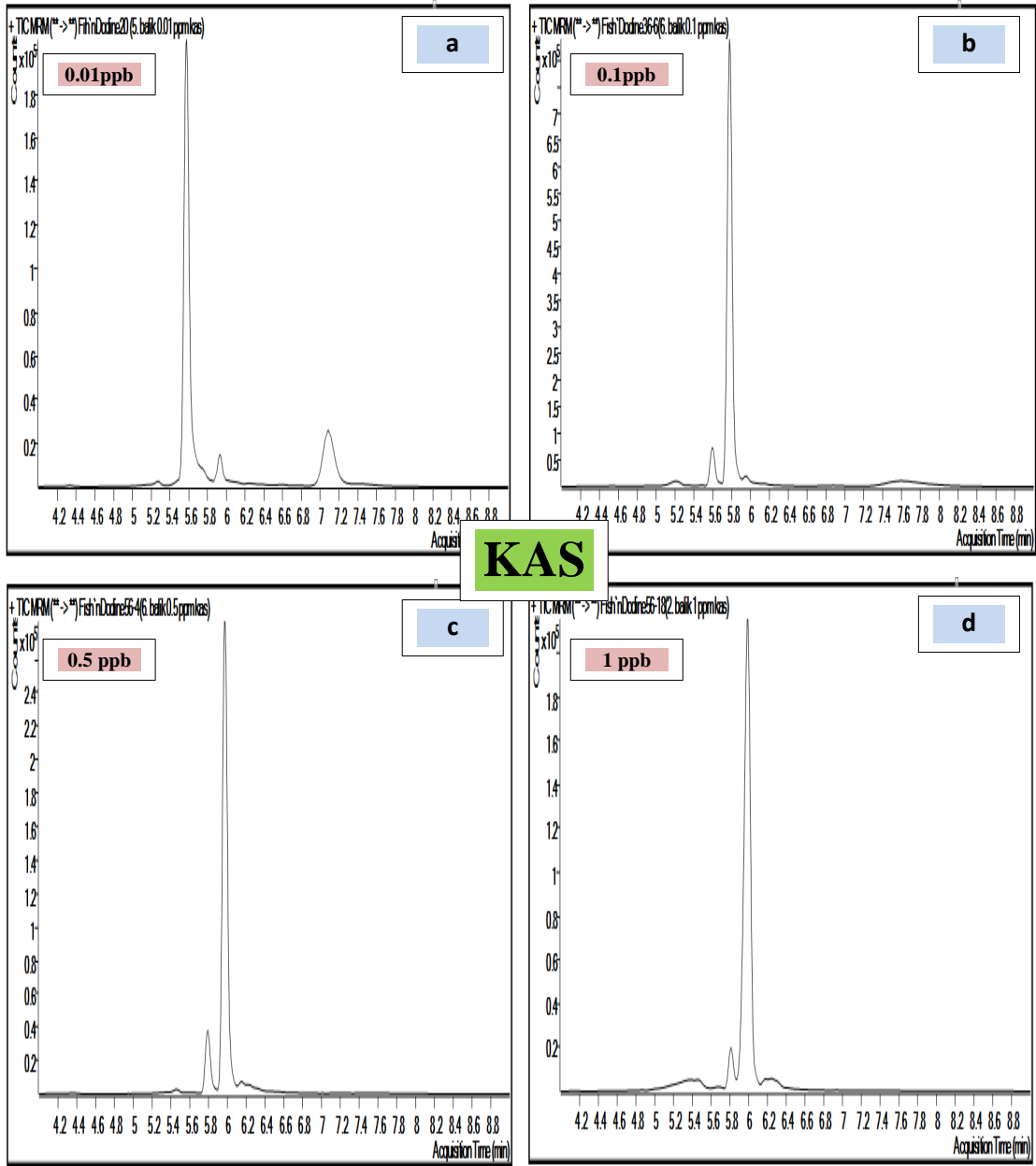
Bu şekilde hazırlanan kalibrasyon çözeltileri, kontrol kas numunesine eklendikten sonra, Dodin uygulanmış numunelere uygulanan Quechers ekstraksiyon yöntemindeki aynı işlemler bu kalibrasyon örneklerine de uygulandıktan sonra LC-MS-MS sisteminde analiz edilmiştir. Kalibrasyon özelti kromatogramları (a, b, c, d,e) ve kalibrasyon grafiği (f) Şekil 3.11'de verilmiştir.



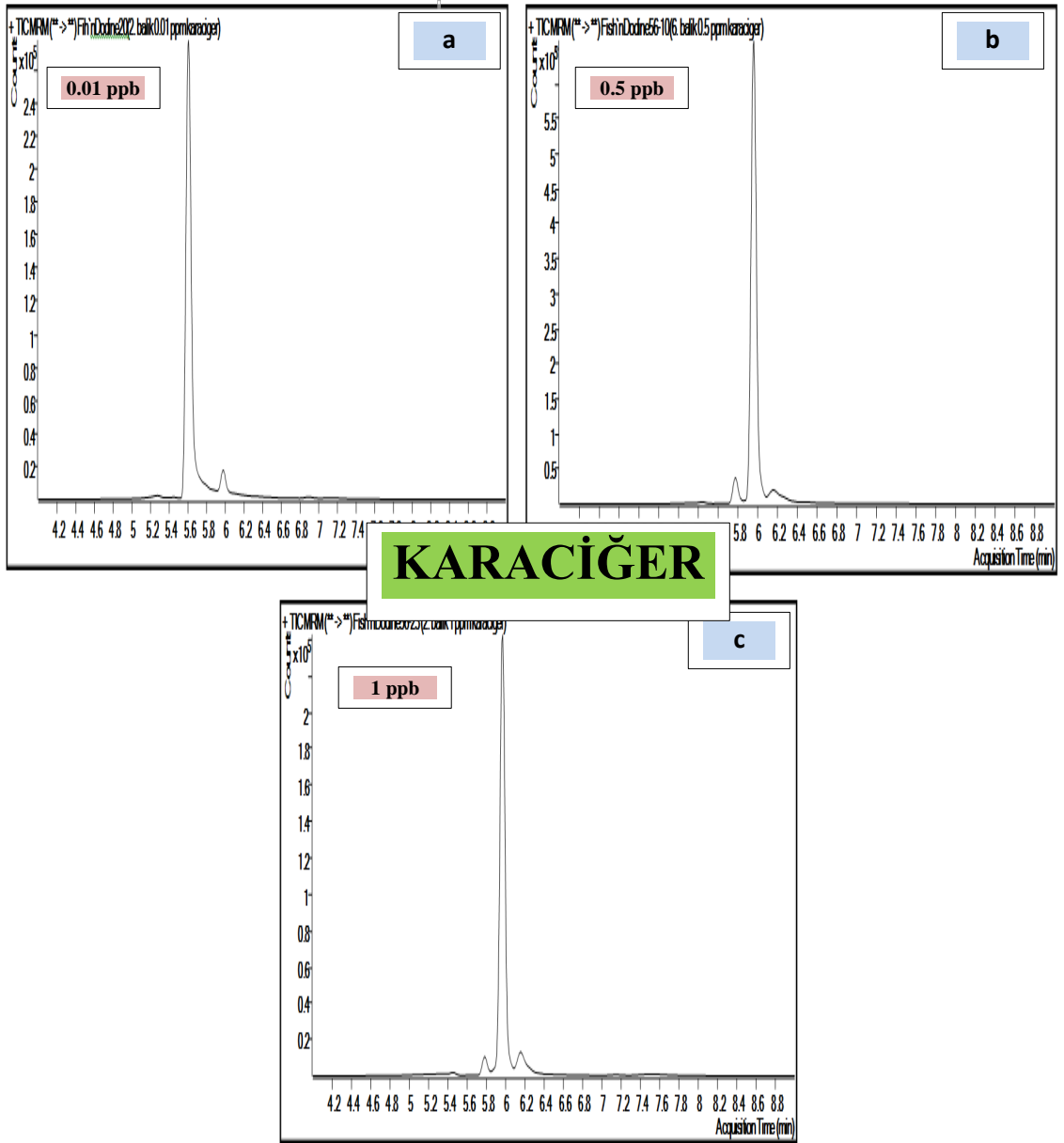
Şekil 3.11. a) 2 ppb, b) 10 ppb, c) 50 ppb, d) 100 ppb, e) 200 ppb Kalibrasyon çözelti kromatogramları ve f) kalibrasyon grafiği

3.2.6.5 Örneklerin LC-MSMS Cihazına Verilmesi

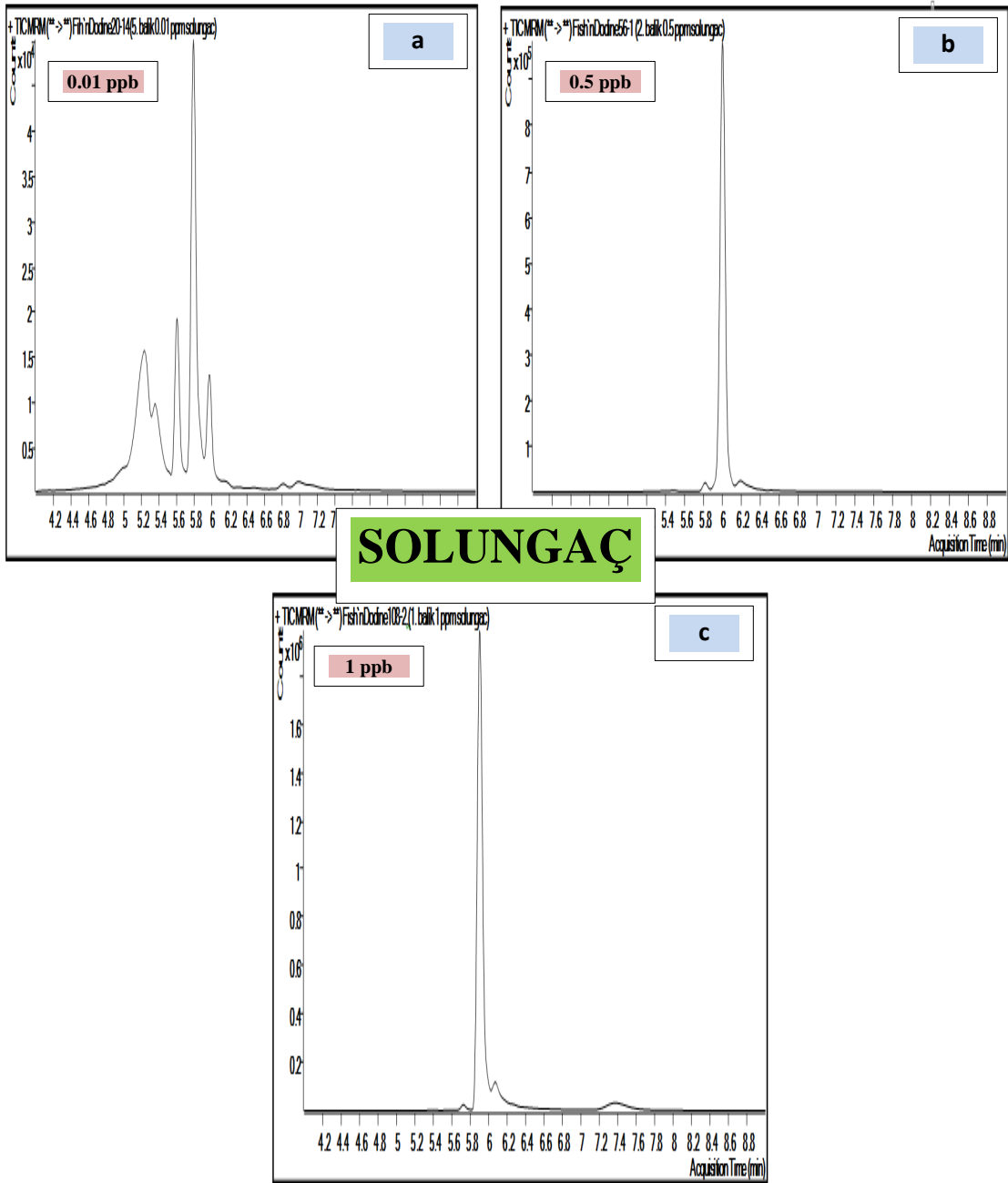
Ekstrakte edilen numunelerden 2 ml alınarak viallere konuldu ve LC MS-MS cihazına verildi. Balık kasındaki Dodin miktarının kromatogramı a,b,c,d Şekil 3.12’de verilmiştir. Balık karaciğerindeki Dodin miktarının kromatogramı a,b,c Şekil 3.13’de verilmiştir. Balık solungacındaki Dodin miktarının kromatogramı a,b,c Şekil 3.14’de verilmiştir.



Şekil 3.12. a) Grup I'deki elde edilen kas kromatogramı, b) Grup II'deki elde edilen kas kromatogramı, c) Grup III'deki elde edilen kas kromatogramı, d) Grup IV'deki elde edilen kas kromatogramı



Şekil 3.13. a) Grup I'deki elde edilen karaciğer kromatogramı, b) Grup III'deki elde edilen karaciğer kromatogramı, c) Grup IV'deki elde edilen karaciğer kromatogramı



Şekil 3.14. a) Grup I'deki elde edilen solungaç kromatogramı, b) Grup III'deki elde edilen solungaç kromatogramı, c) Grup IV'deki elde edilen solungaç kromatogramı

3.2.6.6 Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması

Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti: Tayin limiti için blank numunesinin içine 1 ppb Dodin standardı eklendi. Eklenmiş blank ile 10 defa bağımsız çalışma yapılarak ölçümlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Tayin ve ölçüm limitleri Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Tayin limiti ve ölçüm limiti sonuçları

Tekrar	Dodin ppb
1	1,3782
2	1,2465
3	1,3840
4	1,3835
5	0,9150
6	1,2863
7	1,3949
8	1,2432
9	1,1824
10	1,3023
Ortalama	1,2716
Sd	0,1451
LOD	0.4352
LOQ	1.4508

Tekrarlanabilirlik ve Gerçeklik: Tekrar edilebilirlik ve gerçeklik için iki analist tarafından iki farklı derişimde Dodin standartıyla (10 ppb ve 200 ppb) 5 bağımsız çalışma yapıldı. Aşağıdaki tabloda sonuçların uygunluğu hesaplandı. Tekrarlanabilirlik ve gerçeklik sonuçları Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.5. Tekrarlanabilirlik ve gerçeklik sonuçları

Birinci Konsantrasyon:10ppb											
Tekrar (n)	1	2	3	4	5	ort	std sapma	% RSD	%R (ort)	Gerçeklik kontrolü	nabirlik kontrolü
I.Analist	10.40	9.82	9.89	10.13	10.15	10.08	0.23	2.29	100.8	uygun	uygun
II.Analist	10.30	10.21	10.19	10.21	9.29	10.04	0.42	4.20	100.4	uygun	uygun
İkinci Konsantrasyon:200ppb											
Tekrar (n)	1	2	3	4	5	ort	std sapma	% RSD	% R (ort)	Gerçeklik kontrolü	nabirlik kontrolü
I.Analist	178.9	180.8	179.2	177.4	184.8	180.3	2.83	1.57	90.1	uygun	uygun
II.Analist	180.8	179.8	181.5	192.3	184.4	183.7	5.05	2.75	91.9	uygun	uygun

Tekrar Üretilirlik ve Gerçeklik: Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik çalışmaları için iki analist tarafından iki farklı derişimde Dodin standartıyla (10 ppb ve 200ppb) farklı zamanlarda 5 bağımsız çalışma yapıldı. Tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik sonuçları Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.6. Tekrarüretilebilirlik ve gerçeklik sonuçları

Birinci Konsantrasyon:10 ppb								RSD _{wR,genel} (RSD) ² *(n-1)
Zaman dilimi	1	2	3	4	5	Genel ortalama	10.06	
I.Analist	10.40	9.82	9.89	10.13	10.15	% Geri Kazanım (genel)	100.59	0,0092
II.Analist	10.30	10.21	10.19	10.21	9.29	Ortalamanın varyansı (S _d ²)	0.1057	
ort	10.35	10.01	10.04	10.17	9.72	Tekrarlanabilirlik varyansı (S _{rep} ²)	0.1006	
						Günler arası varyans (S _L ²)	0.0026	
						Tekrarüretilebilirlik varyansı (S _{wR} ²)	0.1032	
			Zaman dilimi sayısı(k)		5	Tekrarüretilebilirlik standart sapması (S _{wR})	0.32	
			Analist sayısı (n)		2	RSD _{wR}	0.0319	
						% RSD _{wR}	3.19	
						n(genel)	10	
						Gerçeklik Kontrolü	uygun	
						Tekrarüretilebilirlik Kontrolü	uygun	
İkinci Konsantrasyon: 200 ppb								
Zaman dilimi	1	2	3	4	5	Genel ortalama	182.00	0.0062
I.Analist	178.94	180.84	179.22	177.43	184.84	% Geri Kazanım (genel)	91.00	
II.Analist	180.77	179.82	181.51	19225	184.36	Ortalamanın varyansı (S _d ²)	12.4444	
ort	179.86	180.33	180.37	184.84	184.60	Tekrarlanabilirlik varyansı (S _{rep} ²)	22.9496	
						Günler arası varyans (S _L ²)	-5.2526	
						Tekrarüretilebilirlik varyansı (S _{wR} ²)	22.9496	
			Zaman dilimi sayısı(k)		5	Tekrarüretilebilirlik standart sapması (S _{wR})	4.79	
			Analist sayısı (n)		2	RSD _{wR}	0.0263	
						% RSD _{wR}	2.63	
						n(genel)	10	
						Gerçeklik Kontrolü	uygun	
						Tekrarüretilebilirlik Kontrolü	uygun	

Gerçeklik Belirsizliği: Gerçeklik belirsizlik sonuçları Tablo 3.7 verilmiştir.

Tablo 3.7. Gerçeklik belirsizliği sonuçları

Birinci Konsantrasyon: 10 ppb													
		Geri Kazanım (R)							Bias ² =(R-1) ²			U _{bias} = RMS _{bias}	
Tekrar	Analistler	I.	1.040	0.982	0.989	1.013	1.015	0.0016	0.0003	0.0001	0.0002	0.0002	0.0688
lanabilirlik		II.	1.030	1.021	1.019	1.021	0.929	0.0009	0.0004	0.0004	0.0004	0.0050	
Tekrar		I.	1.040	0.982	0.989	1.013	1.015	0.0016	0.0003	0.0001	0.0002	0.0002	
üretilebilirlik		II.	1.030	1.021	1.019	1.021	0.929	0.0009	0.0004	0.0004	0.0004	0.0050	
İkinci Konsantrasyon: 200 ppb													
Tekrar (n)		Geri Kazanım (R)							Bias ² =(R-1) ²				
Tekrar	Analistler	I.	0.895	0.904	0.896	0.887	0.924	0.0111	0.0092	0.0108	0.0127	0.0057	
lanabilirlik		II.	0.904	0.899	0.908	0.961	0.922	0.0092	0.0102	0.0085	0.0015	0.0061	
Tekrar		I.	0.895	0.904	0.896	0.887	0.924	0.0111	0.0092	0.0108	0.0127	0.0057	
üretilebilirlik		II.	0.904	0.899	0.908	0.961	0.922	0.0092	0.0102	0.0085	0.0015	0.0061	

Birleşik Standart Belirsizlik (Uc) (Toplam Belirsizlik): Birleşik standart belirsizliği Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8. Birleşik standart belirsizlik (Uc) (Toplam belirsizlik)

TOPLAM BELİRSİZLİK			
Parametre	Değer (X)	u(X)	u(X)/X
Gerçeklik	1	0.0688	0.0688
Tekrarüretilebilirlik	1	0.0293	0.0293
		Relatif birleşik belirsizlik=	0.0748
		*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (hesaplanan)=	0.1496
		*Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik (kullanılan)=	0.5000

%14,96<%50 olduğundan, %50 genişletilmiş belirsizlik değeri kullanılır.

Raporlama=X ± (Genişletilmiş relatif birleşik belirsizlik) *X

*%95 güven aralığı, k=2 X :ölçüm sonucu (ppm)

4.BULGULAR

4.1. Validasyon Bulguları

Yapılan gerçeklik hesaplamalarında; % $R_{1(10ppb)}=100.8$; % $R_{1(200ppb)}= 90.1$ (1. Analist), % $R_{2(10ppb)}= 100.6$; % $R_{2(200ppb)}= 91.9$ (2. Analist) hesaplandı. % R değerleri %70-120 arasında olduğu için uygun bulunmuştur. Yapılan tekrarlanabilirlik hesaplamalarında % $RSDr_{1(10ppb)}= 2.3$ % $RSDr_{1(200ppb)}= 1.57$ (1. Analist), % $RSDr_{2(10ppb)}=4.25$ % $RSDr_{2(10ppb)}=2.75$ (2. Analist) hesaplandı.

Farklı günlerde iki analizcinin sonuçlarının gerçeklik hesaplamalarında kullanılmasında; % geri kazanım (genel) $_{(10ppb)}=100.68$, % geri kazanım (genel) $_{(200ppb)}=91.00$ hesaplandı. % R değerleri %70-120 arasında olduğu için uygun bulunmuştur. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik hesaplamalarında % $RSDwR_{(10ppb)}=3.24$, % $RSDwR_{(200ppb)}=2.63$ hesaplandı. Gerçeklik belirsizliği 0.069 ve toplam belirsizlik ise 0.15 olarak bulundu.

4.2. LC-MS-MS Bulguları

Bu çalışmada farklı Dodin (0.01, 0.1, 0.5, 1 ppm) dozlarına 96 saat akut toksisiteye maruz bırakılan alabalıklarda akut ölümcül (letal) ve etki sınırları, dokularda birikim ve histolojik değişimler incelenmiştir. Deneysel ortama bırakılan balıklar kontrol grubu için ortalama ağırlık ve toplam boyları sırasıyla, 32.46 ± 10.07 g ağırlıklarda ve 15.00 ± 1.55 cm'dir (Tablo 4.1).

Çalışma boyunca uygulanan Dodin dozlarında deney gruplarında toplam bireylerin %50'sini öldüren doz gözlenmemiştir. Buna rağmen ilk 48 saat içinde 1 ppm doz içeren grupta 3 ölüm meydana gelirken 6 balıkta dengesizlik, yüzmede bozukluk, ani sıçrama hareketleri gibi davranışlar gözlenmiştir. Aynı durum 0.5 ppm doza sahip grupta 3 balıkta gözlenmiştir. Dolayısıyla yapılan probit analiz sonucunda LC50 değerinin 1.07 ppm'e, EC50 değerinin ise 0.84 ppm'e denk geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Balıkların ortalama ağırlık ve boyları

	n=6	Ort. ±Std. Hata	Ortalamanın % 95	
			Alt Sınır	Üst Sınır
Balık Ağırlığı (g)	Kontrol	32.46±4.11	21.90	43.03
	0.01 ppm	35.94±5.64	21.44	50.43
	0.1 ppm	31.68±2.38	25.55	37.80
	0.5 ppm	28.47±2.75	21.39	35.55
	1 ppm	34.32±6.55	17.48	51.16
Balık Toplam Boyu (cm)	Kontrol	15.00±0.63	13.37	16.63
	0.01 ppm	15.22±0.74	13.31	17.12
	0.1 ppm	14.58±0.30	13.81	15.36
	0.5 ppm	14.17±0.64	12.52	15.81
	1 ppm	14.00±0.97	11.52	16.48

Tablo 4.2. Dodine karşı tahmin edilen LC50 ve EC50 miktarları

Dodin Konsantrasyon (ppm)	Toplam Canlı Balık sayısı (Adet)	Ölen Balık Sayısı (Adet)	Ölüm Zamanı (saat)	Etkilenen balık sayısı (Adet)	LC50 değeri (ppm)	EC50 Değeri (ppm)
Kontrol	10	0	0	0		
0.01 ppm	10	0	0	0		
0.1 ppm	10	0	0	0		
0.5 ppm	10	0	0	3		
1 ppm	10	3	48	6	1.07	0.84

96 saatlik akut Dodin maruziyeti sonrası alabalıklarda kas, karaciğer ve solungaçlarda meydana gelen etken madde birikim miktarları hesaplanmıştır. Buna göre tüm gruplarda uygulanan en az konsantrasyonda (0.01 ppm) en düşük birikim, en fazla konsantrasyonda (1 ppm) en yüksek birikim gözlemlenmiştir. Kaslarda en fazla birikim 622.35±91.59 ppb olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber 0.01 ile 0.1 ppm dozlarda meydana gelen Dodin birikim miktarlarında istatistiksel olarak fark bulunmazken

($p>0.05$), 0.5 ile 1 ppm dozlarda istatistiksel olarak fark önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Tablo 4.3, Şekil 4.1 ve 4.2).

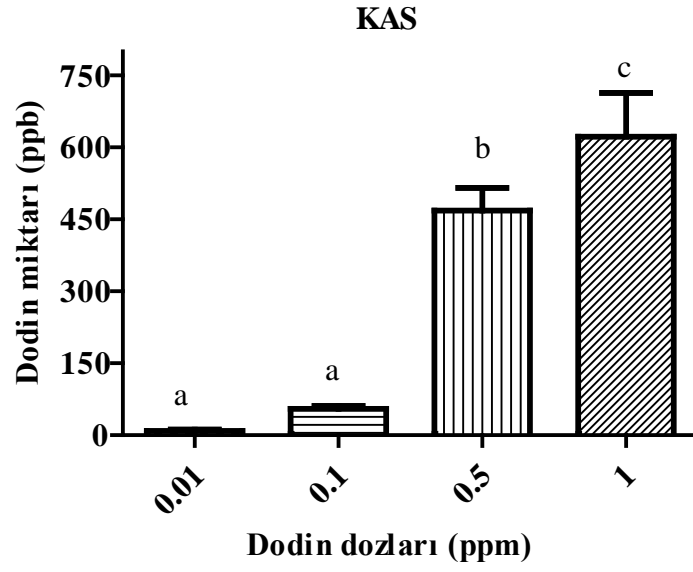
Karaciğerde en fazla birikim 1 ppm'lik Dodin dozuna sahip grupta 344.18 ± 85.12 ppb olarak tespit edilirken, 0.5 ppm'lik Dodin içeren gruba göre (321.61 ± 57.15 ppb) istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Yine 0.01 ile 0.1 ppm dozlar arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.1 ve 4.2).

Solungaçlarda 1 ppm'lik grupta Dodin birikimi 959.96 ± 52.29 ppb olarak tespit edilirken, bu miktar hem kendi içinde hem de kas ve karaciğer gruplarında biriken Dodin miktarlarından fazla olduğu gözlemlenmiştir. Solungaçlarda Dodin birikimi her grup için istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.1 ve 4.2).

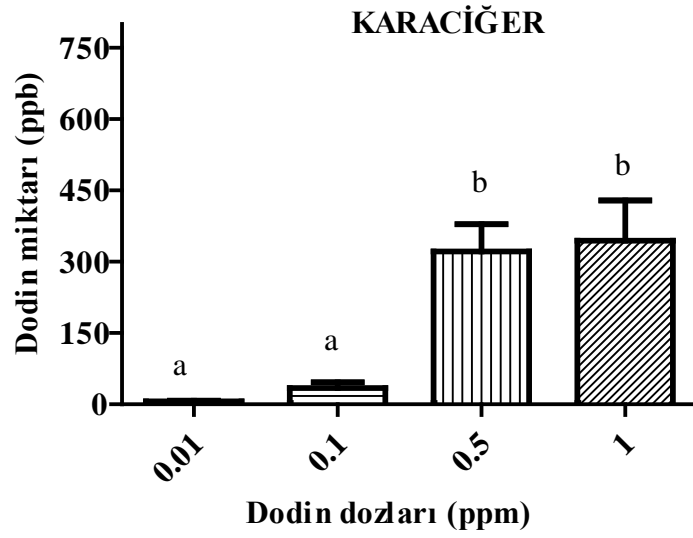
Tablo 4.3. Kas, Karaciğer ve Solungaçlarda biriken Dodin miktarları

	Uygulanan Dodin Konsantrasyonu ppm	Tayin edilen Dodin Konsantrasyonu ppb	Ortalamanı % 95 Güven Aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
	n=6	Ort.±Std. Sapma		
Kas örnekleri	Kontrol	*	*	*
	0.01 ppm	9.14±1.05	6.45	11.83
	0.1 ppm	55.23±2.29	49.34	61.12
	0.5 ppm	468.58±19.34	418.87	518.29
	1 ppm	622.35±37.39	526.24	718.47
Karaciğer örnekleri	Kontrol	*	*	*
	0.01 ppm	6.08±.67	4.37	7.80
	0.1 ppm	34.19±5.07	21.16	47.22
	0.5 ppm	321.61±23.33	261.63	381.59
	1 ppm	344.18±34.75	254.85	433.50
Solungaç örnekleri	Kontrol	*	*	*
	0.01 ppm	10.74±0.87	8.52	12.96
	0.1 ppm	65.56±2.74	58.52	72.60
	0.5 ppm	463.50±15.94	422.51	504.48
	1 ppm	959.96±21.35	905.08	1,014.84

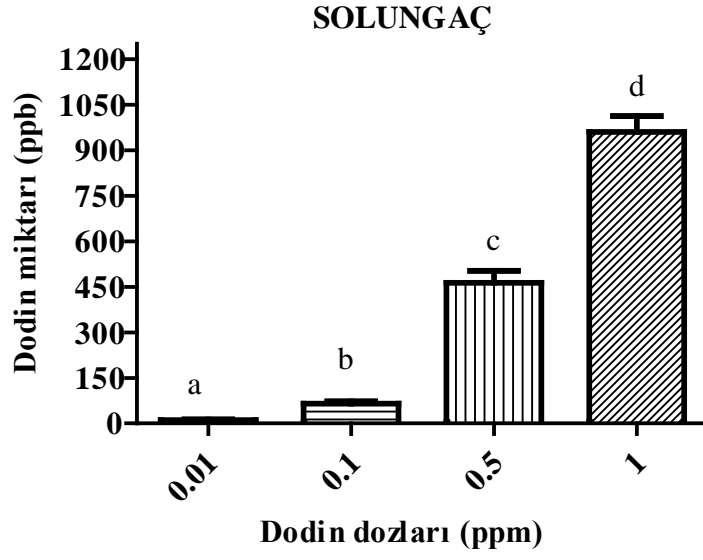
*Tespit limitinin altında



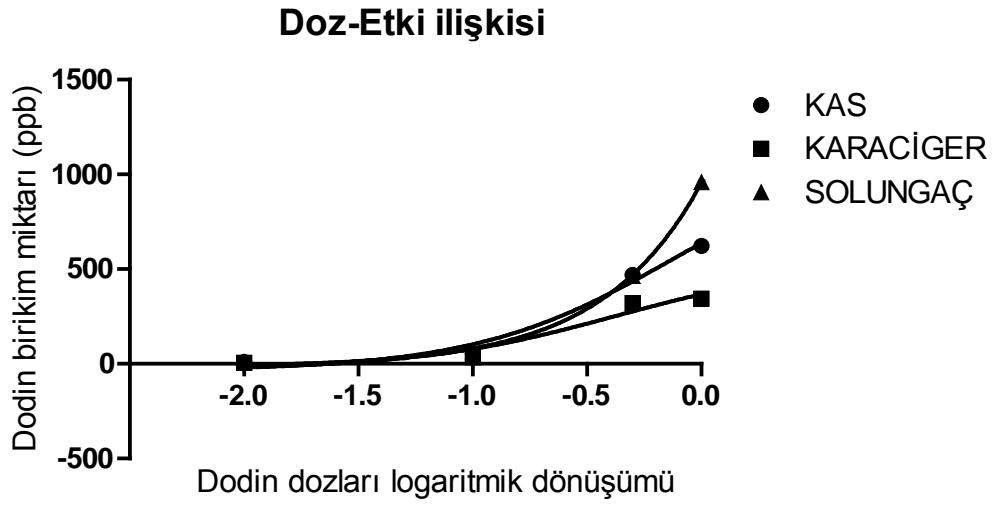
Şekil 4.1. Kasta biriken Dodin miktarındaki değişimler



Şekil 4.2. Karaciğerde biriken Dodin miktarındaki değişimler



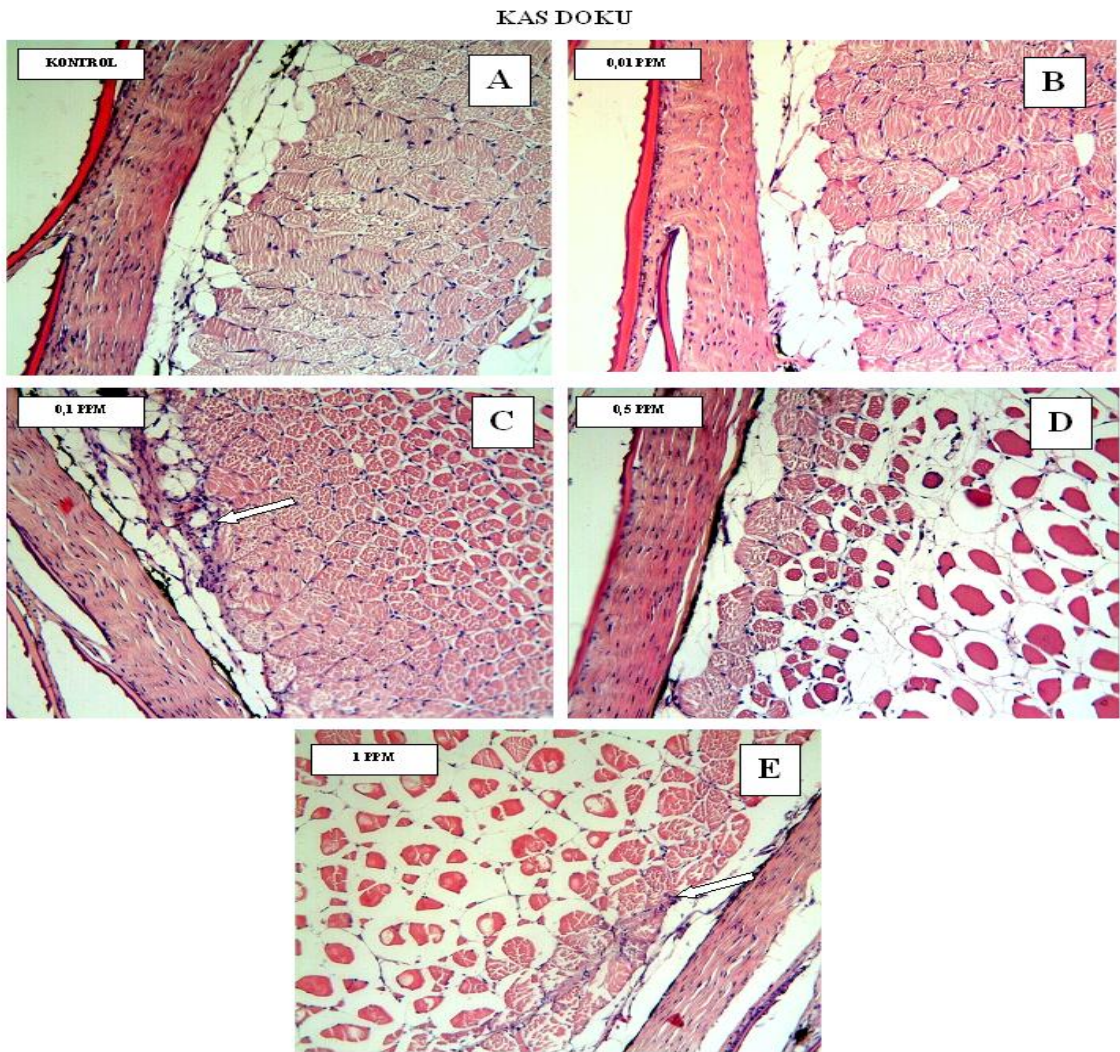
Şekil 4.3. Solungaçta biriken Dodin miktarındaki değişimler



Şekil 4.4. Dozların dokulardaki etkilerinin logaritmik ilişkisi

4.3.Histoloji Analiz Bulguları

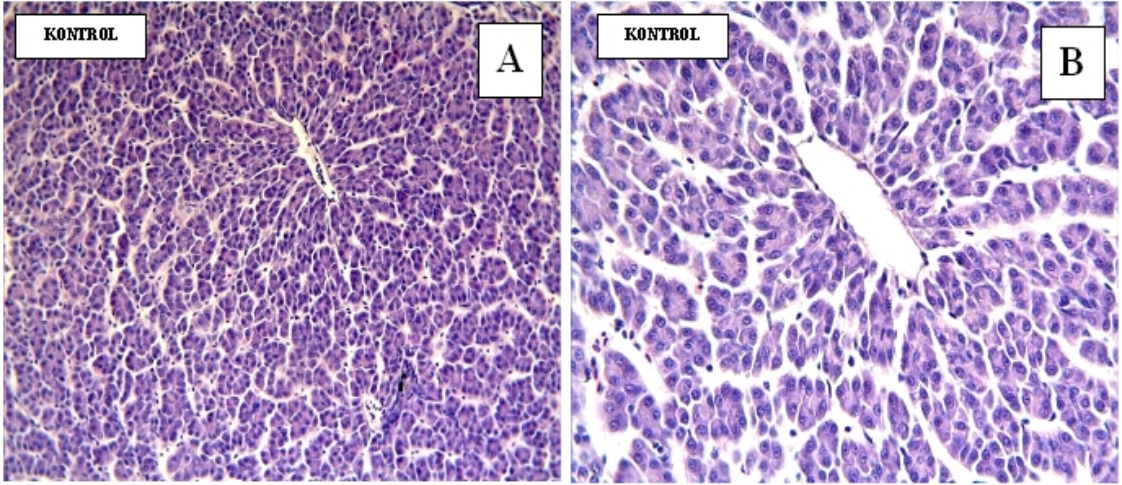
Kas Doku: Kontrol grubunda kas hücrelerinin normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. 0.01 ppm' lik gruptaki kas dokusunun kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi. 0.1 ppm'lik grupta ve 1 ppm'lik grupta (Şekil 4.5 C) ise mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok) olduğu, 0.5 ppm ve 1 ppm 'lik gruplarda ise kas hücrelerinin çapında ve sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da eozinofilik boyanmış ve piknotik nükleuslu hücrelerin olduğu, 1 ppm 'lik grupta (Şekil 4.5 E) eozinofilik boyanmış ve piknotik nükleuslu hücrelerin 0.5 ppm'lik gruba (Şekil 4.5 D) göre belirgin bir artış gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.5. Kontrol grubu (A), 0.01 ppm Dodin grubu (B), 0.1 ppm Dodin grubu (C), 0.5 ppm Dodin grubu (D), 1 ppm Dodin grubu (E) kas doku örnekleri. A, B, C, D, E: H-E; X 20.

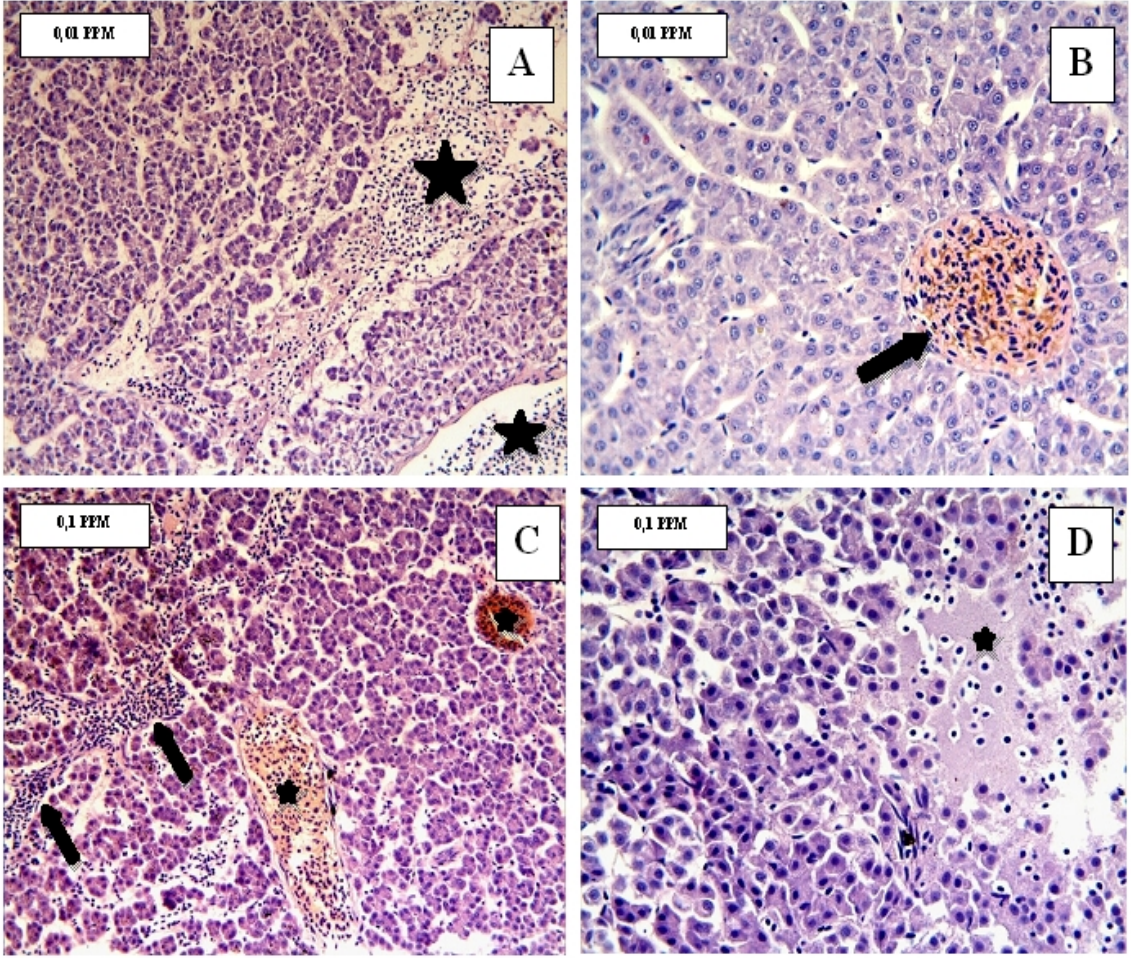
Karaciğer: Kontrol grubunda karaciğer doku örnekleri normal histolojik görünümde (Şekil 4.6 A,B) izlendi. Merkezi yerleşimli vena sentralisten periferine doğru ışımsal tarzda dizilmiş hepatositlerin ve sinüzoidlerin normal görünümde olduğu tespit edildi. 0,01 ppm Dodin grubunda karaciğer doku örneklerinde hepatositlerin ışımsal düzeninde bozulma, mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız) (Şekil 4.7 A) ve vasküler konjesyon (siyah ok) (Şekil 4.7 B) olduğu tespit edildi. 0,1 ppm Dodin grubunda karaciğer doku örneklerinde ise sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah oklar), vasküler konjesyon (siyah yıldız) (Şekil 4.7 C), ödem (yıldız) (Şekil 4.7 D) gözlemlendi. 0.5 ppm Dodin grubunda karaciğer doku örneklerinde mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın siyah oklar), hemoraji (beyaz yıldız), ödem (siyah yıldız) (Şekil 4.8 A, B), vakuolizasyon (ince siyah oklar) (Şekil 4.8 A, B), 1 ppm Dodin grubunda ise belirgin vasküler konjesyon (siyah yıldız), mononükleer hücre infiltrasyonu (siyah oklar) (Şekil 4.8 C, D).

KARACİĞER



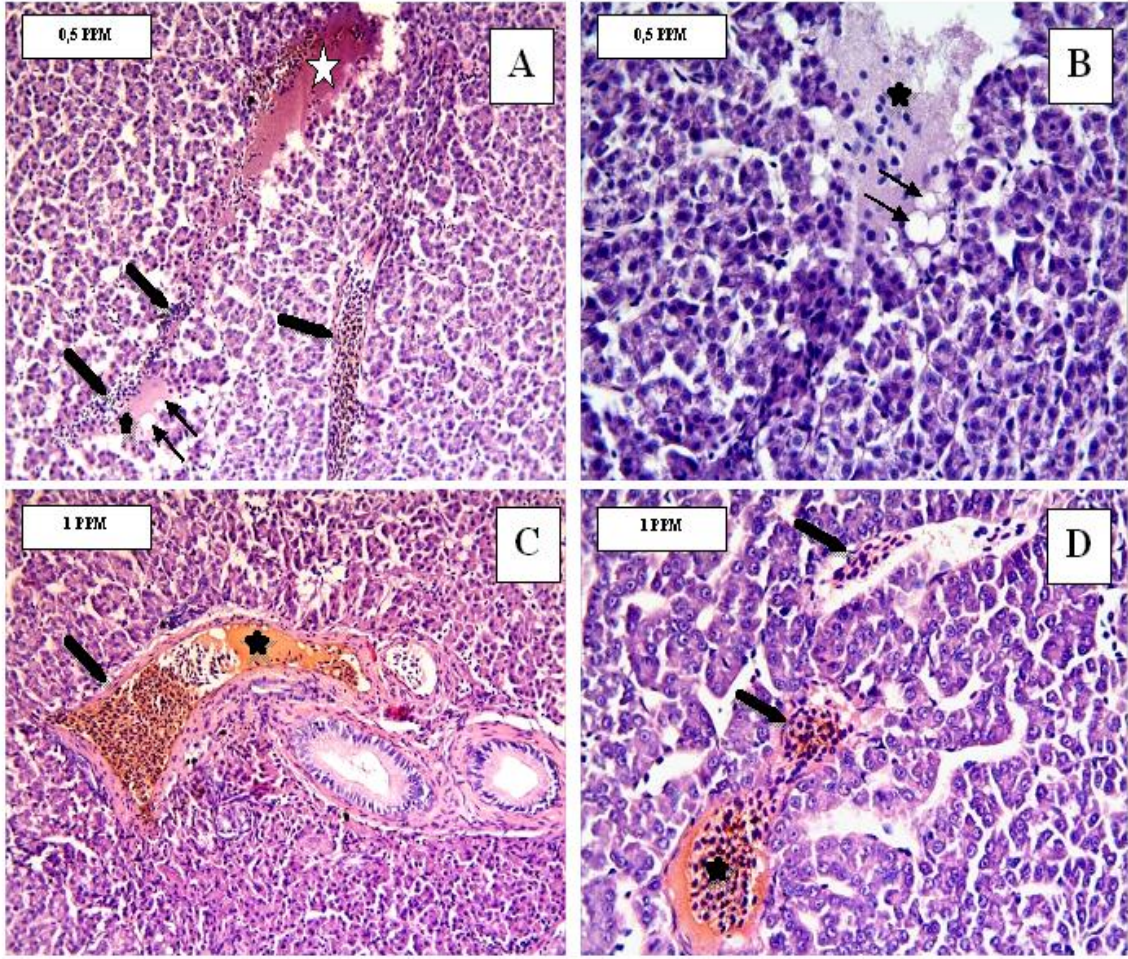
Şekil 4.6. Kontrol grubu (A, B) karaciğer doku örnekleri A: H-E; X20, B: H-E; X40.

KARACİĞER



Şekil 4.7. 0,01 ppm Dodin grubu (A, B) karaciğer doku örnekleri, 0,1 ppm Dodin grubu karaciğer doku örnekleri (C, D). A, C: H-E; X20, B, D: H-E; X40.

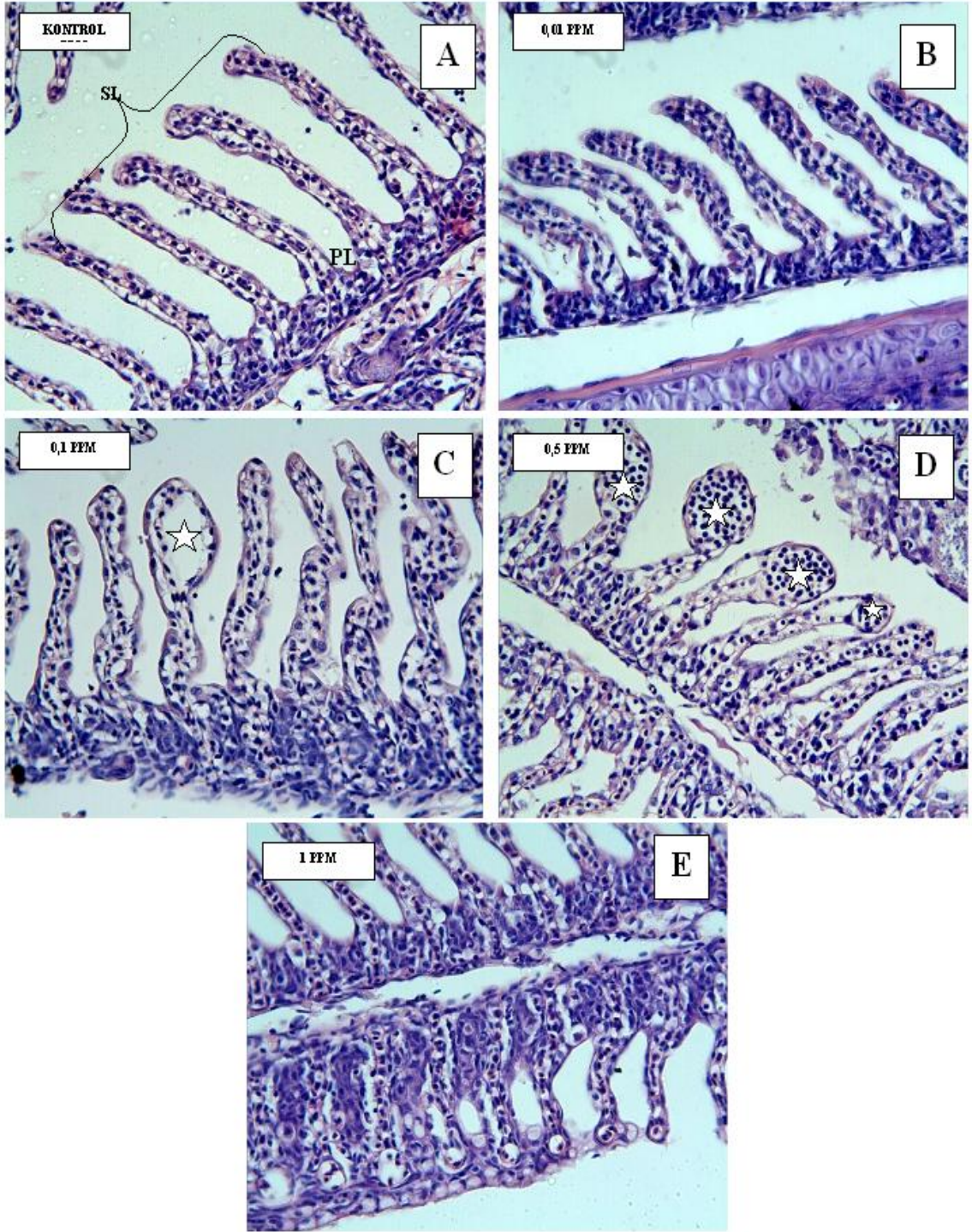
KARACİĞER



Şekil 4.8. 0,5 ppm Dodin grubu (A, B) karaciğer doku örnekleri, 1 ppm Dodin grubu karaciğer doku örnekleri (C, D). A, C: H-E; X20, B, D: H-E; X40.

Solungaç: Kontrol grubunda (Şekil 4.9 A) solungaçların genel yapısı normal histolojik yapıda gözlemlendi. Primer ve sekonder lamellerin normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi. Dodin uygulanan gruplarda doza bağımlı olarak artan sekonder lamellerde hiperplazi ve hücre hipertrofisi gözlemlendi. 0,01 ppm 'lik grupta (Şekil 4.9 B) çok hafif bir hiperplazi olduğu, solungaçların yapısının kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi. 0,1 ppm (Şekil 4.9 C) ve 0,5 ppm (Şekil 4.9 D) Dodin uygulanan gruplarda anevrizma, ödem (*), hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, sekonder lamellerde hiperplazi ve hücre hipertrofisi olduğu gözlemlendi. 0,5 ppm 'lik grupta 0,1 ppm'lik gruba göre anevrizma, ödem (*) ve damar dilatasyonunda artış olduğu tespit edildi. 1 ppm 'lik grupta (Şekil 4.9 E) ise diğer gruplardaki bulgulara ek olarak sekonder lamellerde apikalden başlayarak ilerleyen kaynaşma (füzyon) olduğu tespit edildi.

SOLUNGAC



Şekil 4.9. Kontrol grubu, primer lameller (PL), sekonder lameller (SL) (A), 0,01 ppm Dodin grubu (B), 0,1 ppm Dodin grubu (C), 0,5 ppm Dodin grubu (D), 1 ppm Dodin grubu (E). A, B, C, D, E: H-E; X 20.

5.TARTIŞMA

Yapılan gerçeklik hesaplamalarında % R değerleri %70-120 arasında olduğu için uygun bulundu. Yapılan tekrarlanabilirlik hesaplamalarında %RSDr \leq 20 olduğundan dolayı uygun olduğu bulundu. Farklı günlerde iki analizcinin sonuçlarının gerçeklik hesaplamalarında % R değerleri %70-120 arasında olduğu için uygun bulundu. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik hesaplamalarında %RSDr \leq 20 olduğundan dolayı uygun olduğu bulundu. Gerçeklik belirsizliği 0.069 ve toplam belirsizlik ise 0.15 olarak bulundu. Bulunan bu değerler %15 < % 50 olduğundan kullanılan ölçüm belirsizliği 0.5 olarak hesaplandı (98, 99).

Xing ve arkadaşları, Atrazin ve Chlorphrifos'un aynalı sazan balıkları üzerine oksidatif stres etkisi ve histopatolojik değişimleri üzerine bir araştırma yapmışlardır. Onlar çalışmalarında Atrazin (4.28, 42.8 and 428 ppb) ve Chlorphyrifos (1.16, 11.6 and 116 ppb) ve ikisinin karışımının (1.13, 11.3 and 113 ppb) 96 saatlik akut toksik ve 40 günlük maruziyet sonucu etkilerini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, tüm gruplarda karaciğer ve solungaçlarda, antioksidan enzim (SOD, CAT ve GSH-Px) aktivitelerinde düşüşler, MDA içeriğinde doz miktarlarına bağlı olarak artışlar gözlemlemişlerdir (100).

Kumar ve arkadaşları, bir pestisit olan Endosulfan'ın Chanos chanos türü balığa olan akut toksisite çalışması yapmışlardır. Araştırmacılar farklı dozlarda endosulfanın (18.5, 19.5, 20.5, 21.5 ve 22.5 ppb) 96 saatlik maruziyeti sonrası meydana gelen biokimyasal ve histopatolojik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, doz ve zamana bağlı olarak beyin, karaciğer ve solungaçlarda antioksidatif enzim (CAT, SOD ve GST) aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) artışlar tespit etmişlerdir. Çalışmalarında C.chanos türü balıklara 96 saat sonra endosulfan pestisitinin 21.5 ppb'lik (20.3-22.65 ppb) dozunun LC50 değerine karşılık geldiğini tespit etmişlerdir (101).

Hu ve arkadaşları, Zebra balıklarında kadmiyum birikimi üzerine TiO_2 ve Humik asitin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında tüm gruplara 50 ppb kadmiyuma karşı, suda çözünmüş humik asit ve TiO_2 (5 ve 20 ppm)'in bulunması, kadmiyumun dokulara alım hızını artırırken, humik asit ve TiO_2 karışımı kadmiyumun alım hızını azalttığını tespit etmişlerdir (102).

Dang ve arkadaşları, organoklorin pestisitlerinin *Micropterus salmoides* türü balıklarının dokularındaki dağılımları üzerine yaptığı çalışmada, hem laboratuvar

koşullarında hem de pestisit bulaşmış gölden elde edilen balıkları karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, laboratuvar koşullarında pestisitlere maruz bırakılan balıkların karaciğer, gonad, kas, böbrek, dalak ve beyin dokularında en yüksek Dielddrin tespit etmişlerdir (103).

Wang ve arkadaşları, atrazin ve chlorpyrifos maruz bırakılan aynalı sazan balıklarında böbrek ve dalaklarında biyokimyasal ve histopatolojik etkileri ve birikimini çalışmışlardır. Araştırmaları sonucunda, atrazine ve chlorpyrifos dozları arttıkça böbrek ve dalakta birikimleri de doğrusal olarak arttığını ve özellikle bu organlarda hayli birikebilir olduğunu gözlemlemişlerdir (104).

Literatür ışığında elde edilen değerlendirmeler sonucunda, alabalıklarda (*Onchorhynchus mykiss*) araştırılan Dodin akut etkileri, birçok araştırmacının (100–104) diğer pestisitlerin balıklar üzerine gösterdiği etkiler ile paralellik göstermiş, dokularda yüksek oranda birikim ve biyolojik aktivitelerde olumsuzluklar ve yaşamsal stres kaynağı oluşturmuştur. Çalışmada Alabalıklar üzerinde Dodin'in LC50 değeri 1 ppm üzerinde ölüm etkisi gösterebileceği tahmin edilmiş ve EC50 değeri olarak 0.84 ppm'lik biyolojik aktivitelerde olumsuz sonuçlar doğurduğu gözlemlenmiştir. Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yayımlanan “Dodin için Yeniden Uygunluk Kararı” isimli raporda, Dodin'in 96 saatlik akut toksisite sonrası alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) 0.57 ppm'lik dozun hayli toksik olduğu, *Daphnia magna* için 0.0178 ppm dozun çok yüksek toksik olarak rapor etmiştir (6). Bu veriler, çalışmamızda hesaplanan Dodinin LC50 ve EC50 değerlerini desteklemektedir. Sonuç olarak alabalıklarda 1 ppm üzerindeki Dodin miktarı ölümcül etki yaptığı, 0.5 ppm üzerindeki dozların balıklarda yüzme, solunum ve hareket bozuklukları meydana getirdiği ve özellikle solungaç, kas ve karaciğer dokularında yüksek birikim oluşturmasıyla olumsuz yaşamsal risk taşıdığı söylenebilir.

Metabolik işlevlerin ve detoksifikasyon süreçlerinin temel organı olarak, çeşitli stres oluşturan değişimlerden ve toksik maddelere maruziyetten en çok etkilenen organlardan biri de karaciğerdir. Birçok toksik madde ve toksin, karaciğerde biyolojik olarak daha az zehirli maddelere dönüştürülür ve safra kesesi yardımıyla dışarı atılır. Bazı toksik maddeler ise depolanır, hatta daha da zehirli kimyasallar haline getirilir (105, 106).

Çalışmamızın histolojik değerlendirmesinde; karaciğer dokusunda 0.01 ppm Dodin grubunda karaciğer doku örneklerinde hepatositlerin ışınsal düzeninde bozulma, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vasküler konjesyon olduğu tespit edildi. Üreten ve

arkadaşlarının dioktil adipat (DOA) kullanarak yaptığı çalışmada; 250 ppm deneme grubunda az miktarda yağlanma sonucu vakuolizasyon ve bazı sinüzoidlerde hafif kanlanma, hafif dilatasyon ve küçük nekrotik alanlar oluşmuştur. Çalışmamızın 0.1 ppm deneme grubunda karaciğer doku örneklerinde ise sinüzoidal dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon, ödem gözlemlendi. 0.50 ppm Deneme Grubunda merkezi vena endotel hücrelerindeki displazi, sinüzoidlerdeki kanama, hepatositlerde yağ birikimi, parankimada iri yağ hücrelerinden oluşan adacıklar gözlenmiştir. Hepatopankreas çevresinde melanomakrofaj birikimleri vardır. Geniş alanlara yayılmış fibröz doku ve nekroz da görülmektedir. 0.5 ppm Dodin grubunda karaciğer doku örneklerinde mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, ödem, vakuolizasyon, tespit edilmiştir. 1.00 ppm Deneme Grubunda ise Hepatopankreas alveollerinin sayıları artmış ve kapladıkları alan kontrol grubuna göre oldukça genişlemiştir. Çevrelerinde yaygın yağ dokusu, belirgin vasküler konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, nekrotik alanlar, yer yer kanama ve sinüzoidlerde dilatasyon devam etmektedir. Sinüzoidlerde izlenen kanlanma olgusu, birçok farklı çalışmada hepatosellüler hasarın göstergesi olarak vurgulanmaktadır (107–109).

Çeşitli kimyasal maddelerin ve çevresel kirliliğin etkileri sonucunda balık karaciğerinde ortaya çıkan değişimler geniş ölçüde araştırılarak; birçok ağır metalin, endüstriyel atıkların ve çok sayıda organofosfatlı ve organoklorinli pestisitlerin etkileri değerlendirilmiştir. Bu çerçevede karaciğerde izlenen başlıca histopatolojik bulgular hepatosit morfolojisinde değişimler ve vakuolizasyon artışı, nekroz, iskemi ve steatoz olarak belirtilmektedir. Balıklarda sentetik insektisid uygulamasıyla karaciğerde yağlanma, hemoraji, nekroz, yangı işareti olarak hücre infiltrasyonu ve fibrotik alanlarda genişlemeler olduğunu; bildirilmiştir (110–112).

Solungaçların histolojik yapısının, sudaki toksik kimyasallara karşı özgül olmamakla beraber çok yüksek duyarlılık gösterdiği iyi bilinen bir olgudur (113). Kimyasalların etkisiyle ilk maruziyet yüzeyi olan solungaçlarda farklı değişimler gözlenmektedir. Lamellar epitelde hiperplazi ve hipertrofi, savunma amaçlı olarak sucul ortamdaki kimyasalların dolaşıma geçiş mesafesini artıran fiziksel bariyer oluşturma süreçleridir. Lamellar füzyon da maruziyet yüzeyini daraltarak bu bariyeri yapısal anlamda destekler. Böylece çok iyi damarlanmış olan solunum yüzeyleri kalınlaşır, daralır ve kimyasalların kan dokusuna geçmesi bir ölçüde engellenebilir.

Çalışmamızda; 0.01 ppm 'lik grupta (Şekil 4.10 B) çok hafif bir hiperplazi olduğu, solungaçların yapısının kontrol grubuna benzer olduğu ancak, Dodin

konsantrasyonları 0.1 ve 0.5 ppm değerlerinde uygulandığında, uygulanan gruplarda anevrizma, ödem, hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, sekonder lamellerde hiperplazi ve hücre hipertrofisi oranlarında artış gözlemlendi. 1 ppm 'lik grupta ise diğer gruplardaki bulgulara ek olarak sekonder lamellerde apikalden başlayarak ilerleyen kaynaşma (füzyon) olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda da alabalıklarda (*Onchorhynchus mykiss*) Dodine maruziyetiyle oluşan hipertrofi ve hiperplazi; petrol hidrokarbonları, insektisidler, pestisidler ve ağır metaller gibi çeşitli kimyasallara maruz kalan birçok tür için yapılan çalışmalarda rapor edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (114, 115).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Malatya ilinin ekonomisi tarıma ve sanâyiye dayanır. Özellikle kayısı yetiştirilen bahçelerde ortaya çıkabilecek önemli bazı zararlılarla mücadelede, kimyasal mücadele yapılacaksa, değişik etki şekillerine sahip fungusit, bakterisit ve pestisit gibi kimyasal maddelerle yapılır. Bu alanda sebze ve meyve yetiştiriciliğinde en fazla kullanılan ilaçlardan biride dodindir. Bu ve buna benzer ilaçların kontrolsüz olarak ve aşırı kullanılması hem tüketilen sebze ve meyvelerden insanlara geçişleri hem de tarım alanlarından sucul ortamlara taşınmasıyla kirlilik kaynağı oluşturması kaçınılmazdır. Özellikle Malatya’da tarım alanlarının sucul ortamlara oldukça yakın olması, yağışlarla ve sızıntılarla taşınan tarım ilaçlarının bu sucul habitatlara bir kirlilik riski oluşturabileceği her zaman güncel tutulmalıdır. Yapılan çalışmada Dodin’in 1 ppm ve üstü konsantrasyonlarının gökkuşağı alabalıklarında ölümcül etki yaptığı ya da maruz kalınan konsantrasyonun kas dokusunda %50 kadarının (0.62 ppm) birikime neden olabileceği tespit edilmiştir. Çevre koruma ajansı (EPA)’ın 2005 yılında yayımladığı rapor verilerine göre insanlarda 1000 ppm ve üzeri Dodin alımının letal etki yaptığı verilerinden hareketle balıklarda mevcut birikimin insan sağlığına zarar verici düzeylerde olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat tarımsal alanlardan sulak habitatlara katılan dodin miktarları hakkında herhangi bir veri bulunmadığından, insan, çevre ve sucul canlıların (balıklar) sağlığı açısından, Dodin’in Malatya’da kullanımının mümkün olduğunca kontrol altında kullandırılması ve bilinçli dozların yaygınlaştırılması gerekmektedir. Aksi halde çeşitli yollarla sulak havzalara karışan dodin, doğada yaşayan balıklara toksik etki yapması ve insan besin zincirine girerek zarar verebileceği riski düşünülmelidir.

Bundan dolayı; Malatya ve çevresindeki doğal su kaynaklarından düzenli olarak su, sediment ve balık numuneleri alınarak Dodin ve benzeri tarım ilaçlarının kalıntılarına bakılmalıdır. İlaçlama yapan tarım insanlarına eğitim verilerek bilinçli dozların kullanılması sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. The Who Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 2004. World Heal Organ. 2004:1–60.
2. Zuñiga GMY, Gómez MBC. La prueba de micro núcleos. *La ciencia y el hombre* 2006:XIX(1).<https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num1/articulos/micronucleos/index.htm>
3. Castro R, Ramírez V, Cuenca P. Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev Biol Trop* 2004, 52(3): 611–21.
4. Larrea M, Tirado N, Azcarrunz ME. Genotoxic damage caused by exposure to pesticides in farmers Luribay Township. *Biofarbo* 2010: 18(2): 31–43.
5. Ticha J, Hajslova J, Jech M, Honzicek J, Lacina O, Kohoutkova J, vd. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. *Food Control* 2008, 19(3): 247–56.
6. Environmental Protection Agency Registration Eligibility Decision for Dodine: Case No. 0161; EPA: Washington, DC, 2005.
7. Moreno-Soria AR, Urbina J. Impactos sociales del cambio climático en México. Instituto Nacional de Ecología. INE-PNUD. Méx.2008: 72: 41-64.
8. Ballantyne B . General and Applied Toxicology. Stockton Press, New York, 1994.
9. Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. C. 23, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2007: 185–200.
10. Eldridge BF Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. California Department of Public Health, Vector-Borne Disease Section, 1616 Capitol Avenue, MS7307, P.O. Box 997377, Sacramento, CA.2008
11. Yadav I, Devi N. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environmental Science and Engineering* 2017: 140-58
12. Drum C. Soil Chemistry of Pesticides, PPG Industries, Inc. USA.1980.
13. Moreland DE. Research on biochemistry of herbicides: An historical overview. *Zeitschrift für Naturforsch - Sect C J Biosci* 1993; 48(3–4): 121–31.

14. Shaner DL. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. İçinde: *Pest Management Science* 2004 : 17–24.
15. Bartels PG, McCullough C. A new inhibitor of carotenoid synthesis in higher plants:4-Chloro-5-(dimethylamino)-2- α,α,α -(trifluoro-m-tolyl)-3(2H) pyridazinone (Sandoz 6706). *Biochem Biophys Res Commun* 1972,48(1):1622.<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X72903373>
16. Koyama K, Goto K. . Cardiovascular effects of a herbicide containing glufosinate and a surfactant: in vitro and in vivo analysis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997:145, 409-14.
17. Kamel F, Hoppin JA. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. C. 112, *Environmental Health Perspectives* 2004, 950–8.
18. California I. Farm worker illness following exposure to carbofuran and other pesticides--Fresno County California, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48(6):113–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086423>
19. Dean SR, Meola RW. Effect of diet composition on weight gain, sperm transfer, and insemination in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 2002; 39(2): 370–5.
20. Dryden MW, Gaafar SM. Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1991; 28(3): 394–400.
21. Dr. Katz K, Brooks D. "Toxicity, Organophosphates". Aug 31, 2006. Retrieved May 24, 2007 from eMedicine.
22. Pesticide Action Network North America. "Phase-Out Organophosphate Pesticides: Children & Workers Matter". Retrieved on 5-24-07.
23. Routt Reigart J, Roberts JR. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th ed.. Washington, D.C. Environmental Protection Agency 1999: 1-277.
24. Sioud M, Boudabous A, Cekaite L. Transcriptional responses of *Bacillus subtilis* and *thuringiensis* to antibiotics and anti tumour-drugs. *Int J Mol Med* 2009; 23(1): 33–9.
25. Carr JF, Gregory ST, Dahlberg AE. Severity of the streptomycin resistance and streptomycin dependence phenotypes of ribosomal protein S12 of *Thermus*

- thermophilus depends on the identity of highly conserved amino acid residues. *J Bacteriol* 2005; 187(10): 3548–50.
26. Pérez ME, Soto E, Vega R. Streptomycin blocks the postsynaptic effects of excitatory amino acids on the vestibular system primary afferents. *Brain Res* 1991; 563(1–2): 221–6.
 27. White PM, Potter TL, Culbreath AK. Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Sci Total Environ* 2010; 408(6): 1393–402.
 28. Wang YS, Wen CY, Chiu TC, Yen JH. Effect of fungicide iprodione on soil bacterial community. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004; 59(1): 127–32.
 29. Yen JH, Chang JS, Huang PJ, Wang YS. Effects of fungicides triadimefon and propiconazole on soil bacterial communities. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 2009; 44(7): 681–9.
 30. Beilharz VC, Parbery DG, Swart HJ. Dodine: A selective agent for certain soil fungi. *Trans Br Mycol Soc* 1982; 79(3): 507.
 31. Delen N, Tiryaki O, Türkseven S, Temur C. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları, çözüm önerileri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı 2. Cilt, 758-78,12-16 Ocak 2015, Ankara.
 32. Burçak AA. İlaç Alet ve Teknoloji Araştırmaları Çalışma Grubu'nda yapılan sunum. Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2013.
 33. Delen N. Türkiye'de tarım ilacı sorunu ve bu sorunun kaynakları. Dünden Yarına Entegre Mücadele Çalıştayı, 27-28 Ağustos 2014, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
 34. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalması sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara, Cilt 2. 629-248.
 35. Harrison SA. The fate of pesticides in the environment, Agrochemical Fact Sheet # 8, Penn, USA, 1990.
 36. Ware GW. Effect of pesticides on non-target organisms. *Residue Reviews* 1980; 76: 173–201.

37. Edwards CA. The environmental impact of insecticides. In: Delucchi, V. (Ed.) Integrated pest management, Protection Integàee Quo vadis? An International Perspective. Parasitis 86, Geneva, Switzerland 1987: 309–29.
38. Vickerman GP. Farm scale evaluation of the long-term effects of different pesticide regimes on the arthropod fauna of winter wheat. In: Greeves, M.P., Grieg Smith, P.W. and Smith, B.D. (Eds.) Field methods for the environmental study of the effects of pesticides. BCPC Monograph No. 40 British Crop Protection Council, Farnham, UK 1988: 127–35.
39. Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: Species, activity and diversity. *Agric Ecosyst Environ* 1999; 74(1–3): 373–93.
40. Fishel FM, Ferrell JA. Managing pesticide drift. Agronomy department. PI232. University of Florida, Gainesville, FL, USA, <http://edis.ifas.ufl.edu/pi232>
41. Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Adv Agron* 2009; 102(9): 159–200.
42. Muñoz-Leoz B, Ruiz-Romera E, Antigüedad I, Garbisu C. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biol Biochem* 2011; 43(10): 2176–83.
43. Larson SJ, Capel PD, Majewski M. Pesticides in surface waters: Distribution, trends, and governing factors (No. 3). CRC Press 2010.
44. Trajkovska S, Mbaye M, Gaye Seye MD, Aaron JJ, Chevreuil M, Blanchoud H. Toxicological study of pesticides in air and precipitations of Paris by means of a bioluminescence method. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394(4): 1099–106.
45. FAO/WHO. Pesticide residues in food — 1999 evaluations. Part II toxicological. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. World Health Organization, Geneva 2000.
46. Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, vd. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Sci Total Environ* 2015; 511: 123–37.
47. Lorenz ES. Potential Health Effects of Pesticides. *Ag Commun Mark.* 2009;1–8.
48. Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, vd. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study. *PLoS Med* 2010; 7(10).

49. Lee SJ, Mehler L, Beckman J, Diebolt-Brown B, Prado J, Lackovic M, vd. Acute pesticide illnesses associated with off-target pesticide drift from agricultural applications: 11 states, 1998-2006. *Environ Health Perspect* 2011; 119(8): 1162–9.
50. Singh B, Mandal K. Environmental impact of pesticides belonging to newer chemistry. In: Dhawan, A.K., Singh, B., BrarBhullar, M. and Arora, R. (Eds.). *Integrated pest management*. Scientific Publishers, Jodhpur, India 2013: 152–90.
51. PAN. *Pesticides and health hazards Facts and figures*. Pesticide Action Network, Germany, GLS Gemeinschaftsbank 2012.
52. Mostafalou S, Abdollahi M. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology* 2012; S5: e002.
53. Geldiay R, Balık S. *Türkiye Tatlısu Balıkları Ders Kitabı*. E. Ü. Su Ür. Fak., No: 46, Ders Kitabı No: 16, İzmir 1996.
54. Çetinkaya Açar Ö, Avcı A, Kırış S, Metin Ö, Diler F. Pestisit analizlerine genel bakış. *UGRL Dergisi* 2010; 1(1): 37-41.
55. Liu S, Pleil JD. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2002; 769(1): 155–67.
56. Chung SW, Chen BL. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J Chromatogr A* 2011; 1218(33): 5555-67.
57. Ahmad W, Al-Sibaai AA, Bashammakh AS, Alwael H, El-Shahawi MS. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC* 2015; 72: 181-92.
58. Farajzadeh MA, Khorram P, Alizadeh Nabil AA. Development of a green liquid-liquid microextraction method using a solid disperser performed in a narrow-bore tube for trace analysis of some organophosphorus pesticides in fruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015; 43: 96-105.
59. Shamsipur M, Yazdanfar N, Ghambarian M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for

- determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food Chem* 2016; 204: 289-97.
60. Beyer A, Biziuk M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chem* 2008; 108(2): 669-80.
 61. Tadeo JL. Analysis of pesticides in food and environmental samples. Boca Raton: CRC Press 2008.
 62. Andreu V, Pico Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *TrAC* 2004; 23(10-11): 772-89.
 63. Lesueur C, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 2008; 75(1): 284-93.
 64. Aulakh JS, Malik AK, Kaur V, Schmitt-Kopplin P. A review on solid phase micro extractionhigh performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2005; 35(1): 71-85.
 65. Beltran J, Lopez FJ, Hernandez F. Solidphase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 2000; 885: 389-404.
 66. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J Chromatogr A* 2000; 880: 35-62.
 67. Walorczyk S, Drozdynski D, Kierzek R. Twostep dispersive-solid phase extraction strategy for pesticide multiresidue analysis in a chlorophyll-containing matrix by gas chromatography- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2015; 1412: 22-32.
 68. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and Bdispersive solid-phase extraction^ for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003; 86: 412–31.
 69. Prestes OD, Antonio Padilla-Sanchez J, Romero-Gonzalez R, Lopez Grio S, Garrido Frenich A, Martinez-Vidal JL. Comparison of several extraction procedures for the determination of biopesticides in soil samples by ultrahigh pressure LC-MS/MS. *J Sep Sci* 2012; 35: 861–8.
 70. Rouviere F, Bulete A, Cren-Olive C, Arnaudguilhem C. Multiresidue analysis of aromatic rganochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and

- QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. *Talanta* 2012; 93: 336–44.
71. Peysson W, Vulliet E. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013; 1290: 46–61.
 72. Li Y, Dong F, Liu X, Xu J, Li J, Kong Z, et al. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012; 1224: 51–60.
 73. Helfrich LA, Weigmann DL, Hipkins PA, Stinson ER. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems 2009.
 74. Lehotay SJ, Anastassiades M, Majors RE. The QuEChERS Revolution. *Lc Gc Eur* 2010; 23(8): 418.
 75. Anastassiades M. CRL-SRM 1st Joint CRL Workshop, Stuttgart, 2006, http://www.eurlpesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_anastassiades_quechers.pdf
 76. Majors RE. QuEChERS - a new sample preparation technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples, LCGC North America 2007, 25 (5).
 77. Majors RE. Sample preparation fundamentals for chromatography, Agilent Technologies, Mississauga, Canada 2013.
 78. Lehotay SJ. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues (Chapter 6), In: Vidal Martinez J.L., Garrido Frenich A. (Eds.), pesticide analysis in methods in biotechnology, Humana Press, USA 2004.
 79. Cvua Stuttgart. A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. 1–12. <http://quechers.cvuastuttgart.de/pdf/reality.pdf>
 80. Norli HR, Christiansen A, Deribe E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 7234–41.
 81. Baduel C, Mueller JF, Tsai HH, Ramos MJG. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *J Chromatogr A* 2015; 1426: 33–47.

82. Omar N, Bakar J, Muhammad K. Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas chromatography-mass spectrometry using a modified QuEChERS approach. *Food Control* 2013; 34: 318–22.
83. Wu JP, Luo XJ, Zhang Y, Luo Y, Chen SJ, Mai BX, et al. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in wild aquatic species from an electronic waste (e-waste) recycling site in South China. *Environ Int* 2008; 34: 1109–13.
84. Chuang YH, Zhang Y, Zhang W, Boyd SA, Li H. Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *J Chromatogr A* 2015; 1404: 1–9.
85. Yao L, Zhao JL, Liu YS, Yang YY, Liu WR, Ying GG. Simultaneous determination of 24 personal care products in fish muscle and liver tissues using QuEChERS extraction coupled with ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometer analyses. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2016: 408(28), 8177-93.
86. Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS *Mass Spectrom Rev* 2006; 25(6): 838-65.
87. Hogendoorn E, van Zoonen P. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J Chromatogr A* 2000; 892: 435-53.
88. Niessen WM, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25(6): 881-99.
89. Oliveira FA, Reis LPG, Soto-Blanco B, Melo MM. Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 2015; 50(6): 398–405.
90. Tölgyessy P, Miháliková Z, Matulová M. Determination of Selected Chlorinated Priority Substances in Fish using QuEChERS Method with Dual dSPE Clean-up and Gas Chromatography. *Chromatographia* 2016; 79(21–22): 1561–8.
91. Chang GR, Chen HS, Lin FY. Analysis of banned veterinary drugs and herbicide residues in shellfish by liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). *Mar Pollut Bull* 2016; 113(1–2): 579–84.
92. Rocha AA, Monteiro SH, Andrade GCRM, Vilca FZ, Tornisielo VL. Monitoring of pesticide residues in surface and subsurface waters, sediments, and fish in center-pivot irrigation areas. *J Braz Chem Soc* 2015; 26(11): 2269–78.
93. Kalachova K, Pulkrabova J, Cajka T, Drabova L, Stupak M, Hajslova J. Gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry: A powerful tool for the (ultra)trace analysis of multiclass environmental contaminants in fish and fish feed Rapid Detection in Food and Feed. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(24): 7803–15.
94. Rawn DFK, Judge J, Roscoe V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397(6): 2525–31.
95. Dasika R, Tangirala S, Naishadham P. Pesticide residue analysis of fruits and vegetables. *J Environ Chem Ecotoxicol* 2012; 4(2): 19–28.
96. Çetinkaya Açar Ö, Diler F. Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu Ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi, Mayıs 2016_rev3 : 1-55
97. European Commission, SANTE. SANTE 11945/2015. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed 2015: 48 http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sante_2015_11945.pdf
98. Çetinkaya O. Akuatik toksikoloji: balık biyodeneyleleri, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Karataş M (eds) Nobel, Yayın No. 772, Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi No.1, Ankara 2005; (7): 169-217.
99. Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, vd. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2010; 1217(16): 2548–60.

100. Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic Biochem Physiol* 2012; 103(1): 74–80.
101. Kumar N, Ambasankar K, Krishnani KK, Gupta SK, Bhushan S, Minhas PS. Acute toxicity, biochemical and histopathological responses of endosulfan in *Chanos chanos*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016; 131:79–88.
102. Hu X, Chen Q, Jiang L, Yu Z, Jiang D, Yin D. Combined effects of titanium dioxide and humic acid on the bioaccumulation of cadmium in Zebrafish. *Environ Pollut* 2011; 159(5): 1151–8.
103. Dang VD, Kroll KJ, Supowit SD, Halden RU, Denslow ND. Tissue distribution of organochlorine pesticides in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from laboratory exposure and a contaminated lake. *Environ Pollut* 2016; 216: 877–83.
104. Wang X, Xing H, Jiang Y, Wu H, Sun G, Xu Q, vd. Accumulation, histopathological effects and response of biochemical markers in the spleens and head kidneys of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 148–58.
105. Weisman JL MD. Lipoid liver disease and steatitis in captive sapphire damselfish *Pomacentrus pavo*. *Acta Ichthyol Piscat.* 2006; 36(2): 99–104.
106. Hinton DE, Segner H, Au DWT, Kullman SW HR. Liver toxicity. In, Di Giulio RT, Hinton DE (Eds): *The Toxicology of Fishes*, pp. CRC Press Inc, Florida 2008. 328-52.
107. Peters N, Köhler A KH. Liver pathology in fishes from the lower Elbe as a consequence of pollution. *Dis Aquat Org* 1987; (2): 87–97.
108. Kranz H, Dethlefsen V. Liver anomalies in dab *Limanda limanda* from the southern North Sea with special consideration given to neoplastic lesions. *Dis Aquat Organ* 1990; 9(3): 171–85.
109. Romão S, Donatti L, Freitas MO, Teixeira J, Kusma J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Brazilian Arch Biol Technol* 2006; 49(3): 441–8.
110. Heath AG. Liver. In, *Water Pollution and Fish Physiology*. 2nd ed., pp., CRC Press Inc, Florida 1995; 125–36.
111. Uçar A AM. Ballklarda Toksikopatolojik Lezyonlar. I Atatürk Univ Ziraat Fak Derg 2008; 39(2): 255–61.

112. Cengiz Eİ UE. Sublethal effect of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Env Toxicol Pharmacol* 2005; 21: 246–53.
113. Akaishi FM, de Assis HCS, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, vd. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 46(2): 244–53.
114. Machado MR FE. Effects of organophosphorus methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazil Arch Biol Technol* 2003; 46(3): 361–72.
115. Al-Attar AM. The influences of nickel exposure on selected physiological parameters and gill structure in the teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *J Biol Sci* 2007; 7(1): 77–85.

EKLER

Ek 1: Özgeçmiş

1978 yılında Konya'nın Ereğli ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ereğli'de tamamlayıp, 1998 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde lisans eğitimine başlayarak, 2002 yılında mezun oldu. 2003-2004 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Bölümünde tezsiz yüksek lisans yaptı. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Petrol Analiz Laboratuvarında kimyager olarak işe başladı. TS EN ISO 17025 laboratuvar akreditasyonu ve kalite çalışmalarında yer aldı. İç denetçi, sebep analizi, kalibrasyon teknikleri, ölçüm belirsizliği ve hesaplanması, laboratuvar istatistiği, metotların geçerli kılınması (validasyon) ve metot teyit çalışmaları hakkında eğitimler aldı. Gaz, sıvı kromatografileri, AAS, XRF, ICP-OES ve yakıt cihazlarında uzmanlaştı. 2012 yılında Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Adalet Bölümünde eğitime başladı ve 2014 yılında bitirdi. 2012 yılında C sınıfı İş Güvenliği Uzmanı, 2013 yılında B sınıfı İş Güvenliği Uzmanı oldu. 2017 yılında Asbest Söküm Uzmanı ve yine aynı yıl Tehlikeli Madde Güvenlik Danışmanı oldu. 2015 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'da yüksek lisans eğitimine başladı ve hala aynı anabilim dalında öğrenimine devam etmektedir.



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 28-07-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-95
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Balık
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Sazan Balığı (Cyprinus carpio L., 1758)
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 100 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 0-1 yaş, 5-6 cm, En az 5-10 g

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Selim ERDOĞAN'ın yürütücüsü olduğu "Dodin'e Maruz Bırakılan Sazan Balıklarının Karaciğer Kas ve Solungaç Dokularında İlaç Birikiminin Belirlenmesi." isimli 2016/A-95 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ
Başkan

Prof. Dr. Nigar VARDI
Üye

Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN
Üye

Katıldı
Salih AVCI
Sivil Üye

Katıldı
Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU
Sivil Üye



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

Tıp Fakültesi

Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 60161673-01

Konu : 2016/A-95 nolu çalışma

MALATYA

30 / 03 / 2017

Sayın: Doç. Dr. Selim ERDOĞAN
İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

2016/A-95 protokol nolu “Dodin’e Maruz Bırakılan Sazan Balıklarının Karaciğer Kas ve Solungaç Dokularında İlaç Birikiminin Belirlenmesi” başlıklı çalışmada kullanılacak hayvan türünün *Alabalık* olarak değiştirilmesi, ayrıca çalışmanın başlığının “Dodin’e Maruz Bırakılan Alabalıkların Karaciğer, Kas ve Solungaç Dokularında İlaç Birikiminin Belirlenmesi ve Dokuların Histolojisi Üzerine Etkileri” şeklinde değiştirilmesi Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ

Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı