



## Toprak Solucanları Üzerine Tebukonazol ve Thiramın Toksik Etkilerinin Alan Çalışması ile Değerlendirilmesi

Ertan Yolođlu

*Adiyaman Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü, 02040, Adiyaman*

*eyologlu@adiyaman.edu.tr*

### Özet

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan iki ayrı fungusitin (tebukonazol ve thiram) tarımsal amaçlı olarak kullanımı sonucu neden olduğu toprak kirliliğinin, hedef olmayan toprak canlıları üzerindeki etkilerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla fungusitlerin toprak solucanları (*Lumbricus sp.*) üzerine etkileri, biyokimyasal belirteçler kullanılarak izlendi. Her iki fungusit için iki ayrı uygulama alanı oluşturuldu ve her uygulamadan sonra alanlardan 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde periyodik olarak toprak solucanı örnekleri alındı. Alınan toprak solucanı örneklerinde, mikrozomal bir enzim olan etoksiresorufin-O-deetilaz (EROD) ve sitozolik enzimler olan glutatyon-S-transferaz (GST), karboksilesteraz (CaE) ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri saptandı.

Araştırma sonuçlarımız, kullanılan fungusitlerden tebukonazol'un toprak solucanları üzerine thiramdan daha etkili olduğunu göstermektedir. Mikrokozmoz düzeyinde değerlendirilen ekotoksikolojik etkilerin sonucunda biyobelirteç olarak seçilen EROD, AChE, GST ve CaE enzimlerinin uygun belirteçler olduğu sonucuna da varılmıştır. Ayrıca, kullanılan pestisitlerin toprak kirliliğine neden olduğu, toprakta hedef olmayan organizmalar açısından olumsuz etkilere yol açtığı belirlenmiştir.

**#Anahtar Kelimeler:** Tebukonazol, Thiram, Toprak solucanı, *Lumbricus sp.*, Toksik etki.

## Assesment of Tebuconazole and Thiram's Toxic Effects on Earthworm in a Field Study

### Abstract

In this study, common pesticides; tebuconazole (as a fungicide) and thiram (as a fungicide) were used to determine the effects on non-target organisms. For this aim, the effects of selected pesticides on earthworm (*Lumbricus sp.*) were determined using selected biochemical markers. The study area was divided into two regions. Earthworm samples were collected from each application area at 1st, 3rd, 5th, 7th and 10th days after pesticide applications. The earthworm samples were used to determine ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathion-S-transferase (GST), carboxylesterase (CaE) and acetylcholinesterase (AChE) activities from microsomal or cytosolic preparates.

Results also showed that, tebuconazole is more effective than thiram on earthworm. It is also decided that, selected biomarkers EROD, AChE, GST and CaE are the suitable enzymes to determine the effects of this kind of pesticide exposure in this ecotoxicological microcosm study. The pesticides used in this study caused soil pollution and affects adversely to these non-target organisms in the ecosystem.

*Keywords:* Tebuconazole, Thiram, Earthworm, *Lumbricus sp.*, Toxic effect.

### Giriş

Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak tarımsal üretimi artırmak amacı ile zirai ilaçların bilinçsizce kullanımı giderek artmaktadır. Dünya'daki karasal ve sucül ekosistemleri ve bu ekosistemlerde yaşayan canlıları tehdit eden en önemli sorunlardan biri, zirai mücadelede kullanılan bu pestisitler ve diğer kimyasallardır. Sentetik kimyasallar ve pestisitler hedef olmayan canlıları olumsuz bir şekilde etkilemekte ve ekosistemin yapısını bozmaktadır [1]. Çevreye bırakılan kimyasallar, ekosistemin normal fonksiyonlarını kısa veya uzun süreli olarak ve geçici ya da kalıcı şekilde değiştirebilirler. Sonuçta ekonomik, sosyal ve çevresel kayıplara neden olurlar [2].

Ditiyokarbamatlar, pestisitlerin önemli bir sınıfını oluştururlar ve memeliler için kısmen güvenli olduklarına inanıldığı için, son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Thiram (tetrametilthiuram disülfid) [bis(dimetiltiyokarbamil)disülfid] tarımda ve bahçe bitkilerinde yaygın bir şekilde kullanılan geniş spektrumlu sistemik olmayan bir fungusittir [3]. Thiram yüksek dozlarda, alandaki kuşları, tavşanları, kemirgenleri uzaklaştırıcı etki yapmaktadır. Ayrıca, thiram, belirli antiseptik spreylerde ve medikal sabunlarda bakteriosit

olarak ve insanda uyuz tedavisinde de kullanılmaktadır [4]. Thiram molekülünün disülfid bağları hücrel proteinlerin, peptitlerin ve kofaktörlerin -SH gruplarının oksidasyonundan sorumludur [5]. Tebukonazol [(RS) - 1 - p- klorofenol – 4, 4-dimetil -3 - (1H - 1, 2, 4-triazol – 1 - ylmethyl) pentan – 3 – ol], meyvecilikte ve sebzeçilikte hastalıkların kontrolünde yaygın bir şekilde kullanılan geniş spektrumlu triazol grubu bir fungusittir. Tebukonazole kısmen yeni bir fungusit olmasına rağmen, topraktaki hedef olmayan organizmalar üzerine etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır [6]. Bu fungusit, fungal sitokrom P450 (CYP450) enzimlerine daha fazla affinite gösterir ve CYP450 monooksijenaz süper ailesine dahil CYP51 tarafından katalizlenen funguslardaki sterol 14 $\alpha$ -demetilasyon reaksiyonunun potansiyel inhibitörüdür [7,8].

Tarımda kullanılan bu pestisitlere kaçınılmaz olarak hedef olmayan organizmaların da maruz kalması nedeniyle, birçok faydalı tür ve onların aktivitelerinde istenmeyen etkiler meydana gelebilir [9]. Pestisitlere maruz kalmanın değerlendirilmesi, hedef olmayan organizmalar üzerine toksik maddelerin potansiyel etkilerinin anlaşılmasını sağlar [10]. Toprak solucanları topraktaki birçok biyolojik süreci ve toprağın fiziko-kimyasal yapısını önemli düzeyde etkilerler. Toprak kirliliğinin ekotoksikolojik olarak değerlendirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılan önemli indikatör türler olup, aynı zamanda Avrupa Birliği tarafından hazırlanan çevresel korumaya yönelik yönergede (AB, 1107/2009) önemli bir test organizması olarak kabul edilmiştir. Pestisitlere maruziyetten sonra diğer organizmalarda olduğu gibi toprak solucanlarında da biyotransformasyon ve detoksifikasyon mekanizmaları indüklenir. Glutatyon-S-transferaz, esteraz veya CYP450 gibi detoksifikasyon mekanizmalarının daha hızlı uyarılması ya da daha yüksek düzeyde ekspresyonları, pestisitlerin etkisini azaltmada rol oynarlar. Bu mekanizmalar sadece hedef organizmalarda değil aynı zamanda hedef olmayan organizmalarda da pestisitlere karşı tolerans sağlar [11].

Birçok çalışma, toprak solucanlarının yaşaması, gelişmesi, üremesi, metabolizması, enzim aktiviteleri ve sinir sistemi üzerine organofosforlu, organoklorlu ve karbamat pestisitlerin baskılayıcı etkilerini göstermektedir [12]. Ancak çalışmamızda kullandığımız triazol grubu bir fungusit olan tebukonazol'ün etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, yöremizde kayısı yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılan fungusitler olan tebukonazol ve thiram'ın toprak solucanları (*Lumbricus sp.*) üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi amaçlandı. Bu pestisitlerin toksik etkilerinin saptanması amacı ile toprak solucanlarından *Lumbricus* cinsine ait organizmalar biyoindikatör olarak seçildi.

## Materyal ve Yöntem

### Çalışmada Kullanılan Pestisitler ve Uygulama

Bu çalışmada bir kayısı bahçesinde sezonluk olarak yapılan pestisit uygulaması göz önünde bulundurularak iki ayrı alanda iki ayrı pestisit uygulaması yapıldı.

Uygulama alanlarından birine triazol grubu foliar bir fungusit olan tebukonazol, ((RS) - 1 - p-klorofenil - 4, 4-dimetil - 3 - (1H - 1, 2, 4-triazol - 1 - ylmethyl) pentan - 3 - ol) uygulandı. Kullanılan tebukonazol içeren pestisit, Folicur WP 25 ticari adı ile Bayer-Türk tarafından üretilmektedir. Çalışma alanına adı geçen pestisit, 250 L su içerisinde 150 gr olacak şekilde uygulandı. Diğer alana ise, bir ditiyokarbamat fungusit olan Thiuram veya thiram (tetrametilthiuram disülfid) uygulandı. Kullanılan thiram (TMTD) içeren pestisit, Pomarsol Forte 80 WG ticari adı ile Bayer-Türk tarafından üretilmektedir. Çalışma alanına adı geçen pestisit 250 L su içerisinde 500 gr olacak şekilde uygulandı.

### Toprak Solucanı Örneklerinin Sağlanması

İnönü Üniversitesi Yerleşkesi sınırlarında bulunan kayısı bahçesinde her bir fungusit için iki ayrı uygulama alanı oluşturuldu. Uygulama alanlarından, mevsimlik zirai ilaçlama dönemi başlamadan önce kontrol grubunu oluşturacak toprak solucanı örnekleri alındı. İlaçlama döneminden önce alınan bu örnekler, yapılan iki uygulama için ortak bir kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Toprak solucanlarında tür düzeyinde yapılan sınıflandırmanın güçlüğü ve yurdumuzda bu tür çalışmaların henüz yapılmamış olması nedeniyle, toplanan örneklerin tür yerine cins düzeyinde ifade edilmesinin daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan toprak solucanları ülkemizde de yaygın olarak bulunan *Lumbricus sp.* olarak ifade edildi.

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

## **Toprak Solucanı Homojenatlarının Hazırlanması**

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

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

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

## **Enzimatik Çalışmalar**

S16 fraksiyonlarında GST, AChE ve CaE enzimleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak UV/Vis mikropilaka okuma sistemi (Molecular Devices, Versamax, USA) yardımı ile 96 çukurlu mikropilakalarda ölçüldü. Aynı cihaz tüm sitozolik ya da mikrozomal örneklerdeki toplam protein miktarlarının tayini amacı için de kullanıldı.

Mikrozomal EROD aktivitesinin tayini için 96 çukurlu mikropilakalarda mikropilaka okuyuculu spektrofluorometre (Molecular Devices Corp., Gemini XS) kullanılarak aktivite

tayini yapıldı. Tüm enzim aktivitelerinin tayini için her seferinde en az üç tekrarlı okuma yapılarak, okuma değerleri kaydedildi.

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

S16 fraksiyonlarında CaE aktivitesini belirlemek amacı ile önerilen spektrofotometrik yöntem mikropłaka okuyucu sisteme uyarlandı. Aktivite tayininde 50 µM %96'lık etanol içinde hazırlanan paranitrofenol asetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı [13,14]. Bu amaçla 5 µL örnek ve 250 µL, 0.05 M Trizma pH 7.4 tamponu kuyucuklara pipetlendi ve 25 °C'de 3 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 µL *p*-nitrofenolasetat kuyucuklara ilave edildi ve 2 dakika süreyle 405 nm'de OD okuması yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı.

S16 fraksiyonlarında GST aktivitesini belirlemek amacı ile mikropłaka okuyucu sistem kullanıldı. Substrat olarak, %96'lık etanol içinde hazırlanan 150 mM 1-kloro 2-4 dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör olarak redükte glutasyon (0.002 M) kullanıldı [15]. Mikropłaka kuyucuklarına sırası ile 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4) + 100 µL GSH karışımı ve son olarak 10 µL CDNB pipetlendi. Karışım mikropłaka okuyucu sisteme yerleştirildikten sonra 15 sn süre ile karıştırıldı ve 25 °C'de 2 dk süre ile 344 nm'de absorbans değişimi kaydedildi.

S16 fraksiyonlarında AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Enzim aktivitesi ölçümünde 0.0417 M asetiltiyokoliniodid (ACTI) substrat olarak kullanıldı. Meydana gelen renk değişimine bağlı olarak ürün oluşumunun saptanması için, 412 nm'de okuma yapıldı. Toprak solucanı homojenatlarından elde edilen süpernatantlardan mikropłaka çukurlarına 10 µL pipetlendi. DTNB (Aldrich, USA) 0.00404 M olacak şekilde trizma tamponu kullanılarak (pH 8.0; 0.1M) hazırlandı [16]. Reaksiyon karışımına 200 µL trizma tamponu (0.1 M; pH 8.0) ve son konsantrasyonda  $9,39 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde DTNB pipetlendi. Karışım mikropłaka okuyucuya yerleştirildi ve 10 saniye karıştırıldıktan sonra 25 °C'de 1 dk süre ile absorbans değişimi kaydedildi.

Toprak solucanı örneklerinden elde edilen mikrozomal EROD aktivitesi tayini amacıyla bir flourospektrometre (Molecular Devices Corp., Gemini XS) kullanıldı. Enzim aktivitesinin saptanması için Ex: 530, Em:586 dalga boylarında 10 dk süreyle okuma yapıldı. Okuma işlemlerinde düz tabanlı siyah 96 çukurlu mikropłaka (Grainer, USA) kullanıldı. Bu amaçla, 20 µL örnek üç tekrarlı olarak mikropłakaya pipetlendikten sonra (kör olarak fosfat tamponu kullanıldı), 220 µL 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) pipetlendi. Daha sonra

20 µL 50 µM etoksiresorufin ilave edildi. Son olarak 5 µL 10mM NADPH eklendi ve okuma yapıldı [17, 18].

### **Total Protein Tayini**

Toprak solucanı örneklerinde total protein miktarı Bradford yöntemine göre, mikropilaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax) kullanılarak tayin edildi. Supernatant örnekleri 1/20, mikrozom örnekleri ise 1/10 oranında distile su ile sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikropilakalara pipetlendi. Üzerlerine 250 µL Bradford reagent eklendi. Mikropilaka sistemde 15 sn çalkalandıktan sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dk süreyle karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak absorbans değişimi 595 nm dalga boyunda ölçüldü [19]. Her örnek için protein tayini amacıyla okuma üç tekrarlı olarak yapıldı. Elde edilen değerler BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, örneklerdeki total protein değerleri bir paket programı (Slide) kullanılarak hesaplandı. Son olarak sulandırım faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki total protein değerleri hesaplandı. Elde edilen total protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan sitozolik ya da mikrozomal enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

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

### **Sonuçlar ve Tartışma**

Malatya yöresinde kayısı yetiştiriciliğinde en fazla tercih edilen ve bu nedenle çalışmamızda da kullandığımız pestisitler, fungusit olarak kullanılan kimyasal ajanlardır. Bu amaçla seçilmiş olan tebukonazol ve thiram'ın toprak solucanlarının GST, AChE, CaE ve EROD enzim aktiviteleri üzerinde zamana bağlı olarak çeşitli değişimlere neden oldukları bu çalışma ile saptandı.

Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen enzimi aktivitelerindeki değişimler Tablo 1'de verilmiştir. Tebukonazol uygulaması

sonrasında, AChE enzim aktivitesinde özellikle 3. ve 10. günlerde önemli artışlar gözlemlendi ve bu farklılıklar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0.01$ ). Benzer şekilde EROD aktivitesinde de 1. ve 5. günlerde gözlenen artışlar istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0.01$ ). GST enzim aktivitesinin ise inhibe olduğu gözlemlendi ve özellikle 5. ve 7. günlerdeki inhibisyonlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ( $p<0.01$ ). Bunlara karşın, CaE enzim aktivitesinde 5. ve 7. günlerde ise bir inhibisyon gözlemlendi ancak bu inhibisyonlar istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmadı ( $p>0.01$ ).

**Tablo 1.** Tebukonazol uygulanan alandaki toprak solucanlarında enzim aktivitelerinde (AChE, GST ve CaE için nmol/dk/mg protein  $\pm$  standart hata; EROD için için pmol/dk/mg protein  $\pm$  standart hata) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	n	AChE	EROD	GST	CaE
<b>Kontrol</b>	20	30.0 $\pm$ 9.1	808.85 $\pm$ 49.053	59.7 $\pm$ 5.3	903.4 $\pm$ 100.5
<b>1.</b>	10	22.5 $\pm$ 2.1	1769.36 $\pm$ 225.147*	49.4 $\pm$ 3.4	719.6 $\pm$ 40.0
<b>3.</b>	10	85.3 $\pm$ 34.1*	188.77 $\pm$ 29.183*	52.3 $\pm$ 2.4	809.1 $\pm$ 131.7
<b>5.</b>	10	55.1 $\pm$ 32.2	2525.35 $\pm$ 395.048*	28.5 $\pm$ 1.6*	592.5 $\pm$ 182.4
<b>7.</b>	10	64.6 $\pm$ 22.7	419.63 $\pm$ 56.146*	38.9 $\pm$ 1.7*	940.3 $\pm$ 129.0
<b>10.</b>	10	134.8 $\pm$ 41.1*	421.25 $\pm$ 152.352	50.0 $\pm$ 8.3	1315.4 $\pm$ 245.7

\* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0.01$ ).

Thiram uygulanan alandaki toprak solucanlarında 10 gün süre ile gözlenen enzim aktivitelerindeki değişimler Tablo 2’de verilmiştir. Thiram uygulaması sonucunda toprak solucanlarının AChE, EROD ve CaE enzim aktivitelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çeşitli değişimler gözlenmesine rağmen bu değişimler istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ( $p>0.01$ ). Sadece GST enzim aktivitesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7. günde artış gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ( $p<0.01$ ).



**Tablo 2.** Thiram uygulanan alandaki toprak solucanlarında enzim aktivitelerinde (AChE, GST ve CaE için nmol/dk/mg protein  $\pm$  standart hata; EROD için pmol/dk/mg protein  $\pm$  standart hata) 10 gün süre ile gözlenen değişimler

Gün	n	AChE	EROD	GST	CaE
Kontrol	20	30.0 $\pm$ 9.1	808.85 $\pm$ 49.053	59.7 $\pm$ 5.3	903.4 $\pm$ 101.0
1.	10	37.7 $\pm$ 7.1	760.17 $\pm$ 218.695	87.5 $\pm$ 14.0	744.5 $\pm$ 103.8
3.	10	23.8 $\pm$ 9.1	597.53 $\pm$ 81.500	37.1 $\pm$ 14.0	510.1 $\pm$ 133.1
5.	10	36.3 $\pm$ 5.4	397.54 $\pm$ 83.676	82.8 $\pm$ 11.5	655.7 $\pm$ 113.8
7.	10	44.3 $\pm$ 8.6	316.81 $\pm$ 82.342	88.8 $\pm$ 4.3*	581.9 $\pm$ 48.3
10.	10	51.1 $\pm$ 13.8	512.82 $\pm$ 195.103	85.1 $\pm$ 9.3	612.8 $\pm$ 53.3

\* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p < 0.01$ ).

Çalışmalar erken bahar aylarından itibaren başladığından, her pestisit uygulaması yağışsız bir havada yapılmasına rağmen, uygulamadan sonraki 24-48 saatlik zaman dilimlerinde bölgede gözlenen yağışlar, pestisitlerin yıkanma sonucunda toprağa daha hızlı karışmasına ya da topraktan yıkanarak uzaklaşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda kullanılan pestisitlerin gözlenen etkisinin beklenen sonuçlardan daha farklı olduğunu ifade edebiliriz. Ayrıca, farklı pestisit uygulamalarına bağlı olarak, seçilen enzim aktivitelerinde gözlenen değişimlerin bir nedeninin de çalışma alanına uygulama döneminden bir önceki sonbahar aylarında uygulanmış olan sentetik gübreleme olduğu düşünülmektedir. Alanda yapılan gübrelemenin de kullanılan pestisitler ile birlikte, toprak solucanları üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bunların dışında alan çalışmalarına kıyasla, laboratuvar çalışmalarında madde maruziyeti hem daha hızlı hem de daha fazla olduğu için biyokimyasal belirteçlerin daha fazla etkilendiği rapor edilmiştir [20].

Tebukonazol uygulamasında GST enzim aktivitesinde kısmi inhibisyon saptanmasına rağmen, bunun tebukonazol'un sitokrom P450 enzimlerine daha yüksek affinite göstermesi [8] ve hava şartlarındaki farklılıklardan meydana geldiği tahmin edilmektedir. Thiram uygulamasına bağlı olarak GST aktivitesinin kısmen indüklendiği görülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda pestisitlere karşı GST enzim aktivitesinin mezokozm ve laboratuvar çalışmalarına kıyasla, alan çalışmalarında daha az indüklendiği bildirilmektedir [21,22]. AChE, özellikle organofosforlu ve karbamat pestisit toksisitesinin uyarılarını hızlı bir şekilde gösterdiği için, yaygın olarak kullanılan bir biyokimyasal belirteçtir [23]. Buna karşılık, çeşitli çalışmalarda kullanılan pestisitlerin arazi koşullarında AChE enzim aktivitesi üzerine bir

etkisinin olmadığı da bildirilmektedir [21]. Faz I detoksifikasyon enzimlerinden olan CaE aktivitesinde tebukonazol uygulaması sonucunda önemli bir artış saptanmıştır. Ancak, thiram uygulaması sonucunda CaE enzim aktivitesinde bir baskılanma saptanmıştır. Bu aktivite baskılanmasının sebebinin, pestisitlerin CaE enzimi için alternatif fosforilizasyon alanları olabileceğini akla getirmektedir. Yapılan bir çalışmada pestisitler için alternatif fosforilizasyon alanları olduklarından dolayı, CaE'lerin veya B-esterazların inhibisyonunun, kolin esterazlardan daha hızlı olduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle CaE enziminin pestisit maruziyetine karşı kolin esterazlardan daha duyarlı bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi de bildirilmektedir [24]. Araştırmanın sonucunda elde edilen bulgularda bu çalışma için CaE aktivitesinde gözlenen değişimlerin iyi bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi görüşünü desteklemektedir. Sitokrom P450 enzim sistemi içerisinde yer alan ve Faz I detoksifikasyon enzimi olan EROD (Sitokrom P4501A) aktivitesi, endüstride ve tarımda kullanılan PAH'lar, PCB'ler, dioksinler ve pestisitler gibi birçok önemli organik kimyasal tarafından indüklenir ve bu tipteki kirleticiler için bir biyobelirteç olarak kullanılırlar [25,26]. Çalışmamızda da literatüre paralel olarak, tebukonazol uygulaması sonucunda, bu pestisitlerin EROD enzim aktivitesi üzerinde önemli düzeyde indükleyici etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak thiram uygulaması sonucunda, kısmen inhibisyon gözlenmesine rağmen, EROD aktivitesi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki saptanmadığı görülmektedir.

Sonuç olarak, çevremizde zirai mücadelede kullanılan birçok kimyasal madde, ekosistemde çeşitli olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu etkiler kullanılan kimyasalların yapısına, uygulama şekline, dozuna ve hedef organizmaya göre değişebilir. Sonuç itibarıyla bu kimyasallar çeşitli türleri olumsuz etkileyerek ekosistem dengelerinin, insan ve çevre sağlığının bozulmasına yol açabilirler. Karasal ekosistemin önemli organizmalarından biri olan toprak solucanları üzerinde ortaya çıkabilecek bu olumsuz etkiler, birçok canlının da bundan olumsuz etkilenmesine ve bu organizmaların asıl işlevlerini yerine getirememeleri ile birlikte zamanla tarımsal verimin de azalmasına yol açacaktır.

## **Teşekkür**

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (İÜBAP 2005/65) tarafından desteklenmiştir.

## **Kaynaklar**

[1] K. H. Tan, Environmental Soil Science, Marcel Dekker, Inc. New York, United States, 1995.

- [2] Ecological Effects, <http://www.extoxnet.orst.edu/tibs/ecologic.htm>, Eriřim Tarihi: 11.09.2014.
- [3] S. Girotti, E. Maiolini, S. Ghini, E. Ferri, F. Fini, P. Nodet, and S. Eremin, *Analytical Letters*, 2008, **41**, 46-55.
- [4] P. S. Dalvi, T. Wilder-Kofie, B. Mares, R. R. Dalvi and L. H. Billups, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, **74**, 85-90.
- [5] C. Cereser, S. Boget, P. Parvaz, A. Revol, *Toxicology*, 2001, **163**, 153-162.
- [6] B. Muñoz-Leoz, E. Ruiz-Romera, I. Antigüedad, C. Garbisu, *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, **43**, 2176-2183.
- [7] D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, D. W. Hollomon and S. L. Kelly, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **169 (2)**, 369-373.
- [8] D. C. Lamb, M. Cannieux, A. G. S. Warrilow, S. Bak, R. A. Kahn, N. J. Manning, D. E. Kelly and S. L. Kelly, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **284**, 845-849.
- [9] Y. L. Yu, X. M. Wu, S. N. Li, H. Fang, Y. J. Tan and J. Q. Yu, *Chemosphere*, 2005, **59 (7)**, 961-967.
- [10] S. Panda and S. K. Sahu, *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**, 363-366.
- [11] M. Velki, B. K. Hackenberger, Ź. Lončarić and D. K. Hackenberger, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, **104**, 110-119.
- [12] K. A. Tarrant, S. A. Field, S. D. Langton and A. D. M. Hart, *Soil Biol. Biochem*, 1997, **29 (314)**, 657-661.
- [13] U. Nousiainen and R. Torronen, *Gen. Pharmacol.*, 1984, **15**, 223-227.
- [14] P. Santhoshkumar, and T. Shivanandappa, *Chemico-Biological Interactions*, 1999, **119-120**, 277-282.
- [15] W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 7130-7139.
- [16] G. L. Ellman, K. D. Coutney, Jr. V. Anders and R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 85-95.
- [17] B. Mayer and R. T. Mayer, *Drug Metab. Dispos.*, 1974, 583-588.
- [18] J. J. Whyte, R. E. Jung, C. J. Schmitt and D. E. Tillitt, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2000, **30**, 347-570.
- [19] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [20] P. R. L. Alves, E. J. B. N. Cardoso, A. M. Martines, J. P. Sousa and A. Pasini, *Chemosphere*, 2013, **90**, 2674-2682.

- [21] L. H. Booth, S. Hodge and K. O'Halloran, *Environ. Toxicol. and Chemistry*, 2000, **19**, 417-42.
- [22] Y. Capowiez, M. Rault, C. Mazzia and L. Belzunces, *Pedobiologia*, 2004, **47 (5-6)**, 542-547.
- [23] J. W. Rao, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006, **86 (2)**, 78-84.
- [24] E. Küster, *Aquatic Toxicology*, 2005, **75**, 76-85.
- [25] L. Camus, E. Aas and J. F. Borseth, *Marine Environ. Research*, 1998, **46**, 29-32.
- [26] E. Agradi, R. Baga, F. Cillo, S. Ceradini and D. Heltai, *Chemosphere*, 2000, **41**, 1555-1562.