



Balıklarda Genotoksik Hasarın Belirlenmesine Yönelik Bir Araştırma: *Capoeta banarescui* Örneği

Seda KONTAŞ^{1*} , Derya BOSTANCI² 

¹Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, 52400 Ordu-Türkiye

²Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, 52200 Ordu-Türkiye

ÖZ

Melet Irmağı, Ordu ilinin ana içme suyu kaynağıdır. Yukarı Melet Havzası fındık tarımında kullanılan pestisitlerden kaynaklı ağır metal ve diğer kirleticilerin etkisi altındadır. Bu çalışmada, Yukarı Melet Havzasından mevsimsel olarak su, sediment ve *Capoeta banarescui* bireylerinin bazı dokularında alüminyum (Al^{+3}), nikel (Ni^{+2}), arsenik (As^{+3}), krom (Cr^{+3}), kadmiyum (Cd^{+2}), kurşun (Pb^{+4}), mangan (Mn^{+2}), demir (Fe^{+3}), kobalt (Co^{+2}), bakır (Cu^{+2}), çinko (Zn^{+2}) konsantrasyonları belirlenmiş ve bu elementlerin genotoksik potansiyellerinin tespiti amacıyla mikronükleus (MN) testi ve comet testi uygulanmıştır. Suda Al, As, Fe, Cu; sedimentte Pb ve balıkların kas dokusunda As, Pb, Mn bazı ulusal ve uluslararası limit değerlere göre yüksek bulunmuştur. Eritrositlerdeki MN frekansı en yüksek yaz mevsiminde (%2,20) tespit edilmiştir ($P>0,05$). Comet testi sonuçlarına göre, eritrosit hücrelerindeki DNA hasarından dolayı oluşan kuyruk boyu değerleri ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla 21,03 μm , 21,40 μm , 20,47 μm ve 9,02 μm olarak tespit edilmiştir ve en yüksek DNA hasarı yaz mevsimindedir ($P<0,05$). Kuyruktaki %DNA değeri de kuyruk boyu değerlerini desteklemektedir ($P<0,05$). Bu çalışma, Yukarı Melet Havzasında yaşayan *C. banarescui* türünde yapılan ilk genotoksisite değerlendirme çalışmasıdır. MN testi ve comet testi parametreleri, Yukarı Melet Havzasının ağır metaller ve çeşitli kirleticilerin genotoksik etkisi altında olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Comet testi, DNA hasarı, mikronükleus testi, genotoksisite

MAKALE BİLGİSİ

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 12.02.2020
Düzeltilme : 26.03.2020
Kabul : 28.03.2020
Yayım : 27.08.2020



DOI:10.17216/LimnoFish.688645

* SORUMLU YAZAR

sedakontas@gmail.com
Tel : +90 537 921 20 61

The Study on Determination of Genotoxic Damage in Fish: *Capoeta banarescui*

Abstract: Melet River is the main drinking water resource of Ordu province. The Upper Melet Basin is under the effects of heavy metal and other pollutants originating from pesticides which used in hazelnut farming. In this study, the concentrations of aluminium (Al^{+3}), nickel (Ni^{+2}), arsenic (As^{+3}), chrome (Cr^{+3}), cadmium (Cd^{+2}), lead (Pb^{+4}), manganese (Mn^{+2}), iron (Fe^{+3}), cobalt (Co^{+2}), copper (Cu^{+2}), zinc (Zn^{+2}) were seasonally determined in water, sediment and some tissues of *Capoeta banarescui* from the Upper Melet Basin and micronucleus (MN) and comet testi were applied to determine the genotoxic potential of these elements. Al, As, Fe, Cu in water, Pb, in sediment and As, Pb, Mn in fish muscle were found in high concentration according to some national and international limit values. The MN frequency in erythrocytes was found as the highest value (%2.20) in summer ($P>0.05$). According to comet assay results, the tail length values due to DNA damage in erythrocyte cells were determined as 21.03 μm , 21.40 μm , 20.47 μm and 9.02 μm in spring, summer, autumn and winter, respectively and the highest DNA damage was in summer ($P<0.05$). The values of %DNA in tail was also supported the tail length values ($P<0.05$). This research was the first genotoxicity assessment study of *C. banarescui* inhabiting the Upper Melet Basin. MN test and comet assay parameters revealed that the Upper Melet Basin is under the effect of heavy metals and various pollutants.

Keywords: Comet assay, DNA damage, micronucleus test, genotoxicity

Alıntılama

Kontaş S, Bostancı D. 2020. Balıklarda Genotoksik Hasarın Belirlenmesine Yönelik Bir Araştırma: *Capoeta banarescui* Örneği. LimnoFish. 6(2): 144-152. doi: 10.17216/LimnoFish.688645

Giriş

Su en önemli doğal kaynaklarımızdan birisidir. Çeşitli sebeplerle bir ortamdaki suyun kalitesinin

veya dengesinin bozulması su kirliliğini de beraberinde getirmektedir. Özellikle tarım alanlarında kullanılan azotlu ve fosfatlı gübreler,

bunun dışında benzene katılan kurşun türevleri, arıtımı yapılmamış olarak akarsulara verilen atık sular içerisindeki kadmiyum, bakır, nikel, krom ve çinko gibi zehirli elementler, akarsularda ciddi ve tehlikeli düzeylerde bir kirliliğin kaynağını oluşturmaktadır (Toroğlu vd. 2006). Balıklar, sucul ekosistemlerdeki besin zincirinin en üstündedir ve kirlenmiş sulardaki toksik iz elementleri biriktirebilirler (Mansour ve Sidky 2002; Zhuang vd. 2013). Balıkların buldukları ortamda çevresel kirlenmeye maruz kalması ya doğrudan genotoksisiteyle sonuçlanır ya da genellikle hücresel stresin uyarılmasıyla genotoksik hasar meydana gelir (Klobučar vd. 2010).

Son yıllarda, genotoksitenin tespitinde hassas bir indikatör olarak DNA tek dizi kırıklarının ölçümüne ilgi gösterilmektedir. Bu amaçla yararlanılan comet testi basit, çok yönlü, hızlı uygulanabilme (Çavaş 2011; Güner ve Gökalp Muranlı 2013), görülebilme ve DNA hasarlarını belirlemede oldukça hassas olması bakımından değerli bir araç olarak görülmektedir (Dhawan vd. 2009; Factori vd. 2014). Mikronükleus (MN) testi ise, kimyasal ve fiziksel ajanlar yoluyla tetiklenen sitogenetik hasarı belirlemede yaygın biçimde kullanılmaktadır. Özellikle, sucul ortamda var olan bileşiklerin genotoksik niteliklerini tespit etmeye izin verir.

Ordu ilinin en büyük akarsuyu olan Melet Irmağı Orta ve Doğu Karadeniz bölümleri arasında doğal bir sınır oluşturmaktadır ve uzunluğu 161 km'dir (Anonim 2016). Irmak jeolojik konumu itibariyle maden yataklarınca zengin bir bölgede bulunmaktadır ve bu bölgede özellikle bakır (Cu^{+2}), kurşun (Pb^{+4}), gümüş (Ag^{+}), çinko (Zn^{+2}), demir (Fe^{+2}), altın (Au^{+3}) ve mangan (Mn^{+2}) maden yatakları dikkat çekmektedir (Anonim 2011). Bu çalışmanın temel amacı, Yukarı Melet Havzasının suyu ve sedimentinde var olan metalloid ve ağır metallerin *Capoeta banarescui*'nin dokularında birikmesinin yanında, hücre düzeyinde DNA'da meydana getirebileceği genotoksik etkilerin ortaya konmasıdır. Balık eritrositlerinde mikronükleus ve comet testleri kullanılarak ırmak suyunun genotoksik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücrelerde meydana gelen genetik değişiklikler, genotoksik birer belirteç olduğundan ve Ordu ilinin ana içme suyu olarak yararlanılan Melet Irmağı'nın bu anlamda öneminden dolayı, bu testlerin sonuçlarından elde edilecek bilgilerin önemi tartışılmazdır. Genotoksik etkiye sahip ağır metaller gibi maddelerin bulunduğu ortamlardan uzaklaştırılması ve su ortamına karışmasının önüne geçilmesi adına da, bu çalışmadan elde edilecek sonuçların erken bir uyarı sistemi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Melet Irmağı üzerinde yer alan Topçam Barajı'nın üst bölgesi olan Yukarı Melet Havzasının ağır metal konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla, farklı bölgelerden mevsimsel olarak su, sediment ve 70 adet *Capoeta banarescui* örneği alınmıştır. Örneklemeler, Melet Irmağı üzerinde yer alan Topçam barajının üst bölgesi olan Yukarı Melet Havzasında, fındık bahçelerinde yoğun bir şekilde gübreleme ve ilaçlama faaliyetlerinin yapıldığı arazilerin bulunduğu, pestisit girdisi olan ve pek fazla yerleşim alanı bulunmayan bölgede yapılmıştır.

Suyun fiziko-kimyasal parametrelerinin belirlenmesi amacıyla Ocak 2015 - Aralık 2016 tarihleri arasında mevsimsel olarak sıcaklık ($^{\circ}C$), pH, iletkenlik ($\mu s/cm$), tuzluluk (%), çözülmüş oksijen (ÇO) (mg/L), oksijen doygunluğu (OD) (%), toplam çözülmüş katı madde miktarı (TDS) (mg/L) ve direnç ($k\Omega.cm$) değerleri Hach Lange marka çoklu ölçüm cihazı ile arazide ölçülmüştür. Aynı gün içerisinde, laboratuvara getirilen su örneklerinde nitrit azotu (mg/L), nitrat azotu (mg/L), sülfat (mg/L) ve fosfat (mg/L) seviyeleri spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir.

Ağır metal analizleri için, su akışının azaldığı bölgelerden polietilen şişelere su numuneleri alınmıştır. Aynı bölgeden ırmağın dip kısmından alınan sediment örnekleri de prosedürlere uygun şekilde ağır metal analizine hazır hale getirilmiştir (Dural ve Göksu 2006). Balığa ait kas, solungaç, karaciğer dokularından yaklaşık olarak 0,5 g'lık numuneler alınarak prosedürlere uygun olarak ağır metal analizine hazır hale getirilmiştir (Ciftci vd. 2011). Su, sediment ve dokularda analiz edilen elementler Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Al, Ni, As, Cr, Cd, Pb şeklindedir. Örneklerin element içerikleri, Giresun Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Bruker marka 820-MS model ICP-MS Spektrometresi ile belirlenmiştir.

Irmakta varlığı tespit edilen elementlerin *C. banarescui* bireylerinin ($n=20$) eritrositleri üzerindeki olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılmıştır. Genotoksite analizleri için her mevsimde 5 birey değerlendirilmiştir. Balıklar laboratuvara canlı olarak getirilmiştir. Her bir birey önce dekapite edilmiş (Yazıcı ve Şişman, 2015) ardından kan örnekleri doğrudan balığın kalbinden, müdahale öncesinde heparinize edilmiş şırıngalar yardımıyla alınmıştır. Daha sonra balıkların diseksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Comet testi alkali koşullarda ($pH > 13,0$) Singh vd. (1988)'nin bildirdiği prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır (Tice vd. 2000). Hazırlanan preparatlar Etidyum bromür ile boyanmış ve floresan mikroskopunda (Leica) TXR filtresi kullanılarak incelenmiştir.

Comet testinde kullanılan kuyruk boyu, ortalama kuyruk yoğunluğu (%), kuyruktaki % DNA miktarı (% DNA_T) ve kuyruk momenti parametrelerinin değerleri TriTek CometScore 2.0 yazılımı kullanılarak ölçülmüş ve hesaplanmıştır. Her birey için 100 eritrosit hücresi değerlendirilmiştir. Mikronükleus testi için, her bir bireyden bir damla kan lam üzerine damlatılarak derhal ince bir tabaka halinde yayma preparat hazırlanmıştır. Yayılan kan tabakası kurduktan sonra, lamlar 20 dakika etanol içerisinde bekletilmiş ve daha sonra %5'lik Giemsa solüsyonu ile boyanması sağlanmıştır. Her birey için 2000 eritrosit hücresi sayılmıştır (Boettcher vd. 2010).

Suyun fiziko-kimyasal parametrelerinin, su, sediment ve balık dokularındaki element seviyelerinin, mikronükleus ve comet testi verilerinin mevsimsel ve yıllık değerlerine ait tanımlayıcı istatistikleri hesaplanmıştır. Mevsimler arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. MN testi verileri ile comet testi parametreleri arasında korelasyon analizi yapılmıştır. Ayrıca, ırmak suyunda en yüksek miktarda belirlenen Al, As ve Cr elementlerinin MN frekansı ve comet testi parametreleri ile arasındaki korelasyon da incelenmiştir. İstatistiksel testler MINITAB 16 paket programı kullanılarak uygulanmıştır.

Bulgular

Bu çalışmada, mevsimsel olarak toplanan su, sediment ve *C. banarescui* örneklerinin kas, solungaç ve karaciğer dokularında Al, Ni, As, Cr, Cd, Pb, Mn, Fe, Co, Cu, Zn konsantrasyonları belirlenmiştir. Örneklenen *C. banarescui* bireylerinin ortalama boy ve ağırlık değerleri sırasıyla $15,42 \pm 0,278$ cm ve $39,36 \pm 2,330$ g'dır.

Su numunelerinin element konsantrasyonları Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği ve Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği'nde belirtilen element konsantrasyonu değerleriyle karşılaştırılmıştır (SKKY 2004; YSKY 2012). Mevsimsel olarak örneklenen sediment numunelerinin element konsantrasyonları yer kabuğu içeriğinde doğal olarak bulunan element konsantrasyonu değerleriyle karşılaştırılmıştır (Turekian ve Wedepohl 1961). Su ve sedimentin metalloid ve ağır metal konsantrasyonları ile suyun fiziko-kimyasal parametrelerinin sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Suda konsantrasyonu SKKY (2004) ve YSKY (2012)'ndeki limit değerlerin üzerinde tespit edilen metalloid ve ağır metal konsantrasyonları ilkbahar

mevsiminde alüminyum (Al; 52,008 µg/L) ve demir (Fe; 312,773 µg/L), yaz mevsiminde arsenik (As; 22,223 µg/L) ve demir (Fe; 253,661 µg/L), sonbahar mevsiminde alüminyum (Al; 28,768 µg/L), arsenik (As; 27,230 µg/L) ve demir (Fe; 210,037 µg/L), kış mevsiminde ise demir (Fe; 268,130 µg/L) olarak belirlenmiştir. Cr ve Cu ise yıllık olarak değerlendirildiğinde belirtilen limit değerlerin üzerinde tespit edilmiştir. Yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde Pb, yer kabuğu değerini (Turekian ve Wedepohl 1961) aşmamış olsa da bu değere (20,0 µg/g) çok yakın konsantrasyonda tespit edilmiştir (Tablo 1).

Balıklara ait kas dokusundaki ağır metal konsantrasyonları Gıda ve Tarım Örgütü (FAO 1983), Dünya Sağlık Örgütü (WHO 1989); Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (TGK 2002); Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (IAEA 2003) ve Avrupa Komisyonu (EC 2008)'na göre insan tüketimi için maksimum kabul edilir konsantrasyonlarla karşılaştırılmıştır. Balıkların kas, karaciğer ve solungaçlarındaki metalloid ve ağır metal konsantrasyonlarının mevsimsel olarak değerleri Tablo 2'de sunulmuştur. Sonbahar ve kış mevsimlerinde balıkların kas dokusunda Mn konsantrasyonları bazı ulusal ve uluslararası standartlarda belirtilen limit değerleri geçmiştir (Tablo 2). Balıkların kas dokusundaki As miktarlarının da belirtilen sınır değerinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (FAO 1983). Balıkların kas dokusundaki Pb miktarlarının yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde belirlenen sınır değerlerin üzerinde (WHO 1989; TGK 2002; EC 2008), ilkbahar mevsiminde ise IAEA (2003)'nın bildirdiği limit konsantrasyonla eşdeğer olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

C. banarescui bireylerinin eritrosit hücrelerinde yapılan analizler sonucunda tespit edilen mikronükleus oluşumu Şekil 1'de ve ortalama mikronükleus (MN) frekansları Tablo 3'te verilmiştir. *C. banarescui* bireylerinin eritrositlerindeki mikronükleus frekansı ilkbaharda ‰ 2,10, yaz mevsiminde ‰ 2,20, sonbaharda ‰ 1,60 ve kış mevsiminde ‰ 0,40 olarak tespit edilmiştir. Buna göre, *C. banarescui* bireylerinde gözlemlenen mikronükleusların frekansı yaz > ilkbahar > sonbahar > kış şeklinde değişmektedir. *C. banarescui* örneklerinin eritrositlerinde belirlenen mikronükleus frekansı değerleri mevsimsel olarak karşılaştırıldığında, ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimlerindeki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$) (Tablo 3).

Tablo 1. Suyun fiziko-kimyasal parametreleri, su ve sedimentte metalloid ve ağır metallerin mevsimsel konsantrasyonları (L.D.A.: Limit değerin altında) (Ort. ± S.H.)**Table 1.** Physico-chemical parameters of water, seasonal concentrations of metalloid and heavy metals in water and sediment (L.D.A. : below limit value) (Mean. ± S.H.)

Fiziko-kimyasal Parametreler	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Yıllık Ortalama
Sıcaklık (°C)	22,1	28,3	10,7	5,0	16,53 ± 5,30
pH	7,94	8,20	7,62	8,58	8,09 ± 0,203
ÇO (mg/L)	7,03	7,40	10,11	10,09	8,66 ± 0,836
OD (%)	90,1	107,4	102,0	100,0	99,88 ± 3,61
Tuzluluk (‰)	0,13	0,18	0,14	0,15	0,15 ± 0,010
TDS (mg/L)	143,4	185,9	148,3	147,1	156,18 ± 9,96
İletkenlik (µs/cm)	280	376	298	302	314,0 ± 21,2
Direnç (kΩ.cm)	3,32	2,73	3,42	3,25	3,18 ± 0,154
NO ₂ -N (mg/L)	0,006	0,005	0,003	0,007	0,01 ± 0,0008
NO ₃ -N (mg/L)	0,5	8,4	0,4	0,4	2,43 ± 1,99
SO ₄ ⁻² (mg/L)	8	19	28	18	18,25 ± 4,09
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	1,18	0,65	4,07	0,26	1,54 ± 0,864
P ₂ O ₅ (mg/L)	0,88	0,49	3,04	0,20	1,15 ± 0,644
Metalloid ve Ağır metaller	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Su (µg/L)
Al	52,008**	2,710	28,768**	10,322	23,500 ± 11,000**
As	17,387	22,223*	27,230*	18,348	21,300 ± 2,240*
Cr	0,889	3,878**	0,929	0,749	1,612 ± 0,757**
Cd	L.D.A	L.D.A	L.D.A	L.D.A.	L.D.A
Pb	L.D.A	L.D.A	L.D.A	L.D.A.	L.D.A
Mn	16,810	L.D.A	1,794	13,569	8,010 ± 4,220
Fe	312,773*	253,661**	210,037**	268,130**	261,200 ± 21,200**
Co	L.D.A	L.D.A	L.D.A	L.D.A.	L.D.A
Cu	1,186	2,323**	1,884**	2,329**	1,931 ± 0,269**
Zn	5,295	L.D.A	L.D.A	6,448**	2,740 ± 1,820
Ni	1,187	2,227	0,465	1,062	1,235 ± 0,366

*: SKKY (2004)'ne göre yüksek değerler; **: YSKY (2012)'ne göre yüksek değerler

Metalloid ve Ağır metaller	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Sediment (µg/g)
Al	4093,95	5903,33	4500,66	3286,02	4446,00 ± 547
As	5,02	7,00	5,63	4,33	5,49 ± 0,567
Cr	3,04	4,25	5,14	3,88	4,08 ± 0,434
Cd	0,11	0,17	0,20	0,25	0,18 ± 0,030
Pb	16,01	19,42*	19,41*	19,02*	18,47 ± 0,824
Mn	296,00	306,18	342,75	291,31	309,10 ± 11,7
Fe	10653,76	12230,09	12417,23	12031,46	11833,00 ± 401
Co	5,23	5,84	5,25	4,62	5,24 ± 0,249
Cu	12,09	14,53	12,41	17,78	14,21 ± 1,31
Zn	53,58	62,27	69,54	73,46	64,72 ± 4,37
Ni	4,05	5,35	6,51	3,38	4,82 ± 0,695

*: (Turekian ve Wedepohl 1961)'un bildirdiğine göre sınırdaki değerler

Tablo 2. *C. banareusci* bireylerinin dokularındaki mevsimsel ağır metal ve metalloid konsantrasyonları (µg/g) (E.M.: Eser miktarda; L.D.A: Limit değerin altında) (Ort.±S.H.)**Table 2.** Seasonal heavy metal and metalloid concentrations in the tissues of *C. banareusci* individuals (µg/g) (E.M.: Trace amount; L.D.A: below limit value) (Avg. ± S.E.)

Element	Mevsim	Kas	Karaciğer	Solungaç
Al	İlkbahar	1,75 ± 0,180	15,80 ± 5,300	2,88 ± 0,474
Cr		0,35 ± 0,076	0,47 ± 0,201	0,33 ± 0,047
As		0,39 ± 0,046*	1,35 ± 0,482	0,77 ± 0,041
Cd		0,02 ± 0,006	0,05 ± 0,018	0,08 ± 0,033
Pb		0,12 ± 0,009**	1,42 ± 0,663	0,69 ± 0,120
Mn		0,78 ± 0,094	2,27 ± 0,822	8,52 ± 2,390
Fe		28,11 ± 1,830	195,00 ± 73,400	155,60 ± 42,900
Co		E.M.	0,02 ± 0,007	0,03 ± 0,005
Cu		0,48 ± 0,036	3,02 ± 1,000	2,50 ± 1,180
Zn		15,23 ± 4,830	28,80 ± 12,000	26,70 ± 5,670
Ni	0,16 ± 0,034	1,07 ± 0,354	0,31 ± 0,038	
Al	Yaz	1,32 ± 0,216	11,71 ± 5,340	10,41 ± 5,630
Cr		0,21 ± 0,069	0,66 ± 0,458	0,18 ± 0,061
As		0,47 ± 0,117*	1,66 ± 0,514	0,79 ± 0,163
Cd		E.M.	0,02 ± 0,005	E.M.
Pb		0,13 ± 0,027**	0,44 ± 0,078	0,60 ± 0,231
Mn		1,27 ± 0,408	4,94 ± 1,190	6,21 ± 2,930
Fe		39,90 ± 17,700	163,20 ± 54,100	99,50 ± 40,500
Co		E.M.	0,03 ± 0,008	0,02 ± 0,011
Cu		0,44 ± 0,091	2,54 ± 0,601	0,61 ± 0,137
Zn		10,23 ± 2,900	16,61 ± 4,720	11,42 ± 3,250
Ni	0,14 ± 0,044	0,54 ± 0,174	0,18 ± 0,063	
Al	Sonbahar	8,82 ± 5,630	6,01 ± 1,410	16,60 ± 9,780
Cr		0,52 ± 0,115	0,78 ± 0,114	0,60 ± 0,109
As		1,32 ± 0,386*	2,08 ± 0,457	2,32 ± 0,526
Cd		0,01 ± 0,008	0,10 ± 0,045	0,04 ± 0,014
Pb		1,53 ± 1,290**	0,79 ± 0,122	0,95 ± 0,218
Mn		4,07 ± 2,620**/**	13,18 ± 2,720	14,83 ± 4,790
Fe		74,60 ± 42,900	519 ± 314	248,80 ± 82,200
Co		0,02 ± 0,010	0,09 ± 0,016	0,07 ± 0,029
Cu		0,77 ± 0,294	3,93 ± 0,513	1,16 ± 0,348
Zn		11,40 ± 3,710	31,19 ± 2,110	34,80 ± 9,740
Ni	0,31 ± 0,205	0,81 ± 0,276	0,56 ± 0,103	
Al	Kış	10,92 ± 4,11	10,16 ± 1,68	17,95 ± 2,96
Cr		0,27 ± 0,02	0,47 ± 0,04	0,63 ± 0,10
As		0,99 ± 0,07*	1,05 ± 0,18	2,70 ± 0,45
Cd		E.M.	0,04 ± 0,007	0,03 ± 0,011
Pb		0,49 ± 0,176**	0,77 ± 0,361	1,34 ± 0,129
Mn		4,67 ± 1,53**/**	5,51 ± 1,02	14,83 ± 1,20
Fe		70,40 ± 22,80	193,90 ± 14,60	218,30 ± 14,90
Co		0,02 ± 0,004	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,003
Cu		0,43 ± 0,03	3,27 ± 0,21	1,25 ± 0,21
Zn		10,82 ± 1,91	41,90 ± 15,30	27,35 ± 3,67
Ni	0,19 ± 0,06	1,37 ± 0,26	0,57 ± 0,07	

* limit değerin üzerindedir (*FAO 1983; **IAEA 2003; *** WHO 1989 / TGK 2002 / EC 2008).

C. banareusci bireylerinde comet testi parametrelerinin sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. DNA hasarının miktarını yansıtan kuyruk boyu değerleri ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla 21,03 ± 1,19 µm; 21,40 ± 1,07 µm; 20,47 ± 1,30 µm ve 9,02 ± 1,65 µm olarak tespit edilmiştir. İlkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde DNA hasarının kış mevsimine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0,05). %DNA_T

değeri kış mevsiminde 11,51 ± 1,51 olarak belirlenirken, ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimleri için sırasıyla 29,91 ± 2,17; 34,04 ± 2,16 ve 29,40 ± 2,01 olarak hesaplanmıştır. DNA hasarının bir diğer göstergesi olan %DNA_T değeri de ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerindeki DNA hasarının kış mevsimine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (P<0,05) (Tablo 3).

MN testi verileri ile comet testi parametreleri arasında pozitif korelasyon belirlenmiş olup, korelasyon değerleri sırasıyla MN frekansı-kuyruktaki %DNA arasında 0,97; MN frekansı-kuyruk boyu arasında 0,96; MN frekansı-kuyruk yoğunluğu arasında 0,83 ve MN frekansı-kuyruk momenti arasında 0,85 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada suda yüksek konsantrasyonda tespit

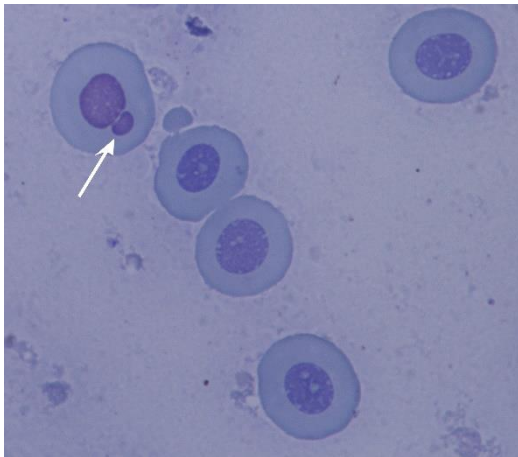
edilen Al, As ve Cr elementlerinin MN frekansı ve comet testi parametreleri ile arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir. Sedimentteki Al ve As konsantrasyonu ile MN frekansı ve comet testi parametreleriyle arasındaki korelasyon sudakinden daha yüksek olmasına rağmen, Cr elementi için bu korelasyon değeri daha düşük olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. *C. banarescui* bireylerinin eritrosit hücrelerindeki MN frekansı ve değerlendirilen comet testi parametrelerinin değerleri (Ort.±S.H.)

Table 3. MN frequency in erythrocyte cells of *C. banarescui* individuals and values of evaluated comet test parameters (Avg. ± S.E.)

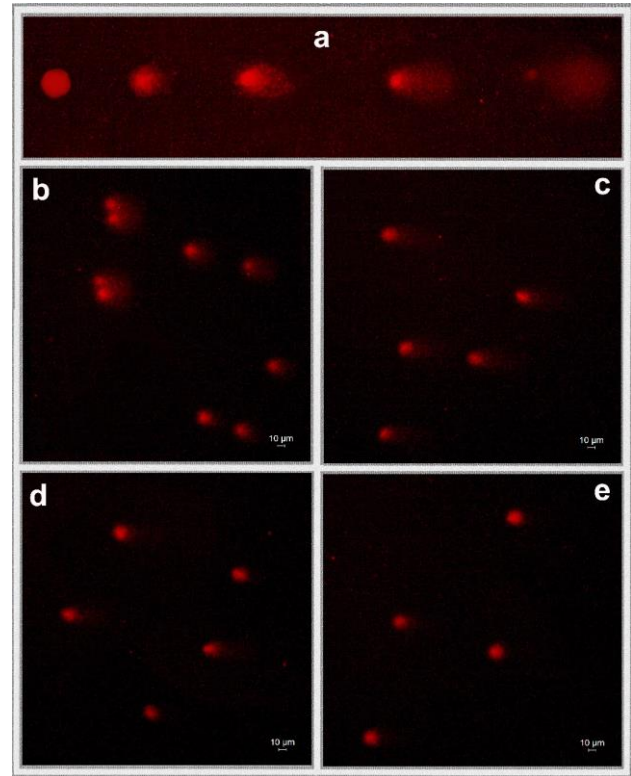
	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	
MN Frekansı (%)	2,10 ^a ± 0,579	2,20 ^a ± 0,682	1,60 ^a ± 0,660	0,40 ^a ± 0,292	P>0,05
Kuyruk Boyu (µm)	21,03^a ± 1,19	21,40^a ± 1,07	20,47^a ± 1,30	9,02 ^{b*} ± 1,65	P<0,05
Kuyruk Yoğunluğu (%)	26,63 ^a ± 1,78	26,34 ^a ± 2,13	21,23 ^a ± 1,96	20,73 ^a ± 2,63	P>0,05
Kuyruktaki % DNA	29,91^a ± 2,17	34,04^a ± 2,16	29,40^a ± 2,01	11,51 ^{b*} ± 1,51	P<0,05
Kuyruk Momenti	0,310 ^a ± 0,034	0,347 ^a ± 0,035	0,291 ^a ± 0,029	0,271 ^a ± 0,053	P>0,05

C. banarescui örneklerinin eritrosit hücrelerinde oluşan DNA hasarlarını tespit etmek üzere hazırlanan preparatlar, floresan mikroskop altında değerlendirilmiştir. İncelemeler esnasında, floresan mikroskop altında gözlemlenen ve hasarsız olarak nitelendirilen hücrelerin ortasının parlak ve kenarlarının daha az yoğun olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerde oluşan DNA hasarının derecesine bağlı olarak ise kuyruk oluşumları göze çarpmaktadır. İncelenen preparatlarda gözlemlenen ve ölçümleri alınan eritrosit hücrelerinin istasyonlara göre mevsimsel değişimleri Şekil 2b-e’de sunulmuştur.



Şekil 1. Eritrosit hücrelerindeki mikronükleus oluşumu (Kontaş 2018’den düzenlenmiştir)

Figure 1. Micronucleus formation in erythrocyte cells (edited from Kontaş 2018)



Şekil 2. Farklı derecelerde etkilenen eritrosit hücrelerinin comet analizi (a) ve genel görüntüsü (b; ilkbahar, c; yaz, d; sonbahar, e; kış) (Kontaş 2018’den düzenlenmiştir)

Figure 2. Comet analysis (a) and general view (b; spring, c; summer, d; autumn, e; winter) of erythrocyte cells affected at different degrees (edited from Kontaş 2018)

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma, Yukarı Melet Havzasının su, sediment ve havzada yaşayan *C. banarescui* türünün kas, solungaç ve karaciğer dokularındaki ağır metal birikimine bağlı olarak ortaya çıkan genotoksik hasarın belirlenmesi üzerine yapılmış ilk çalışmadır. Organizmanın genetik materyali olan DNA'da hasarlara yol açabilecek ağır metaller gibi ajanlar, DNA molekülünün yapısında veya fonksiyonunda değişiklikler meydana getirirler ve farklı seviyelerde etkiler oluşturarak sitogenetik değişiklikler oluştururlar. Bununla beraber, ağır metaller, nehir suyunun fiziko-kimyasal dengesini de bozmaktadır. Bu çalışmada genel olarak suda As, Al, Fe ve sedimentte Pb elementlerinin birikimlerine bağlı olarak balıkların kas dokusunda As ve Pb'un tüm mevsimlerde limit değerleri aştığı, solungaç ve karaciğerlerinde ise belli konsantrasyonlarda birikim gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 1,2). As elementi canlılar için esansiyel olmayan bir metalloid olup toksik özelliğe sahiptir. Arsenik elementinin muhtemel toksik etkisi mikronükleus ve comet testlerinin sonuçları ile ortaya konmuştur. Balıkların eritrosit hücrelerinde gözlemlenen MN oluşumlarının (Şekil 1) ve MN frekanslarındaki değişimlerin (Tablo 3), benzer şekilde comet testi parametreleriyle tespit edilen (Tablo 3), DNA kırıklarının bir sonucu olarak eritrosit hücrelerinde meydana gelen kuyruk oluşumlarının (Şekil 2b-e), mevsimsel olarak değişen konsantrasyonlardaki metalloid ve ağır metallerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. DNA hasarının büyüklüğüne bağlı olarak, kuyruktaki DNA miktarı ve yoğunluğu değişmektedir. Bu durum, hücrede oluşan kuyruğun uzunluğu ve kuyruktaki % DNA miktarı değerleriyle ortaya konulmuştur (Tablo 3). Comet testi parametrelerinin sonuçlarına benzer şekilde MN frekansı sonuçları da ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimlerinde, kış mevsimine göre daha yüksek değerlere sahiptir. MN testi verileri ile comet testi parametreleri arasında kuvvetli bir pozitif korelasyonun varlığı da saptanmıştır. Bu durum genotoksisite testlerinden elde edilen verilerin birbiri ile desteklediğini göstermektedir.

Su sıcaklığının ilkbahar ve yaz mevsimlerinde daha yüksek olması, sudaki metalloid ve ağır metal konsantrasyonlarıyla beraber hücreyi etkilemiş olabilir. Genel olarak ağır metallerin yüksek sıcaklık değerlerinde daha toksik etki gösterdiği kabul edilmektedir (Ergönül ve Altındağ 2011). Ayrıca, yaz mevsiminde As, hem suda hem de kas dokusunda yüksek değerdedir. Eritrosit hücresindeki kuyruk boyu, kuyruktaki % DNA miktarı ve kuyruk momenti değerleri yaz mevsiminde diğer mevsimlere göre daha yüksek hesaplanmıştır (Tablo 3).

Suda ilkbaharda Al ve Fe, yaz mevsiminde As ve Fe, sonbahar mevsiminde ise Al, As ve Fe belirtilen limit değerlerin üzerindedir (Tablo 1). Sonbahar mevsiminde metalloid ve ağır metal yükü daha fazla olsa da ilkbahar mevsiminde belirlenen MN frekansının sonbahar mevsimine göre daha yüksek bulunmasının sebebi, su sıcaklığındaki artışın yanında pestisit kullanımının bu mevsimde yoğunlaşmasıyla açıklanabilir. Bu etkenler muhtemel genotoksik etkiyi yükseltmiş olabilir. Pestisitlerin bakır (Cu), arsenik (As), kurşun (Pb), mangan (Mn) ve çinko (Zn) elementleri için kaynak oluşturduğu ve sucül çevrede kontaminasyona yol açtığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Aonghusa ve Gray 2002; Summak 2009). Tüm bu sonuçlar, Yukarı Melet Havzasının, taşıdığı ağır metal yüküne bağlı olarak, genotoksik bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ağır metallerle kontamine olmuş sulara maruz kalmış sucül organizmalar üzerinde yapılan diğer genotoksik çalışmalarda da ağır metallerin sebep olduğu DNA hasarı bildirilmiştir (Vargas vd. 2001; Matsumoto vd. 2006; Barbosa vd. 2009; Yadav ve Trivedi 2009).

Okuşluk (2008) Mogan Gölü'nde yaşayan *Cyprinus carpio* bireylerinde tespit ettiği bazı comet testi parametrelerinin (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) sonuçlarını, kontrol grubu bireyleriyle karşılaştırdığında ağır metal etkisi altındaki su sisteminde yaşayan bireylerin eritrosit hücrelerinde genotoksik hasarın arttığını belirtmiştir ($P < 0,05$). Yukarı Melet Havzasında yaşayan *C. banarescui* türü için mevsimsel olarak değişen ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak, ilkbahar (21,03 μm), yaz (21,40 μm) ve sonbahar (20,47 μm) mevsimlerindeki DNA hasarının artışı kuyruk boyu ve kuyruktaki %DNA değerleri ile ortaya konmuş ve kış mevsiminde DNA hasarının daha az olduğu bulunmuştur ($P < 0,05$). Metalloid ve ağır metal kontaminasyonu ile ilgili olarak yapılmış önceki çalışmalar, Yukarı Melet Havzasında yaşayan *C. banarescui* bireylerinin eritrosit hücrelerinde hesaplanan MN frekansı ve comet testi parametreleri sonuçları bakımından bulgularımızı destekler niteliktedir. Karasu Nehri (Erzurum)'nde yapılan çalışmada, özellikle ağır metal bakımından daha kirli olan istasyonlarda genotoksik hasarın arttığı bildirilmiştir. *Leuciscus cephalus*, *Capoeta capoeta*, *Gobius niger*, *Salmo trutta* türlerinde su kirliliğinin genotoksik etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada (Yazıcı 2012), mikronükleus frekansında artış başta olmak üzere, hücre çekirdeğinde meydana gelen morfolojik bozuklukları da genotoksisite göstergeleri olarak değerlendirmiştir.

Yukarı Melet Havzası, doğal ve antropojenik kaynaklardan gelen bir ağır metal kirliliği baskısı

altındadır. Havza üzerinde etkisi olan tüm antropojenik, tarımsal, doğal ve yapay etkiler hem ırmağın doğal yapısını hem de suyun kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan bu çalışmada da bu etkinin varlığı genotoksisite testleriyle ortaya konmuştur. Araştırma bulguları, çevresel kirleticilerin sebep olduğu kontaminasyonun sonuçlarını görmeye hassas parametreler olarak kullanılan comet ve mikronükleus testlerinin önemini vurgulamaktadır. Melet Irmağı Ordu ili için ana içme suyu kaynağıdır. Bu nedenle, su kaynağının korunması ve devamlılığı için, fındık tarımında kullanılan pestisitler, evsel atıklar ve diğer kirletici kaynakların çevreye bırakılmasıyla ilgili olarak halkın bilinçlendirilmesi gereklilik arz etmektedir. Yukarı Melet Havzasında yaşayan *C. banarensis* bireylerinde tespit edilen genotoksik etkilerin varlığı düşünüldüğünde, ileride yapılacak çalışmaların kapsam ve yöntemlerinin de yukarıdaki durumlar göz önünde bulundurularak geliştirilmesi ve uygulanması, daha kuvvetli veriler elde edilmesi bakımından önem arz etmektedir.

Teşekkür

Numunelerin toplanması ve laboratuvar çalışmaları süresince gerekli olan Etik Kurulu İzni (Sayı: 82678388/15, 11.02.2015) Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, araştırma izni (Sayı: 67852565-140.03.03.1001, 27.04.2015) ise Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan, örnekleme ve laboratuvar çalışmalarına başlanmadan önce ilgili birimlere müracaat edilerek alınmıştır. Bu çalışma Seda KONTAŞ'ın Doktora tezinin bir bölümünü temel almaktadır. Sorumlu yazar, çalışmayı destekleyen Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (BAP; TF-1612) ve doktora bursiyeri olarak 2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında kendisini destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür eder.

Kaynaklar

- Anonim 2011. Ordu çevre durum raporu. Ordu: T.C. Ordu Valiliği Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü, Ordu, 209s.
- Anonim 2016. Ordu ili 2015 yılı çevre durum raporu. Ordu: Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü, Çed ve Çevre İzinleri Şube Müdürlüğü 135s.
- Aonghusa, NC, Gray NF. 2002. Laundry detergents as source of heavy metals in Irish domestic wastewater. *J Environ Sci Heal A*. 37(1):1-6.
doi: 10.1081/ESE-100108477
- Barbosa JS, Cabral TM, Ferreira DN, Agnezlina LF, Batistuzzo De Medeiros SR. 2009. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotox Environ Safe*. 73(3):320-325.
doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.10.008
- Boettcher M, Grunda S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheidb G, Seitz N, Rochaa PS, Hollert H,

- Braunbeck T. 2010. Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res-Gen Tox En*. 700(1-2):11-17.
doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.04.016
- Ciftci H, Dayangac A, Ozkaya A, Cevrimli BS, Erdag R, Olcucu A, Ates S. 2011. Multi-element determination of macro and trace elements in kidney of DMBA and linalool applied guinea pigs by inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Fresen Environ Bull*. 20(3A):818-822.
- Çavaş T. 2011. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem Toxicol*. 49(6):1431-1435.
doi: 10.1016/j.fct.2011.03.038
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*. 25(1):5-32.
doi: 10.1007/s10565-008-9072-z
- Dural M, Göksu MZL. 2006. Çamlık lagünü (Karataş, Adana), seston, bentoz ve sedimentinde mevsimsel ağır metal değişimi. *EgeJFAS*. 23(1):65-69.
- EC 2008. Commission Regulation (EC) No 629/2008 of 2 July 2008 amending regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L173, 0006-0009.
- Ergönül MB, Altındağ A. 2011. Çinko ve bakırın kadife balığı (*Tinca tinca* L., 1758) için akut toksisitesinin belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bil Derg*. 14(3):19-24.
- Factori R, Leles SM, Novakowski GC, Rocha CLSC, Thomaz, SM. 2014. Toxicity and genotoxicity of water and sediment from streams on dotted duckweed (*Landoltia punctata*). *Braz J Biol*. 74(4):769-778.
doi: 10.1590/1519-6984.01013
- FAO (Food and Agriculture Organization) 1983. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. *FAO Fishery Circulars No:764*, Fish and Agriculture Organization, Roma, Italy.
- Güner U, Gökalp Muranlı FD. 2013. Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay). *Karadeniz Fen Bil Derg*, 3(9):103-114.
- IAEA (International Atomic Energy Agency) 2003. World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in fish homogenate international atomic energy agency - 407 Report No: IAEA/AL/144 IAEA/MEL/72.
- Klobučar GIV, Stambuk A, Pavlica M, Peric MS, Kutuzovic B, Hylland HK. 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*. 19(1):77-84.
doi: 10.1007/s10646-009-0390-6
- Kontaş S. 2018. Melet ırmağı su, sediment ve bazı balık türlerinde ağır metal birikimi ve genotoksik etkilerinin araştırılması [Doktora Tezi]. Ordu Üniversitesi. 256 s.
- Mansour SA, Sidky MM. 2002. Ecotoxicological studies. 3. heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chem*. 78(1):15-22.
doi: 10.1016/S0308-8146(01)00197-2

- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malaguttii MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol.* 29(1):148-158.
doi: [10.1590/S1415-47572006000100028](https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028)
- Okuşluk Ö. 2008. Mogan Gölü'ndeki olası kirlenmenin sazan balıklarında (*Cyprinus carpio* L.) comet testi kullanılarak araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Gazi Üniversitesi. 93 s.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1):184-191.
doi: [10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- SKKY 2004. Su kirliliği kontrolü yönetmeliği. Çevre ve Orman Bakanlığı, Resmi Gazete Tarihi: 31.12.2004, Resmi Gazete Sayısı: 25687, Ankara.
- Summak Ş. 2009. Bursa Nilüfer Çayı suyunun genotoksik etkilerinin balık mikronukleus testi ile değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Uludağ Üniversitesi. 48 s.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi) 2002. Gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğ, türk gıda kodeksi yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Resmi Gazete (23 Eylül 2002), Sayı: 24885.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35(3):206-221.
doi: [10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j)
- Toroğlu E, Toroğlu S, Alaeddinoğlu F. 2006. Aksu Çayı'nda (Kahraman Maraş) akarsu kirliliği. *Coğrafi Bil Derg.* 4(1):93-103.
- Turekian KK, Wedepohl KH. 1961. Distribution of the elements in some major units of the Earth's Crust. *Geol Soc Am Bull.* 72(2):175-191.
- Vargas VMF, Migliavacca SB, Melo AC, Horn RC, Guidobono RR, Ferreira ICFS, Pestana MHD. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res-Gen Tox En.* 490(2):141-158.
doi: [10.1016/s1383-5718\(00\)00159-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00159-5)
- WHO (World Health Organization) 1989. National research council recommended dietary 626 Allowances 10th ed. National Academy Press., Washington, DC. USA.
- Yadav KK, Trivedi SP. 2009. Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals. *Mutat Res-Gen Tox En.* 678(1):7-12.
doi: [10.1016/j.mrgentox.2009.05.021](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.021)
- Yazıcı Z. 2012. Karasu Nehri'nde (Erzurum) yaşayan bazı balık türleri üzerine su kirliliğinin sitogenetik etkileri [Yüksek Lisans Tezi]. Atatürk Üniversitesi. 96 s.
- Yazıcı Z, Şişman T. 2015. Karasu Nehri'ndeki su kirliliğinin *Barbus plebejus*'daki genotoksik etkileri. *Yunus Araştırma Bülteni.* 15(2):9-16.
- YSKY 2012. Yerüstü su kalitesi yönetmeliği. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Resmi Gazete Tarihi: 10.08.2016, Resmi Gazete Sayısı: 29797, Ankara.
- Zhuang P, Li ZA, Wang G, Zou B. 2013. Concentration of heavy metals in fish from a mine-affected area and potential health risk. *Fresen Environ Bull.* 22(8):2402-2408.