

Ağır Metal Varlığında *Vimba vimba* Bireylerindeki Genotoksik Hasarın TespitiSeda KONTAŞ^{1*}, Derya BOSTANCI²

ÖZET: Kıranyağmur bölgesinden mevsimsel olarak örneklenen su, sediment ve *Vimba vimba* bireylerinin kas, solungaç ve karaciğer dokularında kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), arsenik (As), alüminyum (Al), nikel (Ni), krom (Cr), demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu), mangan (Mn), kobalt (Co) konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu çalışmada, comet assay parametreleri ve mikronükleus (MN) testinden yararlanılarak varlığı belirlenen elementlerin genotoksik potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Suda Al, As, Fe ve balıkların kas dokusunda As, Pb, Mn bazı mevsimlerde yüksek bulunmuştur. Eritrositlerdeki MN frekansı yaz, kış, sonbahar ve ilkbahar mevsimlerinde sırasıyla %5.20, %1.80 %1.40 ve %1.10 olarak tespit edilmiştir (P<0.05). Comet assay parametrelerinin sonuçlarına göre, eritrosit hücrelerindeki DNA hasarına bağlı olarak oluşan kuyruk boyu değerleri yaz, ilkbahar, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla 26.32 µm, 25.12 µm, 22.16 µm ve 17.78 µm olarak tespit edilmiştir. Yaz, ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde DNA hasarı kış mevsimine göre daha yüksektir (P<0.05). Baştaki %DNA ve kuyruktaki %DNA değerleri de kuyruk boyu değerlerini desteklemektedir (P<0.05). Bu çalışmada, Kıranyağmur bölgesinde yaşayan *V. vimba* türünde ilk kez bir genotoksisite değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Araştırma bulguları, Kıranyağmur bölgesinin özellikle suyunun *V. vimba* türü üzerinde genotoksik bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: *Vimba vimba*, comet assay, DNA hasarı, mikronükleus testi, genotoksisite

Determination of Genotoxic Damage for *Vimba Vimba* in the Presence of Heavy Metals

ABSTRACT: The concentration of cadmium (Cd), lead (Pb), arsenic (As), aluminium (Al), nickel (Ni), chrome (Cr), iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), cobalt (Co) were determined in water, sediment and muscle, gill and liver tissues of *Vimba vimba* which were seasonally sampled from the Kıranyağmur region. In this study, it was aimed to investigate the genotoxic potential of the determined elements by using micronucleus (MN) test and comet assay parameters. Al, As, Fe in water and As, Pb, Mn in muscle were found high concentration in some seasons. MN frequency in erythrocytes was determined in summer, winter, autumn, and spring seasons as % 5.20, % 1.80, % 1.40 and % 1.10, respectively (P<0.05). According to the results of comet assay parameters, tail length values which occurred due to DNA damage in erythrocyte cells were determined in the summer, spring, autumn and winter as 26.32 µm, 25.12 µm, 22.16 µm and 17.78 µm, respectively. DNA damage in summer, spring and autumn is higher than in winter (P<0.05). Also, the % DNA in head and the % DNA in tail supported the tail length values (P<0.05). In this study, a genotoxicity assessment was performed for the first time in *V. vimba* inhabiting Kıranyağmur region. The research findings revealed that especially the water of Kıranyağmur region had a genotoxic potential on *V. vimba* specimens.

Keywords: *Vimba vimba*, comet assay, DNA damage, micronucleus test, genotoxicity

¹ Seda KONTAŞ (Orcid ID: 0000-0002-6582-6722) Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü, Ordu, Türkiye

² Derya BOSTANCI (Orcid ID: 0000-0003-3052-9805) Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Seda KONTAŞ, e-mail: sedakontas@gmail.com

Geliş tarihi / Received: 21/02/2020

Kabul tarihi / Accepted: 26/03/2020

GİRİŞ

Ağır metallerin sebep olduğu su kirliliği, günümüzde ciddi bir sorun halini almıştır. Su ortamı, ağır metallerden kaynaklı kirliliğe karşı daha duyarlıdır, çünkü içerisinde yaşayan organizmalar, ortamda var olan ağır metallerle yakın ve yoğun bir etkileşim içindedir. Sudaki metal kirliliğinin genotoksik etkilerini anlayabilmemiz için, balıklar sucul ekosistemlerdeki en önemli indikatörlerden biri olarak değerlendirilebilir (Zhuang ve ark., 2013; Yılmaz ve ark., 2016). Ağır metallerin balıklardaki birikimi ve gösterdikleri toksik etkiler, organizmadan organizmaya da farklılıklar göstermektedir (Cicik, 2003). Ağır metaller kirliliği ortamda birlikte ve birbirleriyle etkileşimde bulunurlar. Dolayısıyla, balıklardaki birikimleri ve toksik etkileri ağır metalin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu sebeple, karışım halindeki metallerin su ve sedimentteki derişimlerinin canlılar üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi önemli ve gereklidir. Kirleticilerin birçoğu toksik özelliktedir ve bazı kirleticiler kromatin metabolizmasındaki dengenin değişmesine yol açarak genomik kararlılığın kaybolmasına neden olabilir. Kirleticilerin bu özellikte olanları genotoksikler olarak sınıflandırılır (Marple ve ark., 2004; Barlow ve ark., 2006; Factori ve ark., 2014).

Kanserojen ve mutajenik özelliğe sahip farklı kirleticiler, organizmaların DNA'larında artan miktarlarda tek dizi kırıklarının meydana gelmesine yol açarlar (Mitchellmore ve Chipman, 1998). DNA dizi kırıklarının miktarını tespit etmede yararlanılan comet assay (tek hücre jel elektroforezi), genetik toksikoloji ve biyoizleme alanlarındaki çalışmalarda, farklı türde DNA hasarları ve bunların tamirlerinin değerlendirmesinde kullanışlı ve yararlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (de Andrade ve ark., 2004; Cornetta ve ark., 2008). Çevresel genotoksinlerin canlı üzerindeki toksik etkileri hem *in vivo* hem de *in vitro* biyobelirteç yöntemlerinden faydalanılarak izlenebilmektedir. Bununla beraber comet assay, çalışmanın kısa sürede tamamlanabilmesi (Güner ve Gökalp Muranlı 2013), sitogenetik etkileri ve DNA hasarlarını saptamadaki hızı ve hassasiyetinden dolayı, günümüzde akuatik toksisite çalışmalarında diğer yöntemlerin üzerinde bir popülerite kazanmıştır (Tice ve ark., 2000). Mikronükleus (MN) testi ise, hücrenin hayatta kaldığı süre içerisinde oluşan bir dizi genetik hasarın, kompleks karışımlar halinde bulunan kirleticilere karşı bütüncül yanıtını tespit etmek için kullanılan uygun tekniklerden biridir (Kammann ve ark., 2004). Fiziksel ve kimyasal ajanlar yoluyla tetiklenen sitogenetik hasarları belirlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Udroiu, 2006).

Bu çalışmanın temel amacı, Kıranyağmur bölgesindeki su, sediment ve *V. vimba* türünün kas, solungaç ve karaciğerindeki metalloid ve ağır metal birikiminin tespiti ve bu elementlerin *V. vimba* bireylerinde DNA'da meydana getirebileceği hücre düzeyinde genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırılmasıdır. *V. vimba* bireylerinin eritrositlerinden faydalanılarak bazı comet assay parametreleri ve mikronükleus oluşumlarının tespiti yardımıyla ırmak suyu ve sedimentindeki elementlerin genotoksik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Eritrosit hücrelerinde oluşan genetik değişiklikler genotoksik birer belirteçtir. Dolayısıyla, Melet Irmağı'nın Ordu ili içme suyu kaynağı olarak kullanılması göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmanın sonuçlarının önemi tartışılmazdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Ordu ilinde hem içme hem de sulama suyu kaynağı olarak kullanılan ve önemli akarsularından biri olan Melet Irmağı, jeolojik konumu itibarıyla maden yataklarınca zengin bir bölgededir. Irmak havzasında özellikle kurşun (Pb), bakır (Cu), çinko (Zn), altın (Au), gümüş (Ag), mangan (Mn) ve demir (Fe) maden yatakları dikkat çekmektedir (Anonim, 2011). Numunelerin örneklemelerine ve laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce ilgili birimlere müracaat edilmiş ve çalışmalar süresince gerekli olan Etik Kurulu İzni (Sayı: 82678388/15, 11.02.2015) Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan, araştırma izni (Sayı: 67852565-140.03.03.1001, 27.04.2015) ise Tarım ve Orman

Bakanlığı'ndan alınmıştır. Bu çalışmada, Melet Irmağı üzerinde yer alan Topçam Barajı'nın aşağı bölümünde yer alan Kıranyağmur bölgesinin ağır metal konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla, farklı bölgelerden Ocak 2015 - Aralık 2016 tarihleri arasında mevsimsel olarak su, sediment ve 35 adet *Vimba vimba* bireyi örneklenmiştir. Örnekleme bölgesinin etrafında fındık bahçeleri ve yerleşim alanları bulunmaktadır. Bu nedenle, pestisitlerden, deterjanlardan ve diğer maddelerden gelen kimyasal bir girdinin etkisi altındadır.

Suyun fiziko-kimyasal parametrelerinin tespiti için pH, sıcaklık (°C), çözünmüş oksijen (ÇO) (mg L⁻¹), oksijen doymunluğu (OD) (%), iletkenlik (µs cm⁻¹), tuzluluk (%), toplam çözünmüş katı madde miktarı (TDS) (mg L⁻¹) ve direnç (kΩ.cm) değerleri çoklu ölçüm cihazı ile yerinde ölçülüp kaydedilmiştir. Su örnekleri aynı gün içerisinde laboratuvara getirilmiş, nitrat (mg L⁻¹), nitrit (mg L⁻¹), fosfat (mg L⁻¹) ve sülfat (mg L⁻¹) seviyeleri spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir.

Metalloid ve ağır metal konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, belirlenen bölgeden polietilen şişelere su numuneleri alınmıştır. Su numunelerinin element konsantrasyonları Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği ve Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde belirtilen element konsantrasyonu değerleriyle karşılaştırılmıştır (SKKY, 2004; YSKY, 2012). Aynı bölgelerden ırmağın dip kısmından alınan sediment örnekleri sabit ağırlığa gelene kadar 105 °C'de kurutulmuş sonrasında 0.5 µm'lik elek yardımıyla elenmiştir. Sediment örneklerinden yaklaşık olarak 0.5 g'lık numuneler alınarak prosedürlere uygun şekilde ağır metal analizine hazır hale getirilmiştir (Dural ve Göksu, 2006). Sediment numunelerinin metalloid ve ağır metal konsantrasyonları yer kabuğu içeriğindeki element konsantrasyonlarının değerleriyle karşılaştırılmıştır (Turekian ve Wedepohl, 1961). *Vimba vimba* bireylerine ait kas, solungaç, karaciğer dokularından yaklaşık olarak 0.5 g'lık örnekler alınarak prosedürlere uygun olarak ağır metal analizine hazır hale getirilmiştir (Ciftci ve ark., 2011). Balıkların kas dokusundaki element 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 maksimum kabul edilir değerlerle karşılaştırılmıştır. Su, sediment ve doku örneklerindeki Cd, Pb, As, Al, Ni, Cr, Fe, Zn, Cu, Mn, Co içeriklerinin analizleri, GRÜMLAB'nda Bruker 820-MS model ICP-MS Spektrometresi ile belirlenmiştir.

Su, sediment ve dokularda varlığı tespit edilen elementlerin *V. vimba* bireylerinin eritrositleri üzerindeki olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla mikronükleus testi ve comet assay parametrelerinden yararlanılmıştır. Genotoksisite analizleri için her mevsimde laboratuvara canlı olarak getirilen 5 birey kullanılmıştır. Müdahale öncesinde heparinize edilmiş şırıngalar yardımıyla her bir bireyin doğrudan kalbinden kan numuneleri alınmış ve diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Comet assay alkali koşullarda (pH>13.0) Singh ve ark. (1988)'nin bildirdiği prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır (Tice ve ark., 2000). Hazırlanan preparatların boyanması amacıyla Etidyum bromür kullanılmış ve incelemeler floresan mikroskobunda (Leica) TXR filtresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Comet assay parametrelerinin (kuyruk boyu (µm), kuyruktaki % DNA miktarı (% DNA_T), kuyruk momenti, ortalama kuyruk yoğunluğu (%), baştaki % DNA miktarı (% DNA_H) ve ortalama baş yoğunluğu (%)) değerleri TriTek CometScore 2.0 yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır. Her birey için 100 eritrosit hücresi değerlendirilmiştir. Mikronükleus testi için her bir bireyden bir damla kan mikroskop lamı üzerine damlatılarak derhal ince bir tabaka halinde yayma preparat hazırlanmıştır. Yayılan kan tabakası kuruduktan sonra, lamlar 20 dakika etanol içerisinde bekletilmiş ve daha sonra Giemsa solüsyonu (%5) ile boyanması sağlanmıştır. Her birey için 2000 eritrosit hücresi sayılmıştır (Boettcher ve ark., 2010).

Suyun fiziko-kimyasal parametrelerinin, su, sediment ve *V. vimba* bireylerinin dokularındaki element seviyelerinin, MN testi ve comet assay verilerinin mevsimsel ve yıllık değerlerine ait tanımlayıcı

istatistikleri hesaplanmıştır. Mevsimler arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel testlerin uygulanmasında MİNİTAB 16 paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma, Melet Irmağı üzerinde yer alan Kıranyağmur bölgesinin su, sediment ve havzadan örneklenen *V. vimba* (n=35) türünün kas, solungaç ve karaciğer dokularındaki metalloid ve ağır metal birikimine bağlı olarak eritrosit hücrelerinde ortaya çıkan genotoksik hasarın tespitinin gerçekleştirildiği ilk çalışmadır. *V. vimba* bireylerinin eritrositlerindeki hücre çekirdeklerinde genotoksik hasarla ortaya çıkan mikronükleus oluşumları MN testi ve DNA kırıkları ise comet assay ile mevsimsel olarak belirlenmiştir. *V. vimba* bireylerinin boy ve ağırlıkları sırasıyla 10.84 ± 0.208 - 11.58 ± 0.106 cm ve 11.79 ± 0.750 - 14.29 ± 1.230 g değerleri arasındadır.

Suyun fiziko-kimyasal parametreleri ile su ve sedimentin metalloid ve ağır metal konsantrasyonlarının sonuçları Çizelge 1'de sunulmuştur. Belirtilen yönetmeliklere göre değerlendirildiğinde, su örneklerinde Al yaz ($30.185 \mu\text{g L}^{-1}$), sonbahar ($49.967 \mu\text{g L}^{-1}$) ve kış ($240.322 \mu\text{g L}^{-1}$) mevsimlerinde; As ilkbahar ($20.945 \mu\text{g L}^{-1}$), sonbahar ($20.398 \mu\text{g L}^{-1}$) ve kış ($20.035 \mu\text{g L}^{-1}$) mevsimlerinde; Fe ise tüm mevsimlerde belirtilen yönetmeliklerdeki değerlerin üzerinde bulunmuştur. Sedimentte tespit edilen element değerleri ise yer kabuğu değerlerine göre limitlerin üzerinde değildir (Çizelge 1).

V. vimba bireylerinin kas, solungaç ve karaciğerlerindeki metalloid ve ağır metal miktarları mevsimsel olarak Çizelge 2'de sunulmuştur. Kas dokusunda belirlenen Mn konsantrasyonları yaz ($8.77 \pm 0.868 \text{ mg kg}^{-1}$) ve sonbahar ($4.62 \pm 4.300 \text{ mg kg}^{-1}$) mevsimlerinde; Fe konsantrasyonu yaz ($186.00 \pm 46.400 \text{ mg kg}^{-1}$) mevsiminde; Al konsantrasyonu ($15.88 \pm 9.690 \text{ mg kg}^{-1}$) yaz mevsiminde; Cr konsantrasyonu ($7.71 \pm 7.770 \text{ mg kg}^{-1}$) kış mevsiminde; As konsantrasyonu ilkbahar ($0.45 \pm 0.187 \text{ mg kg}^{-1}$), yaz ($0.51 \pm 0.019 \text{ mg kg}^{-1}$) ve sonbahar ($0.44 \pm 0.351 \text{ mg kg}^{-1}$) mevsimlerinde; Pb konsantrasyonları ise ilkbahar ($0.24 \pm 0.088 \text{ mg kg}^{-1}$), yaz ($1.53 \pm 0.237 \text{ mg kg}^{-1}$) ve sonbahar ($0.53 \pm 0.486 \text{ mg kg}^{-1}$) mevsimlerinde limit değerlerin üzerindedir (Çizelge 2).

Su ortamının doğal dengesi bozulduğunda, içerisinde yaşayan canlıların yaşamsal faaliyetleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Araştırma kapsamında incelenen bölgede metalloid ve ağır metal konsantrasyonu ağırlıklı olarak hem suda hem de balık dokusunda tespit edilmiştir. Ayrıca, *V. vimba* dokularında da tespit edilen element birikimlerinin oluşturmuş olabileceği genotoksik etkiler de ortaya konmuştur. Kıranyağmur bölgesi için kış, ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde As suda belirtilen limitlerin üzerindedir (SKKY, 2004) (Çizelge 1). As miktarı sedimentte yüksek değildir ancak bazı mevsimlerde ırmak suyunda limit değerleri aşmıştır. Bu durum istasyonda anlık dalgalanmaların gerçekleşmiş olduğunu gösterebilir. Birçok sebeple nehir suyuna karışan As, özellikle bol yağış alan sonbahar, kış ve ilkbahar mevsimlerinde daha yüksek konsantrasyon göstermiştir. Bununla beraber, tüm mevsimlerde Fe suda belirtilen limit değerlerin üzerinde tespit edilmiştir. Esansiyel bir metal olan Fe konsantrasyonu yüksek miktarlara ulaştığında, organizmanın bünyesinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Scalon ve ark., 2010; Omar ve ark., 2012). *Carassius carassius* türünün karaciğer ve böbrek dokularında yüksek miktarda Fe konsantrasyonunun histomorfolojik değişikliklere sebep olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Şenol ve Tekin-Özan, 2016). Bu çalışmada, her mevsim yüksek konsantrasyonda tespit edilen Fe'in diğer metallerle beraber, *V. vimba* bireyleri üzerinde genotoksik etkiler oluşturmuş olabileceği görülmektedir. Bazı tatlı su türlerinde yapılan diğer çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir (Scalon ve ark., 2010; Omar ve ark., 2012; Javed ve ark., 2016).

Çizelge 1. Suyun fiziko-kimyasal parametreleri, su ($\mu\text{g L}^{-1}$) ve sedimentte ($\mu\text{g g}^{-1}$) metalloid ve ağır metallerin mevsimsel konsantrasyonları (L.D.A.: Limit değerin altında; E.M.: Eser miktarda) (Ort. \pm S.H.)

Fiziko-kimyasal Parametreler	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Yıllık
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	10.6	23.6	12.8	9.7	14.18 \pm 3.21
pH	7.95	8.17	7.95	8.65	8.18 \pm 0.165
ÇO (mg L^{-1})	10.29	7.72	9.97	10.11	9.52 \pm 0.604
OD (%)	97.0	96.5	95.5	98.0	96.75 \pm 0.520
Tuzluluk (‰)	0.08	0.11	0.07	0.08	0.085 \pm 0.008
TDS (mg L^{-1})	81.5	114.7	75.6	81.1	88.2 \pm 8.93
İletkenlik ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	172.0	227.0	151.4	172.2	180.6 \pm 16.2
Direnç ($\text{k}\Omega\text{.cm}$)	5.85	4.35	6.61	5.84	5.66 \pm 0.473
NO ₂ ⁻ N (mg L^{-1})	0.002	L.D.A	0.004	0.003	0.003 \pm 0.001
NO ₃ ⁻ N (mg L^{-1})	0.7	0.3	1.6	0.6	0.8 \pm 0.280
SO ₄ ²⁻ (mg L^{-1})	10	13	16	13	13.0 \pm 1.22
PO ₄ ³⁻ (mg L^{-1})	0.81	L.D.A	3.40	1.31	1.84 \pm 0.793
P ₂ O ₅ (mg L^{-1})	0.60	L.D.A	2.54	0.98	1.37 \pm 0.594
Metalloid ve Ağır metaller	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Su
Al	7.334	30.185**	49.967**	240.322**	82.000 \pm 53.500**
As	20.945*	19.745	20.398*	20.035*	20.281 \pm 0.259*
Cr	1.014	1.925	1.274	0.941	1.289 \pm 0.224
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	17.486	1.191	3.038	25.192	11.730 \pm 5.780
Fe	135.870**	239.571**	240.647**	280.582**	224.200 \pm 30.900**
Co	L.D.A	L.D.A	L.D.A	L.D.A.	L.D.A
Cu	1.765	0.814	1.043	2.376	1.500 \pm 0.356
Zn	3.208	3.044	3.760	6.326	4.085 \pm 0.763
Ni	L.D.A	0.029	L.D.A	0.606	L.D.A
Metalloid ve Ağır metaller	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Sediment
Al	4037.39	3575.90	3848.86	4359.77	3955.00 \pm 165
As	4.35	4.24	5.13	4.35	4.52 \pm 0.207
Cr	5.39	5.41	4.96	8.78	6.14 \pm 0.888
Cd	E.M.	E.M.	E.M.	E.M.	E.M.
Pb	6.46	6.53	6.44	7.01	6.61 \pm 0.135
Mn	290.68	299.98	310.01	375.57	319.10 \pm 19.2
Fe	15888.82	14360.87	15086.44	25301.72	17659.00 \pm 256
Co	5.26	4.57	4.71	6.91	5.37 \pm 0.537
Cu	12.68	9.84	10.61	10.55	10.92 \pm 0.612
Zn	29.91	27.51	27.82	41.70	31.74 \pm 3.36
Ni	2.90	3.42	3.83	4.31	3.61 \pm 0.299

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

V. vimba bireylerinin eritrositlerinde tespit edilen mikronükleus oluşumları, eritrosit hücrelerinde kromozomal bir hasarın olduğunu göstermektedir. *V. vimba* bireylerinin eritrosit hücrelerinde tespit edilen mikronükleus oluşumu Şekil 1'de ve ortalama mikronükleus frekansları Çizelge 3'te sunulmuştur. Yaz, kış, sonbahar ve ilkbahar aylarında *V. vimba* bireylerinin eritrosit hücrelerinde tespit edilen MN frekansları sırasıyla % 5.20, % 1.80, % 1.40 ve % 1.10 şeklindedir.

Çizelge 2. *V. vimba* bireylerinin dokularında mevsimsel olarak belirlenen ağır metal ve metalloid konsantrasyonları (mg kg⁻¹) (L.D.A: Limit değerin altında; E.M.: Eser miktarda)

Element	Mevsim	Kas (Ort.±S.H.)	Karaciğer (Ort.±S.H.)	Solungaç (Ort.±S.H.)
Al		1.38 ± 0.571	35.20 ± 13.300	0.49 ± 0.487
Cr		0.34 ± 0.268	4.54 ± 2.480	L.D.A.
As		0.45 ± 0.187*	8.22 ± 3.35	0.13 ± 0.047
Cd		0.01 ± 0.005	0.07 ± 0.0634	L.D.A.
Pb		0.24 ± 0.088**/**	10.11 ± 5.370	0.144 ± 0.119
Mn	İlkbahar	0.91 ± 0.312	5.23 ± 1.080	0.29 ± 0.180
Fe		36.80 ± 16.100	480 ± 167	1.15 ± 5.450
Co		L.D.A.	0.03 ± 0.011	L.D.A.
Cu		0.43 ± 0.188	12.98 ± 2.500	0.54 ± 0.521
Zn		21.90 ± 10.700	353 ± 112	0.51 ± 1.170
Ni		0.26 ± 0.141	2.73 ± 0.679	0.01 ± 0.023
Al		15.88 ± 9.690**	34.70 ± 11.200	7.07 ± 3.130
Cr		0.23 ± 0.02	1.34 ± 0.242	0.44 ± 0.079
As		0.51 ± 0.019*	5.85 ± 0.901	0.63 ± 0.106
Cd		E.M.	0.03 ± 0.017	E.M.
Pb		1.53 ± 0.237**/**	6.19 ± 1.700	1.66 ± 0.303
Mn	Yaz	8.77 ± 0.868**	12.76 ± 3.360	1.695 ± 0.543
Fe		186.00 ± 46.400**	455.00 ± 160	89.10 ± 20.500
Co		0.04 ± 0.016	0.02 ± 0.006	0.01 ± 0.004
Cu		1.24 ± 0.026	9.52 ± 2.310	5.45 ± 0.862
Zn		20.09 ± 5.250	268.70 ± 20.800	20.86 ± 5.050
Ni		0.35 ± 0.065	3.09 ± 0.419	0.29 ± 0.034
Al		11.20 ± 11.100	5.55 ± 9.360	12.01 ± 2.120
Cr		0.01 ± 0.161	L.D.A.	0.12 ± 0.063
As		0.44 ± 0.351*	1.87 ± 0.759	0.71 ± 0.231
Cd		L.D.A.	L.D.A.	L.D.A.
Pb		0.53 ± 0.486**/**	0.37 ± 0.339	0.65 ± 0.109
Mn	Sonbahar	4.62 ± 4.300**	3.71 ± 3.210	7.59 ± 0.556
Fe		54.00 ± 56.300	33.60 ± 78.300	96.90 ± 25.300
Co		0.01 ± 0.017	L.D.A.	E.M.
Cu		0.20 ± 0.183	0.33 ± 0.613	0.37 ± 0.030
Zn		5.44 ± 4.450	0.60 ± 12.400	21.40 ± 13.700
Ni		0.06 ± 0.069	0.06 ± 0.156	0.12 ± 0.049
Al		0.26 ± 0.491	80.80 ± 74.300	L.D.A.
Cr		7.71 ± 7.770**	3.79 ± 4.130	L.D.A.
As		0.07 ± 0.042	9.15 ± 8.540	0.04 ± 0.003
Cd		L.D.A.	0.28 ± 0.325	L.D.A.
Pb		0.02 ± 0.028	14.00 ± 13.600	E.M.
Mn	Kış	0.35 ± 0.379	16.70 ± 14.900	0.02 ± 0.037
Fe		131 ± 135	742.0 ± 746.0	L.D.A.
Co		0.02 ± 0.022	0.04 ± 0.064	L.D.A.
Cu		0.10 ± 0.126	14.60 ± 14.400	L.D.A.
Zn		0.96 ± 1.620	114.0 ± 116.0	L.D.A.
Ni		0.40 ± 0.409	1.71 ± 1.700	L.D.A.

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

Mikronükleus frekansı mevsimsel olarak karşılaştırıldığında, yaz mevsiminde mikronükleus frekansı diğer mevsimlere göre en yüksektir (P<0.05) (Çizelge 3). Ağır metallerin balıklarda izlenen toksik profilleri organizmanın türüne ve yaşına göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca, ağır metallerin alınma yollarına, balığın ağır metale maruz kalma süresine, canlı tarafından absorblanma miktarına ve metalin kimyasal özelliklerine göre değişim gösterebilmektedir (Bat ve ark., 1999). Organizmanın DNA'sında hasarlara yol açabilecek olan ağır metaller gibi ajanlar, DNA molekülünün fonksiyonu ve

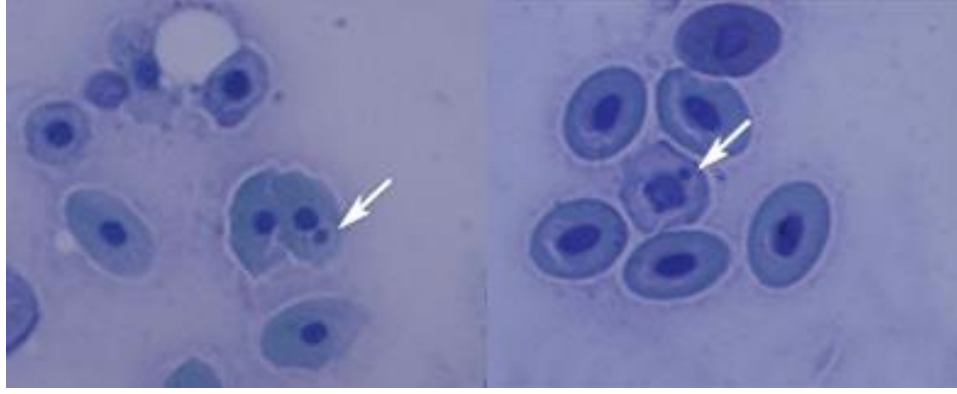
yapısında değişiklikler meydana getirirler (Al-Sabti, 1994; Llorente ve ark., 2002). Böylece, farklı seviyelerde etkiler oluşturarak sitogenetik değişikliklere yol açarlar (Çavaş ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmada, Karasu Nehri'nde yaşayan *Barbus plebejus* türünde de metalloïd ve ağır metal (As, Al, Mn, Cd, Pb) kaynaklı su kirliliğine bağlı olarak genotoksik etkinin arttığı eritrosit hücrelerindeki MN frekanslarının artışıyla tespit edilmiştir (Yazıcı ve Şişman, 2015). Summak (2009) Al, Cd, Pb, Cr, Fe, Cu, Ni ve Zn kirliliği gözlemlenen Nilüfer Çayı (Bursa)'nın genotoksik etkilerini mikronükleus testi ile *Oreochromis niloticus* bireylerinde tespit etmişlerdir. Denizel ortamda yaşayan *Mugil cephalus* türüyle gerçekleştirilen bir çalışmada, endüstriyel atıkların etkilerini mevsimsel olarak araştırmış, kirlilikle beraber eritrositlerde hesaplanan mikronükleus (MN) frekanslarının en yüksek yaz mevsiminde ve en düşük kış mevsiminde rastlandığını bildirmiştir (Çavaş, 2004). *V. vimba* türünde de MN frekansına en yüksek yaz mevsiminde rastlanmıştır ($P<0.05$). MN frekanslarındaki yükselmeler, esas olarak metalloïd ve ağır metal seviyelerindeki artış ve azalışlarla aynı doğrultuda etkiler oluşturmaktadır. Bu durum yapılan önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Çavaş, 2004; Summak, 2009; Yazıcı ve Şişman, 2015).

Comet assay parametrelerinden yararlanılarak *V. vimba* bireylerinin eritrosit hücrelerinin çekirdeğindeki DNA hasarı da tespit edilmiştir (Şekil 2). Kuyruk boyu (μm) yaz, ilkbahar, sonbahar ve kışın sırasıyla 26.32 μm , 25.12 μm , 22.16 μm ve 17.78 μm olarak belirlenmiştir ($P<0.05$). Kuyruktaki % DNA değeri yaz, ilkbahar, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla % 37.44, % 33.31, % 31.01 ve % 26.80 olarak hesaplanmıştır ($P<0.05$). Baştaki % DNA değeri ilkbaharda % 66.69, yaz mevsiminde % 62.56, sonbaharda % 68.99 ve kış mevsiminde % 73.20 şeklindedir ($P<0.05$) (Çizelge 3). Suda ve kas dokusunda yazın Al ve Fe, ilkbahar ve sonbaharda ise As yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir. As sucül organizmalar için toksik özelliğe sahip bir metalloïddir. Bununla beraber, Pb konsantrasyonu da kas dokusunda ilkbahar, yaz ve sonbaharda limit değerlerin üzerindedir. Mitkovska ve ark. (2017), kurşun (Pb)'un çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. carpio* bireylerinde comet assay parametrelerinden olan kuyruktaki % DNA ve kuyruk momenti değerleriyle ortaya koydukları genotoksik hasarın varlığının istatistiksel manada anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Kuyruktaki DNA miktarı ve yoğunluğu, DNA hasarının büyüklüğüne bağlı olarak artış gösterir. Yapılan çalışmada bu durum, *V. vimba* bireyleri için de eritrosit hücrelerinde ölçülen kuyruk boyu, %DNA_T ve kuyruk momenti değerleriyle ortaya konulmuştur (Çizelge 3). Okuşluk (2008), *Cyprinus carpio* bireylerinde kuyruk boyu ve kuyruk momenti değerlerinin, ağır metal etkisi altındaki su sisteminde kontrol grubu bireylerine göre arttığını ve genotoksik hasarın meydana geldiğini belirtmiştir ($P<0.05$).

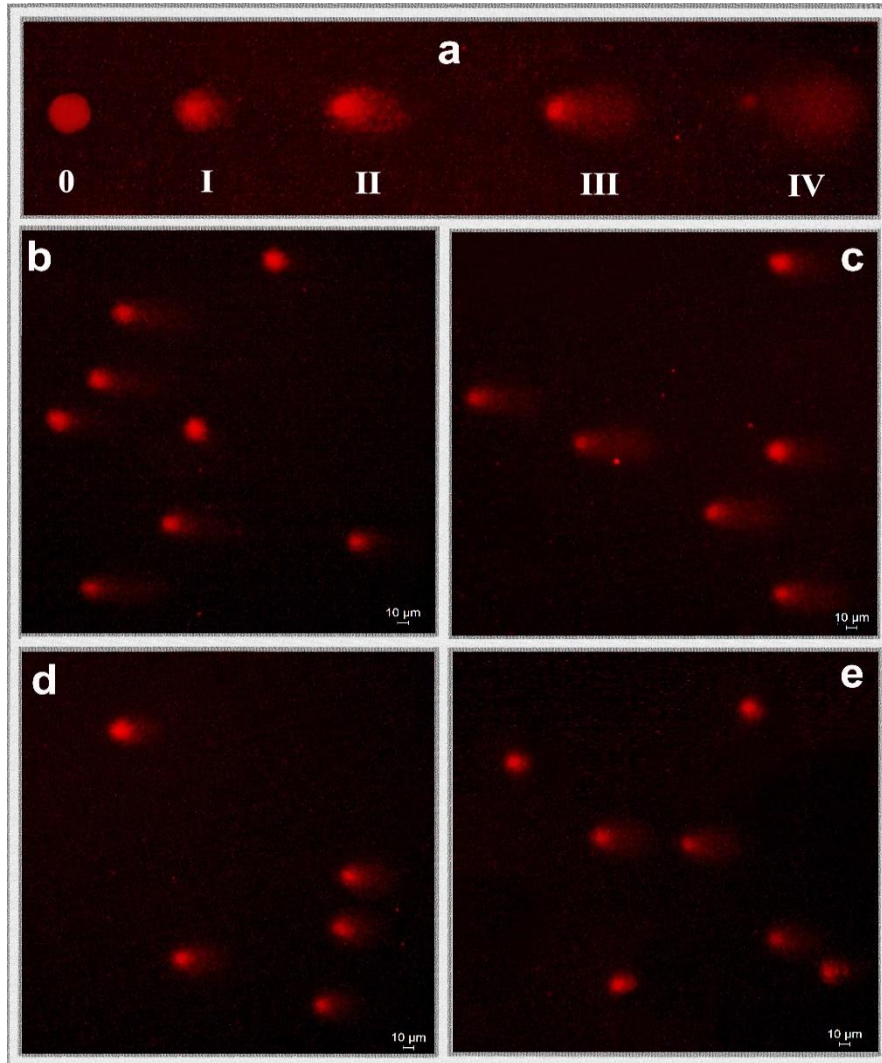
Çizelge 3. *V. vimba* bireylerinin eritrosit hücrelerinde MN frekansı ve comet assay ile elde edilen bazı parametrelerin değerleri

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	
Mikronükleus Frekansı (%)	1.10 ± 0.332 ^b	5.20 ± 1.470^{a*}	1.40 ± 0.292 ^b	1.80 ± 0.515 ^b	P<0.05
Kuyruk Boyu (μm)	25.12 ± 1.25 ^a	26.32 ± 1.34 ^a	22.16 ± 1.13 ^a	17.78 ± 0.98^{b*}	P<0.05
Kuyruk Yoğunluğu (%)	28.78 ± 2.13 ^a	29.56 ± 2.06 ^a	27.89 ± 2.16 ^a	26.99 ± 2.02 ^a	P>0.05
Kuyruktaki % DNA	33.31 ± 2.15 ^{ab}	37.44 ± 2.22^{a*}	31.01 ± 1.82 ^{ab}	26.80 ± 2.22^{b*}	P<0.05
Kuyruk Momenti	0.412 ± 0.039 ^a	0.453 ± 0.042 ^a	0.308 ± 0.037 ^a	0.304 ± 0.068 ^a	P>0.05
Baştaki % DNA	66.69 ± 2.15 ^{ab}	62.56 ± 2.22^{b*}	68.99 ± 1.82 ^{ab}	73.20 ± 2.22^{a*}	P<0.05
Baş Yoğunluğu (%)	71.22 ± 2.13 ^a	70.44 ± 2.06 ^a	72.11 ± 2.16 ^a	73.01 ± 2.02 ^a	P>0.05

*; P<0.05



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



Şekil 2. Balıkların eritrosit hücrelerindeki genetik hasara bağlı comet dereceleri (a) ve genel görüntüsü (b; ilkbahar, c; yaz, d; sonbahar, e; kış) (Kontaş, 2018'den düzenlenmiştir)

SONUÇ

Melet Irmağı Kıranyağmur bölgesinde yapılan bu çalışmada, MN testi ve comet assay parametrelerinin sonuçları metalloid ve ağır metallerin muhtemel toksik etkisini ortaya koymaktadır. Melet Irmağı hem doğal hem de antropojenik kaynaklı ağır metal kirliliği ile karşı karşıyadır. Gerçekleştirilen tarımsal faaliyetler hem ırmak suyunu hem de suda yaşayan balık türlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Elde edilen bulgular, uygulanan comet assay ve mikronükleus testinin önem ve

değerini bir kez daha vurgulamaktadır. İçme ve kullanma suyu kaynağı olarak değerlendirilen Melet Irmağı'nın su kalitesinin korunması ve fındık tarımı ile diğer tarımsal faaliyetlerde kullanılan pestisitlerin, evsel atıkların ve diğer kirletici kaynaklarının ortama bilinçsizce bırakılmasıyla ilgili olarak halkın bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Balıkların eritrositlerinde belirlenen genotoksik etkilerin varlığı düşünüldüğünde, yapılacak sonraki çalışmaların yöntemleri ve kapsamının geliştirilmesi ve uygulanması da önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Seda KONTAŞ'ın Doktora tezinin bir bölümünü temel almaktadır. Sorumlu yazar, doktora bursiyeri olarak 2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında kendisini destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e ve çalışmayı destekleyen Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (BAP; TF-1612) teşekkür eder.

KAYNAKLAR

- Al-Sabti K, 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. *Mutation Research*, 320 (1-2): 157-163.
- Anonim, 2011. Ordu çevre durum raporu. T. C. Ordu Valiliği Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü, Ordu, 209s.
- Barlow S, Renwick AG, Kleiner J, Bridges JW, Busk L, Dybing E, Edler L, Eisenbrand G, Fink-Gremmels J, Knaap A, Kroes R, Liem D, Müller DJ, Page S, Rolland V, Schlatter J, Tritscher A, Tueting W, Würtzen G, 2006. Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an international conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (10): 1636-1650.
- Bat L, Gündoğdu A, Öztürk M, 1999. Ağır metaller. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 6: 166-175.
- 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. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700 (1-2): 11-17.
- Cicik B, 2003. Bakır-çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio* L.)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12 (48): 32-36.
- 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). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20 (3A): 818-822.
- Cornetta T, Padua L, Testa A, Levoli E, Festa F, Tranfo G, Baccelliere L, Cozzi R, 2008. Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*, 638 (1-2): 75-82.
- Çavaş T, 2004. Endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin mikronükleus testi ve AgNOR analiz teknikleri kullanılarak *in-situ* ve laboratuvar koşulları altında araştırılması, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Çavaş T, Garanko NN, Arkhipchuk VV 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43 (4): 569-574.
- de Andrade VM, de Freitas TR, da Silva J, 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*, 560 (1): 57-67.
- Dural M, Göksu MZL, 2006. Çamlık lagünü (Karataş, Adana), seston, bentoz ve sedimentinde mevsimsel ağır metal değişimi. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 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.
- 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*). Brazilian Journal of Biology, 74 (4): 769-778.
- 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 Bilimleri Dergisi, 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.
- Javed M, Ahmad I, Usmani N, Ahmad M, 2016. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 127: 163-169.
- Kammann U, Biselli S, Hühnerfuss H, Reineke N, Theobald N, Vobach M, Wosniok W, 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environmental Pollution, 132 (2): 279-287.
- Kontaş S, 2018. Melet Irmağı Su, Sediment ve Bazı Balık Türlerinde Ağır Metal Birikimi ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Llorente MT, Martos A, Castaño A, 2002. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. Ecotoxicology, 11 (1): 27-34.
- Marple T, Li H, Hasty P, 2004. A genotoxic screen: rapid analysis of cellular dose-response to a wide range of agents that either damage DNA or alter genome maintenance pathways. Mutation Research, 554 (1-2): 253-266.
- Mitchelmore CL, Chipman JK, 1998. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. Aquatic Toxicology, 41 (1-2): 161-182.
- Mitkovska VI, Dimitrov HA, Chassovnikarova TG, 2017. *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity assessment of allowable concentrations of nickel and lead: comet assay and nuclear abnormalities in acridine orange stained erythrocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Zoologica Bulgarica, 8: 47-56.
- Okuşluk Ö, 2008. Mogan Gölü'ndeki olası kirlenmenin sazan balıklarında (*Cyprinus carpio* L.) comet testi kullanılarak araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Omar WA, Zaghloul KH, Abdel-Khalek AA, Abo-Hegab S, 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. Mutation Research, 746 (1): 7-14
- Scalon MCS, Rechenmacher C, Siebel AM, Kayser ML, Rodrigues MT, Maluf SW, Rodrigues MAS, Silva LB, 2010. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. Brazilian Journal of Biology, 70 (4): 1217-1222.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175: 184–191.
- 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, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Şenol N, Tekin Özan S, 2016. The histomorphological changes in *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), liver and kidney tissues of some heavy metals. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 45 (9): 1123-1127.

- Tice RR, Agurell E, Anderson D, 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3): 206-221.
- Turekian KK, Wedepohl KH, 1961. Distribution of the elements in some major units of the Earth's Crust. *Geological Society of America Bulletin*, 72 (2): 175-191.
- 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.
- Udroiu I, 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79 (2): 201-204.
- WHO (World Health Organization), 1989. National research council recommended dietary 626 Allowances 10th ed. National Academy Press., Washington, DC. USA.
- Yazıcı Z, Şişman T, 2015. Karasu Nehri'ndeki su kirliliğinin *Barbus plebejus*'daki genotoksik etkileri. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2: 9-16.
- Yılmaz M, Teber Ç, Akkan T, Er Ç, Kariptas E, Çiftci H, 2016. Determination of heavy metal levels in different tissues of tench (*Tinca tinca* L., 1758) from Sıddıklı Küçükboğaz Dam Lake (Kırşehir), Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25 (6): 1972-1977.
- 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. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22 (8): 2402-2408.