

## Tribenuron Metil'in Zebra Balığı Embriyo ve Larvaları Üzerine Teratolojik Etkileri

Nazan Deniz YÖN ERTUĞ<sup>1</sup>, Tarık DİNÇ<sup>2\*</sup>, Burcu ÖZTÜRK<sup>3</sup>

\*Sorumlu yazar: [tdinc@sakarya.edu.tr](mailto:tdinc@sakarya.edu.tr)

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SAKARYA  
Orcid No: 0000-0002-6830-8971 / [ndyon@sakarya.edu.tr](mailto:ndyon@sakarya.edu.tr)

<sup>2\*</sup>Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SAKARYA  
Orcid No: 0000-0003-3481-0872 / [tdinc@sakarya.edu.tr](mailto:tdinc@sakarya.edu.tr)

<sup>3</sup>Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SAKARYA  
Orcid No: 0000-0002-2506-8904 / [bozturk911@gmail.com](mailto:bozturk911@gmail.com)

**Öz:** Tribenuron metil tarımda çok yıllık dikotları kontrol etmek için kullanılan herbisittir. Sucul ekosistemlere yeraltı suyu yoluyla erişebilir ve sucul yaşamı etkileyebilir. Zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822), kolay üreme kapasitesine ve şeffaf embriyolara sahip olan ve bu yüzden bilimsel çalışmalarda sıkça tercih edilen bir omurgalı modelidir. Bu çalışmada tribenuron metil zebra balıkları üzerinde 120 saatlik LC<sub>50</sub> değerinin 1.850 mg L<sup>-1</sup> olarak tespit edildi. Bu değerden yola çıkarak uygulanan 1.812 mg L<sup>-1</sup>, 0.906 mg L<sup>-1</sup>, 0.453 mg L<sup>-1</sup>, 0.226 mg L<sup>-1</sup> ve 0.113 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında tribenuron metilin zebra balığı embriyo ve larva gelişimine olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda tribenuron metil uygulamasının embriyo hücrelerinde toksik etki ettiği, farklı malformasyonlara sebep olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tribenuron Metil, Zebra Balığı (*Danio rerio*), Embriyo Toksite Testi, Teratoloji

## Teratological Effects of Tribenuron Methyl on Zebra Fish Embryo and Larva

**Abstract:** Tribenuron methyl is an herbicide used in agriculture to control perennial dicots. It can access aquatic ecosystems through groundwater and affect aquatic life. The zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) is a vertebrate model that has an easy reproductive capacity and transparent embryos therefore frequently preferred in scientific studies. In this study, the effects of 1.812 mg L<sup>-1</sup>, 0.906 mg L<sup>-1</sup>, 0.453 mg L<sup>-1</sup>, 0.226 mg L<sup>-1</sup> and 0.113 mg L<sup>-1</sup> tribenuron methyl on zebrafish embryo and larval development were investigated. As a result of this study, it was determined that tribenuron methyl administration had toxic effects on embryo cells and caused different malformations.

**Keywords:** Tribenuron Methyl, Zebrafish (*Danio rerio*), Embryo Toxicity Test, Teratology

### 1. Giriş

Pestisitler tarımda zararlı organizmaları engellemek veya kontrol altına almak için kullanılan madde ya da madde karışımlarıdır. Engellenmek istenen canlıya göre farklı pestisit türleri bulunmaktadır. Farklı canlı türlerini hedef olarak kullanılan bu ilaçlar, farklı yollarla

doğaya salınmaktadır. Suda, toprakta bozunmadan kalan pestisitler, çevre kirliliğine sebep olmakta ve besin zinciri yolu ile canlıları olumsuz yönde etkilemektedir (Vural, 1984; Toros ve Maden, 1985).

Tribenuron metil, tarımda yabancı otlara karşı üretilen bazı tarım ilaçlarının ana

etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılan bir pestisit çeşididir. Tribenuron metil; kökler ve yeşil aksam yoluyla yabancı otlar tarafından bünyelerine alınır. Topraktaki kalıcı etkisi azdır. Tribenuron metil, düşük konsantrasyonlarda bile büyük fitotoksik etkiye sahip olan sulfonil üre grubu herbisittir. Tribenuron metil tarımda birçok ilacın etkin maddesi olarak kullanılmaktadır (EPA, 2009). Diğer sulfonil üre bileşikleriyle karşılaştırıldığında, tribenuron metil'in belirlenmesi ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır.

Şeffaf embriyo özelliğine sahip olan; Zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) 1930'lardan beri yaygın olarak üzerine çalışılan model bir organizmadır. Zebra balığı, birçok ilaç veya hastalık tedavi ve tespit çalışmalarında tercih edilen bir model organizmadır. Bu balık türünün embriyonik gelişimi, gelişimi sırasındaki morfolojik ve biyokimyasal süreçleri hakkında çok şey bilinmektedir (Kimmel ve ark., 1995). Son yıllarda zararlı kimyasal maddelerin gelişim aşamasında verdiği hasarların değerlendirilmesinde, zebra balığı embriyoları döllenen kısa bir süre sonra koryondan çıkması ve gelişiminin hızlı olması nedeni ile toksik madde riskini değerlendirmede bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Balığın embriyo döneminde dış madde veya zarara karşı kendisini korunmasına rağmen yapısal ve

işlevsel değişikliklerin ne olacağı merak konusu olmuştur (Glberman, 2017).

Tribenuron metilin endokrin bozucu potansiyeli olduğundan embriyoları yakından etkilemektedir. Dolayısıyla çalışma boyunca zebra balığı embriyolarında düşük dozlarda tribenuron metil uygulanarak, bu maddenin balığın dışarıya en hassas olduğu dönem olan embriyo ve larval döneminde etkileri incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Tribenuron Metil

Tribenuron metil, Dupont firmasından temin edilmiştir. 101200-48-0 CAS numaralı olup tarım ilacı olarak herbisit amaçlı üretilmiştir. Ticari ismi "Granstar" (WG, %75 tribenuron-methyl)'dir.

### 2.2. Zebra Balığı Yetiştirilmesi ve Yumurtalarının Toplanması

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisine zebra balığı ile yapılacak deneyler için akvaryum sistemi kuruldu. Akvaryumların içerisine dinlendirilmiş musluk suyu konulup sıcaklık termostatlı bir ısıtıcı ile 28°C olacak şekilde ayarlandı. Akvaryum içerisindeki sular hava motorları ile oksijenlendirildi. Oda içerisine 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak balıkların gelişim süreci için gerekli olan fotoperiyot oluşturuldu. Yumurta toplamak

için, zebra balıkları 2 dişiye 5 erkek gelecek şekilde 24x28x40 cm ebadında çiftleştirme akvaryumlarına yerleştirildi. Döllenen yumurtalar ve gelişim evresinde olan embriyolar stereo mikroskop altında incelendi. Normal gelişim gösteren embriyolar denemelere başlayıncaya kadar 28 °C'lik etüv içerisinde bekletildi.

### 2.3. Embriyo ve Larval Toksikite Testi

Bu araştırmada, tribenuron metilin toksisitesini belirlemek amacıyla, teratojenite testi (USEPA) kullanıldı (Glberman, 2017). Bu teste göre, toksisitesinden şüphelenilen kimyasal maddenin LC<sub>50</sub> değerini belirlemek için, kontrol ve deney gruplarında her petride 20 zebra balığı embriyosu olacak şekilde düzenlendi. Deney gruplarındaki zebra balığı embriyolarına blastula evresinde 1 g L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 0.1 mg L<sup>-1</sup>, 0.01 mg L<sup>-1</sup>'lik dozlarda tribenuron metil uygulaması yapıldı ve embriyoların gelişimleri 120 saat süre zarfında gözlemlendi. Probit yöntemi (Tyler ve Gurian, 1950) ile LC<sub>50</sub> 1.850 mg L<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. Uygulama konsantrasyonları olarak 1.812 mg L<sup>-1</sup>, 0.906 mg L<sup>-1</sup>, 0.453 mg L<sup>-1</sup>, 0.226 mg L<sup>-1</sup>, 0.113 mg L<sup>-1</sup>, 0.056 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenip; 120 saatlik uygulama sonucunda çeşitli anormallikler not edildi.

### 2.4. Embriyo ve Larvalara Tribenuron Metilin Uygulanması

Tribenuron metilin uygulaması zigotlara ilk 0-2 saatlik zaman diliminde uygulandı. Kontrol grubunda sadece su kullanılırken, deney gruplarına LC<sub>50</sub> değeri göz önünde bulundurularak 1.812 mg L<sup>-1</sup>, 0.906 mg L<sup>-1</sup>, 0.453 mg L<sup>-1</sup>, 0.226 mg L<sup>-1</sup>, 0.113 mg L<sup>-1</sup>, 0.056 mg L<sup>-1</sup>'lik konsantrasyonlarda tribenuron metil uygulaması yapıldı. Kontrol ve deney gruplarında 20'şer adet embriyolar, 20 ml solüsyonun içerisinde tutuldu. Embriyolar, 14 saat aydınlık:10 saat karanlık fotoperiyot uygulanan bir ortamda 28 °C'ye ayarlı inkübatörde yaşatıldı. Gözlemler 24, 48, 72, 96 ve 120 saat aralıklarla yapıldı. Deney gruplarında meydana gelen anomaliler not edilip dijital kamera destekli ışık mikroskopuyla gözlenip fotoğrafları çekildi. Tribenuron metilin zebra balığı embriyolarında koryondan çıkma, ölüm ve anomali oranları üzerindeki etkileri tespit edildi.

### 2.5. İstatistiksel Analiz

IBM SPSS 23 programı kullanılarak, kontrol grupları ile uygulama doz grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için ANOVA testi kullanılmıştır. Doz grupları arasındaki farklar için TUKEY HSD testi kullanılmıştır. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edilmiştir.

### 3.Araştırma Sonuçları

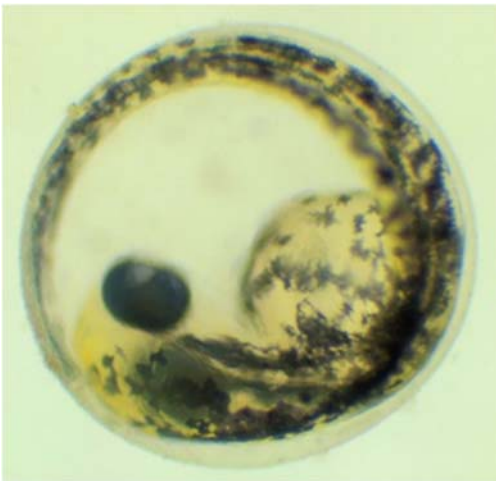
#### 3.1. Zebra Balığında Gelişim Evreleri

##### 3.1.1. Kontrol grubu

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; toplam 80 adet embriyo incelendi. Döllenen yumurtaların gelişiminin 1. gününde somit oluşumunun tamamlandığı, baş ve kuyruk bölgelerinin oluşması mikroskop altında şeffaf görüldü (Şekil 1). 48 saatlik embriyolar normal gelişim gösterdi (Şekil 2).



Şekil 1. Zebra balığı embriyosu 24 saatlik; b: baş bölgesi, k: kuyruk, v: vitellüs



Şekil 2. 2 günlük zebra balığı embriyosu

Gelişimin 3. gününde Zebra balığı embriyolarının koryondan çıktığı gözlemlendi (Şekil 3). 4.günüden 7. gününe kadar zebra balığı petri kabında incelendi (Şekil 4).



Şekil 3. 3 günlük zebra balığı embriyosunun koryondan çıkışı



Şekil 4. 4 günlük zebra balığı

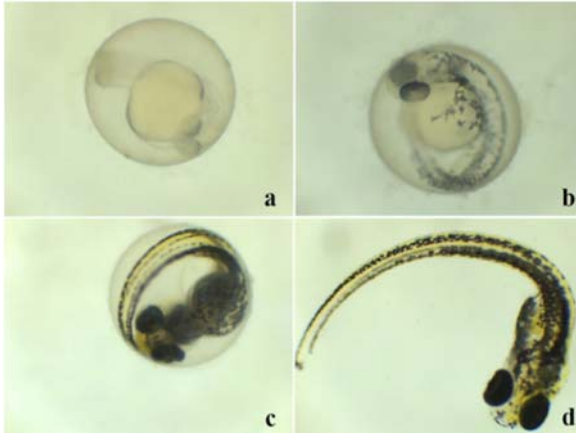
Zebra balığı larvaları 7. güne kadar vitellus kesesinden beslenirken, 7. gün itibari ile larvalar ağız yolu ile beslenmeye başladı.

##### 3.1.2. 0.056 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 0.056 mg L<sup>-1</sup> tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo

içerisinden biri 1. gün öldü. Kalan 79 embriyodan 4 embriyoda anomali gözlemlendi.

Gelişimin 1. gününde gelişim geriliği (Şekil 5a), 2. gününde pigmentasyon oluşumunda gecikmeler görüldü (Şekil 5b). 3. gününde ise koryondan çıkışlarda gecikmeler olduğu gözlemlendi (Şekil 5c). Zebra balığı embriyolarından bazıları koryondan çıkışını 4. gün gerçekleştirdi (Şekil 5d). Ayrıca anomali görülen balıklarda kalp atışı ilk üç günde ortalama dakikada 98 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 5.** 0.056 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları a) Gelişim geriliği, b) Yetersiz pigment oluşumu, c) Zebra balığı prelarvası 3. gün koryondan çıkışında gecikme, d) Zebra balığı prelarvası 4. gün koryondan çıkış.

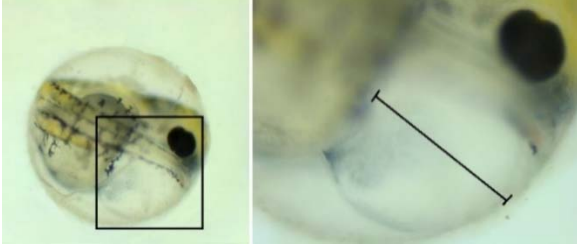
### 3.1.3. 0.113 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 0.113 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo içerisinden üçü 1. gün öldü. Kalan 77 embriyodan 7 embriyoda anomali gözlemlendi. Gelişimin 1. gününde gelişim geriliği ve

perikardiyal ödem (Şekil 6a), 2. gününde pigmentasyon oluşumunda gecikmeler ve perikardiyal ödemin büyümesi görüldü (Şekil 6b). 3. gününde koryondan çıkışta gecikmeler olduğu ve perikardiyal ödemlerin 2. güne kıyasla daha büyüdüğü izlendi (Şekil 6c ve Şekil 7). 4. gününde hala koryondan çıkmayan embriyolar tespit edildi (Şekil 6d). Bazı zebra balıkları koryondan çıkışını 5. gün gerçekleştirdi (Şekil 8). Ayrıca anomali görülen balıklarda ilk 3 günde kalp atışı ortalama dakikada 96 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 6.** 0.113 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron Metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları, a) 1.gün zebra balığı prelarvası gelişim geriliği, ödem oluşumu (ok), b) 2.gün zebra balığı prelarvası yetersiz pigment oluşumu ve perikardiyal ödem (ok), c) 3.gün zebra balığı prelarvası koryondan çıkışında gecikme ve perikardiyal ödemde büyüme (ok), d) 4.gün zebra balığı prelarvası ve perikardiyal ödem (ok).



**Şekil 7.** 0.113 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış 4. gün zebra balığı prelarvası perikardiyal ödemin genişliği (çizgi)

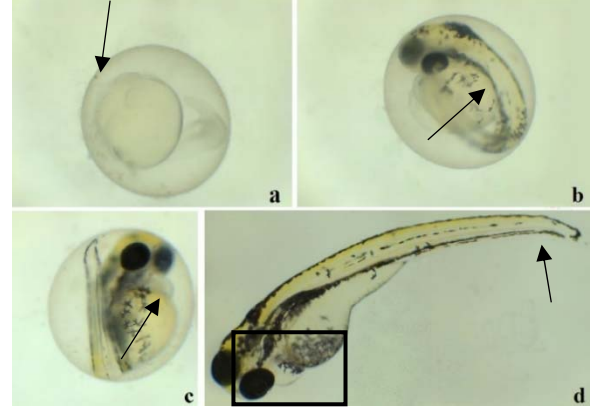


**Şekil 8.** 0.113 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış 5. gün zebra balığı prelarvası koryondan çıkışı

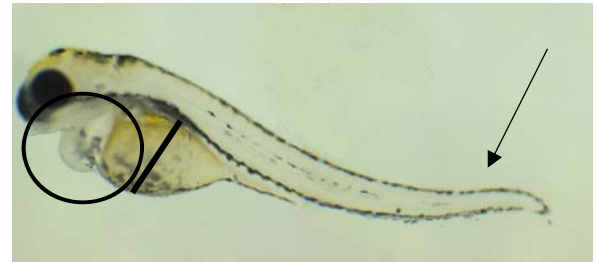
### 3.1.4. 0.226 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 0.226 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo içerisinde 7 tanesi 1. gün öldü. Kalan 73 embriyodan 14 embriyoda anomali gözlemlendi. Gelişimin 1. gününde belirgin olarak baş oluşmaması gibi gelişim geriliği (Şekil 9a), 2. gününde pigmentasyon oluşumunda gecikmeler ve perikardiyal ödemin büyümesi görüldü (Şekil 9b) 3. gününde koryondan çıkışlarında gecikmeler olduğu, pigmentasyon oluşumunun yavaşlığı ve perikardiyal ödem gözlemlendi (Şekil 9c). 5. gününde koryondan çıkışı tespit edildi. Ancak koryondan çıkan balıkların bazılarının kuyruğunda eğrilik ve

perikardiyal ödemler gözlemlendi (Şekil 9d). Bununla birlikte bazı balıkların vitellüs kesesinde kısmen ödem, omurgada eğrilik ve perikardiyal ödem gözlemlendi (Şekil 10). Ayrıca anomali görülen balıklarda ilk 3 günde kalp atışı ortalama dakikada 94 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 9.** 0.226 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları, a) 1. gün zebra balığı prelarvası gelişim geriliği, baş oluşumunun belirgin olmaması (ok), b) 2. gün zebra balığı prelarvası yetersiz pigment oluşumu ve perikardiyal ödem (ok), c) 3. gün zebra balığı prelarvası koryondan çıkışında gecikme ve perikardiyal ödemde büyüme (ok), d) 5. gün zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (kare), kuyruğunda eğrilik (ok).



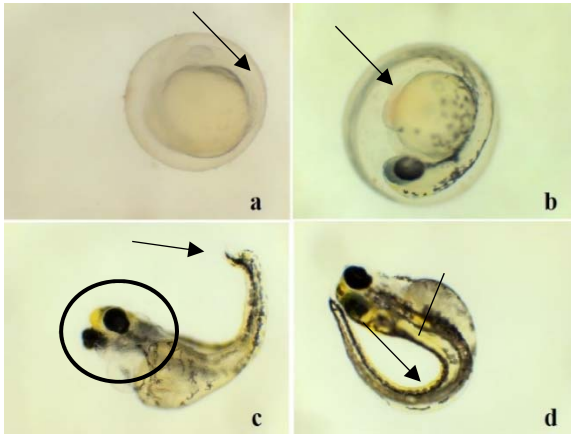
**Şekil 10.** 0.226 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış 5.gün zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (daire), vitellüs kesesinde kısmen ödem (şişlik mesafesi çizgi), omurgada eğrilik (ok)

### 3.1.5. 0.453 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 0.453 mg L<sup>-1</sup> tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile



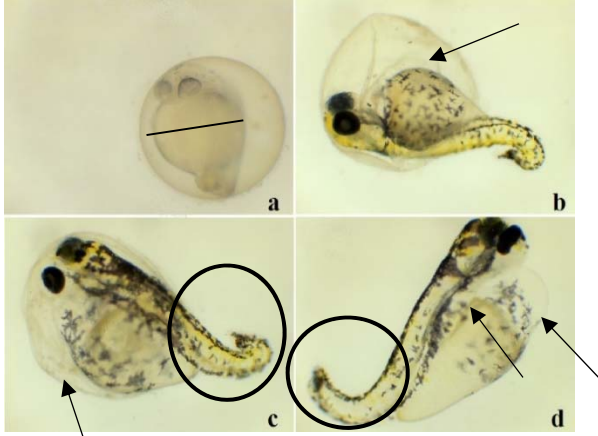
karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo içerisinde 13'ü 1. gün öldü. Kalan 67 embriyodan 27 embriyoda anomali gözlemlendi. Gelişimin 1. gününde belirgin olarak gelişim geriliği ve vitellüs kesesinde ödem (Şekil 11a), 3. gününde koryondan çıkışında gecikmeler, pigmentasyon oluşumunda gecikmeler ve kısmen perikardiyal ödemle birlikte içerisinde kanlanma görüldü (Şekil 11b). Bazı embriyolarda 5. gününde koryondan çıkış, perikardiyal ödem, vitellüs kesesinde ödem ve kuyrukta eğrilik gözlemlendi (Şekil 11c). Ayrıca 5. gününde koryondan çıkan bazı balıkların omurgasında eğrilik belirlendi (Şekil 11d). Bu anomalilere ilaveten ilk 3 günde kalp atışı ortalama dakikada 87 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 11.** 0.453 mg L<sup>-1</sup> tribenuron metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları a) 1. gün zebra balığı prelarvası gelişim geriliği, vitellüs kesesinde ödem (ok) b) 3. gün zebra balığı prelarvası perikardiyal ödem ve içerisinde kanlanma (ok), c) 5. gün zebra balığı embriyosunda koryondan çıkan balığın kuyruğunda eğrilik (ok), perikardiyal ödem (çember), vitellüs kesesinde ödem (çizgi), d) 5. gün zebra balığı embriyosunda omurgada eğrilik (ok)

### 3.1.6. 0.906 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 0.906 mg L<sup>-1</sup> tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo içerisinde 36'sı 1. gün öldü. Kalan 44 embriyoda anomali gözlemlendi. Gelişimin 1. gününde vitellüs kesesinde ödem (Şekil 12a), 3. gününde koryondan çıkan bazı embriyolarda vitellüs kesesinde ödem, perikardiyal ödemle ve omurga ile kuyruğunda eğrilik görüldü (Şekil 12b). 4. gününde bazı embriyolar koryondan çıkış, perikardiyal ödem, vitellüs kesesinde ödem ve kuyrukta eğrilik gözlemlendi (Şekil 12c). Ayrıca 5. gününde koryondan çıkışını henüz yapmış bazı balıkların omurgasında eğrilik, gelişim bozukluğu, vitellüs kesesinde ve perikardiyal kısmında ödem gözlemlendi (Şekil 12d). Bazı embriyoda ise omurgada hasar sonucu kanlanma izlendi (Şekil 13). Bu anomalilere ilaveten ilk 3 günde kalp atışı ortalama dakikada 73 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 12.** 0.906 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları a) 1.gün zebra balığı prelarvası vitellüs kesesinde ödem (çizgi) b) 3. gün zebra balığı prelarvası perikardiyal ve vitellüs kesesi ödem (ok), omurga ile kuyrukta eğrilik c) 4. gün zebra balığı embriyosunda koryondan çıkan balığın kuyruğunda ve omurgasında eğrilik (daire), perikardiyal ödem, vitellüs kesesinde ödem (ok), d) 5. gün koryondan henüz çıkmış zebra balığı embriyosunda omurgada eğrilik (daire), gelişim geriliği, perikardiyal ve vitellüs kesesinde ödem (ok).

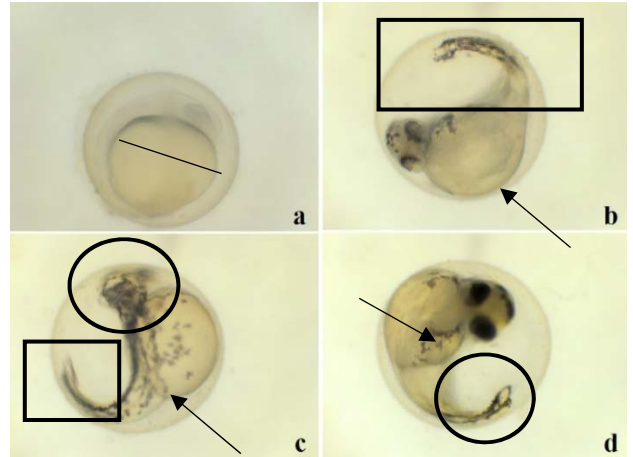


**Şekil 13.** 0.906 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış 5. gün koryondan çıkmış embriyonun omurgasında hasar ile kan birikimi (kare)

### 3.1.7. 1.812 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış grup

Deney grubu dört kere tekrarlanmak üzere; 1.812 mg L<sup>-1</sup> tribenuron metil uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında toplam 80 embriyo içerisinde 63'ü 1. gün öldü. Kalan 17 embriyodan 17'si ise 2 gün yaşayabildi ve bu iki günde anomali gözlemlendi. Gelişimin 1. gününde vitellüs kesesinde ödem (Şekil

14a), 2. gününde yaşayan embriyolarda vitellüs kesesinde ödem, gelişim geriliği ve omurga ile kuyruğunda eğrilik görüldü (Şekil 14b). 2. gününde yaşayan başka embriyoda ise göz ve belirgin kafa oluşumu olmadığı, vitellüs kesesinde ödem ve omurga ile kuyrukta eğrilik olduğu gözlemlendi (Şekil 14c). Yine 2. gününde yaşayan başka bir embriyoda omurgasında eğrilik, gelişim geriliği ve vitellüs kesesinde ödem gözlemlendi (Şekil 14d). Bu anomalilere ilaveten ilk 2 günde kalp atışı ortalama dakikada 63 kez olarak hesaplandı.



**Şekil 14.** 1.812 mg L<sup>-1</sup> Tribenuron metil uygulaması yapılmış embriyo ve larvaları a) 1. gün zebra balığı prelarvası vitellüs kesesinde ödem (çizgi) b) 2. gün zebra balığı vitellüs kesesi ödem (ok), omurga ile kuyrukta eğrilik (kare) c) 2. gün zebra balığı embriyosunun kuyruğunda ve omurgasında eğrilik (kare), vitellüs kesesinde ödem (ok), belirgin göz ve baş yapısının oluşmaması (daire) d) 2. gün zebra balığı embriyosunda omurgada ve kuyrukta eğrilik (daire), vitellüs kesesinde ödem (ok)

### 3.2. İstatistiksel Bulgular

IBM SPSS 23 programı ile kontrol grupları ve uygulama doz grupları normallik testleri sonucu uygun ANOVA testi kullanıldı. ANOVA testi istatistiksel olarak anlamlı farklar çıktığı için, Doz grupları



arasındaki farklar için TUKEY HSD testine göre tribenuron metilin gelişimsel anomalilere neden olduğu ispatlandı ( $p<0.05$ ).

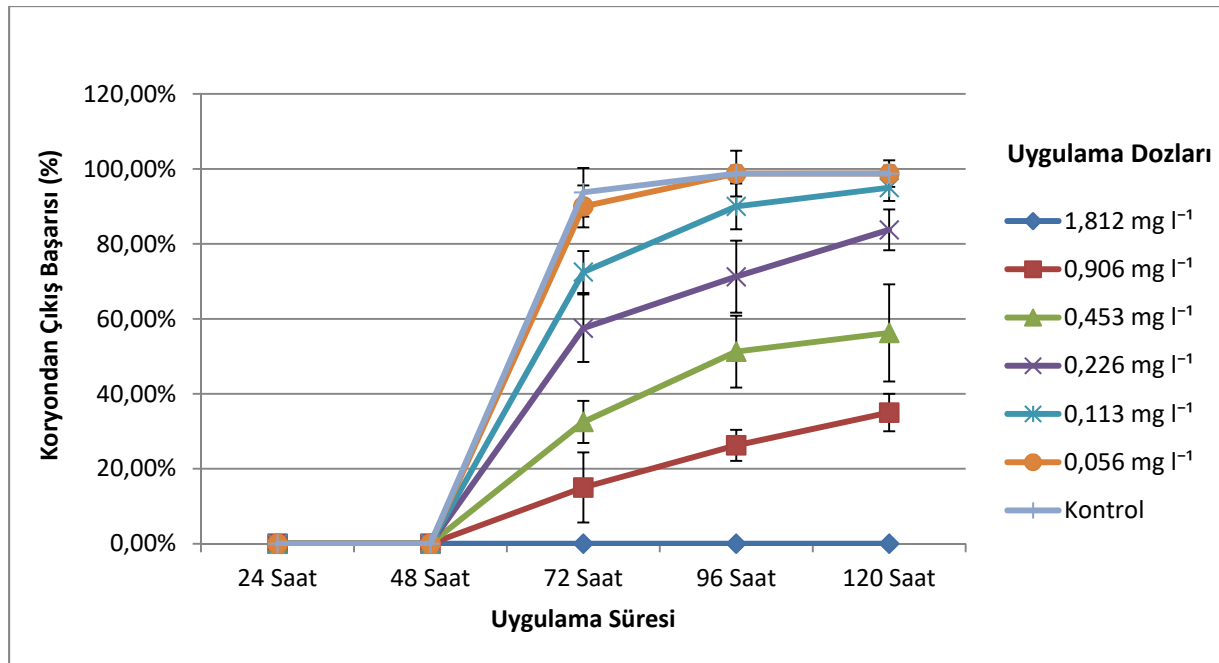
**Tablo 1.** Tribenuron metilin zebra balığı embriyo ve larvalarına gelişimsel anomali oranı tablosu

Tribenuron metilin ZB Anormali Tablosu (Ortalama±Std)					
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
<b>1.812 mg L<sup>-1</sup></b>	4.25±1.09*	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>0.906 mg L<sup>-1</sup></b>	11.00±0.71*	9.50±0.50*	9.50±0.50*	9.50±0.50*	9.50±0.50*
<b>0.453 mg L<sup>-1</sup></b>	6.75±1.09*	6.00±0.71*	6.00±0.71*	6.00±0.71*	6.00±0.71*
<b>0.226 mg L<sup>-1</sup></b>	2.50±0.50*	2.50±0.50*	2.50±0.50*	2.50±0.50*	2.50±0.50*
<b>0.113 mg L<sup>-1</sup></b>	1.25±0.43	1.25±0.43	1.25±0.43	1.25±0.43	1.25±0.43
<b>0.056 mg L<sup>-1</sup></b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Kontrol</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

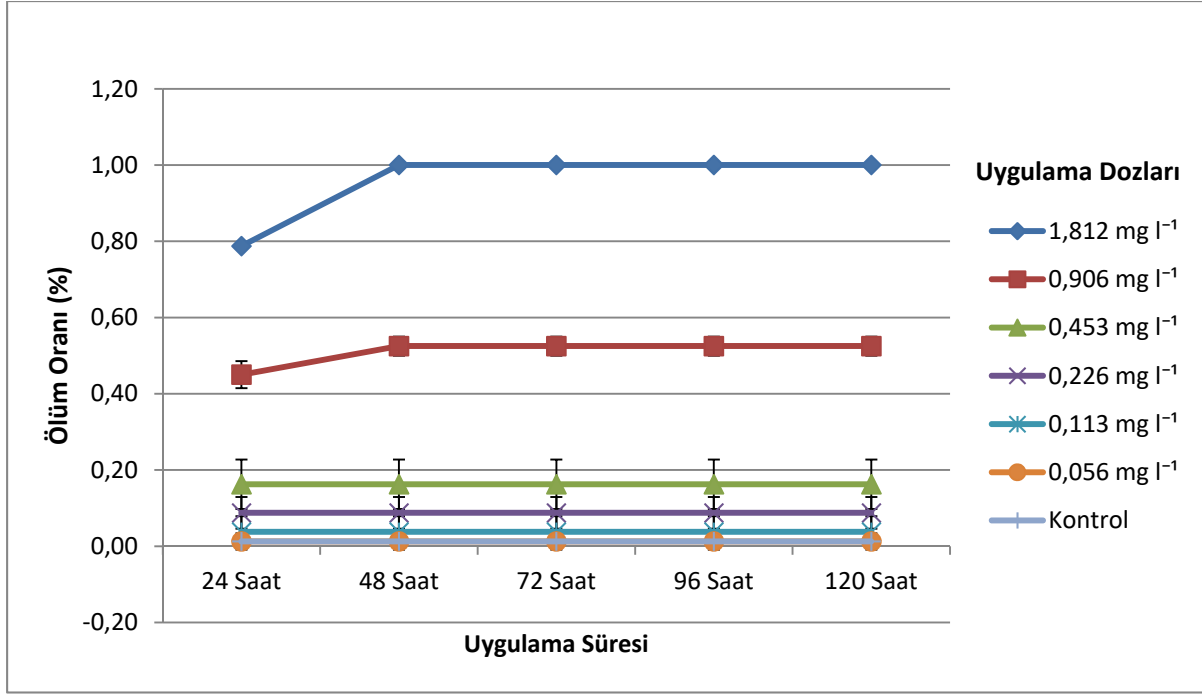
\* Kontrol Grubundan  $p<0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. TUKEY HSD testi.

Tribenuron metil uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarının koryondan çıkış oranı (Şekil 15), ölüm oranı (Şekil 16) ve gelişimsel anomalilerin oranı (Şekil 17) TUKEY testi analiziyle değerlendirildi. Uygulanan tribenuron metil miktarı arttıkça zebra balığı embriyolarının koryondan çıkış

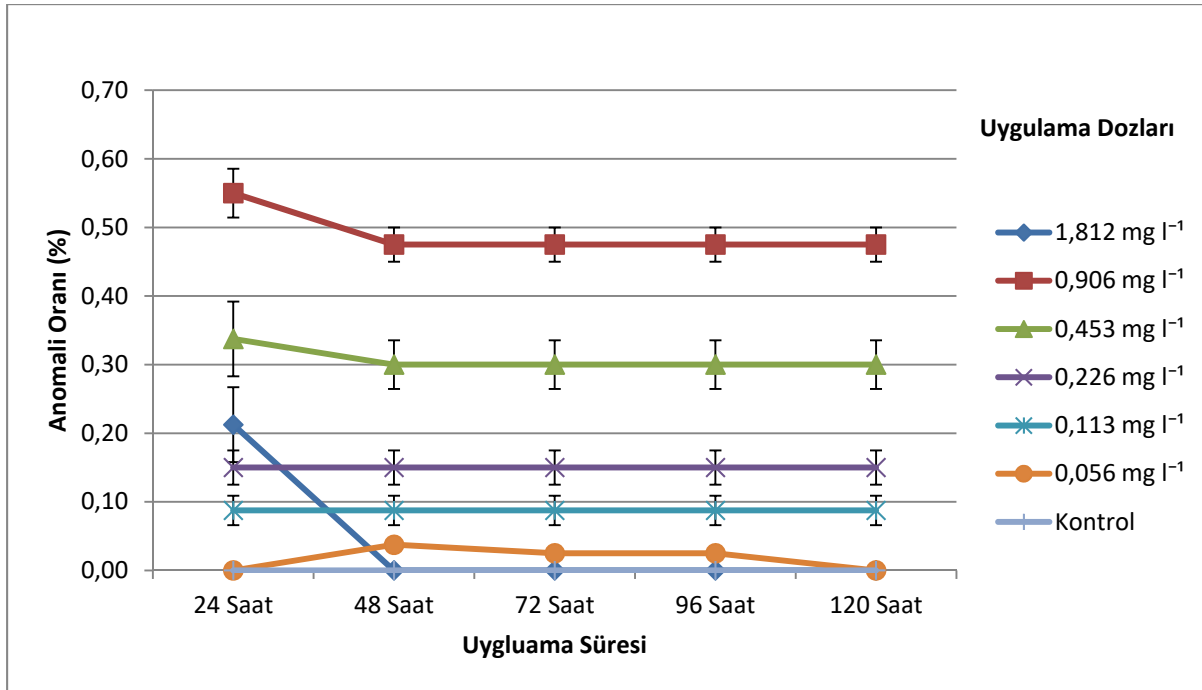
sürelerinin de uzadığı sonucuna varıldı (Şekil 15). Aynı şekilde doz miktarı artışına paralel olarak ölüm (Şekil 16) ve gelişimsel anomali gösteren balıkların sayısının arttığı görüldü (Şekil 17).



**Şekil 15.** Tribenuron metil uygulanmış zebra balığı embriyolarının koryondan çıkış oranları (%).



Şekil 16. Tribenuron metil uygulanmış zebra balığı embriyolarının ölüm oranı.



Şekil 17. Tribenuron metil uygulanmış zebra balığı embriyolarının gelişimsel anomali oranları (%).

#### 4. Tartışma

Bu çalışmada herbisit çeşitlerinden biri olan tribenuron metilin zebra balığı

embriyo ve larvalarındaki etkileri teratolojik açıdan incelenmiştir. Laboratuvar koşullarında elde edilen embriyolara 6 farklı konsantrasyonda (1.812 mg L<sup>-1</sup>, 0.906 mg L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, 0.453 mg L<sup>-1</sup>, 0.226 mg L<sup>-1</sup>, 0.113 mg L<sup>-1</sup>, 0.056 mg L<sup>-1</sup>) tribenuron metil uygulanmıştır. Tribenuron metilin embriyolar üzerinde meydana getirdiği teratolojik hasarlar 120 saat boyunca gözlenmiş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır. İnceleme sonucunda doz miktarı arttıkça koryondan çıkış sürelerinde gecikme, omurga ve kuyrukta eğrilik, perikardiyal ve vitellüs kesesinde ödem ile kalp atış hızında azalma gözlemlendi.

Akbulut ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada LC<sub>50</sub>'ye göre (40, 80 ve 120 mg L<sup>-1</sup>) tribenuron metil, zebra balığı dişilerine uygulanmış ve balıkların ovaryum yapısında meydana gelen değişimler 72. saatin sonunda histolojik yöntemlerle incelenmiştir. Doz miktarı arttıkça ovaryum yapısında vakuolizasyon, ödem ve morfolojik bozulmalar gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışma sonucunda primer ve olgun oosit sayısında doz arttıkça azalmalar olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise embriyo üzerine yapılan incelemede; bu çalışmada olduğu gibi belirlenen LC<sub>50</sub>'ye göre doz arttıkça anomalilerin olduğu belirlenmiştir.

Pestisit çeşitlerinden herbisitlerin sucül canlılar üzerinde ölümcül etkiye sahip olduğu çalışmalarda incelenen konudur (Perez ve ark., 2011). Tribenuron metil; sucül canlılarda az çalışılmıştır. Yön ve ark. (2016) tribenuron metilin zebra balığının dalak dokusundaki hücrelerinde

vakuolizasyon, hiperplazi ve yumuşak dokuda parçalanma meydana getirdiğini tespit etmişler ve 40, 80 ve 120 mg L<sup>-1</sup>'lik doz miktarları arttıkça dalak dokularında anomali durumunun arttığını bildirmişlerdir.

Baghfalaki ve ark. (2012) ise gümüş sazanı (*Hypophthalmichthys molitrix*), aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) ve kardan balığı (*Rutilus rutilus caspicus*)'a 0, 50, 100, 200, 300 ve 500 ppm dozlarında tribenuron metil uygulamışlardır. Doz miktarı arttıkça balıkların davranışsal tepkilerinin (hızlı solungaç hareketi, yüzeyde yüzme hareketi, vücutta pigment azalması ve mukus salgısının artması) arttığını belirtmiştir. Bu çalışma sonucunda Avrupa Birliği Sınıflandırmasına göre tribenuron metil N R 50/53 ECB olduğunu göstermişlerdir. Yani tribenuron metil suda yaşayan canlılar için çok toksik olup uzun vadede olumsuz etkilere neden olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucuna göre ise maddenin zebra balığı embriyolarına zarar verdiği tespit edilmiştir.

Tribenuron metil tarımda herbisit olarak yaygın kullanılmasına rağmen balıklar ve diğer sucül canlılara etkisi hakkında az bilgi vardır. Chen ve ark. (2018), suni toprak içerisinde yaşayan Toprak solucanı (*Eisenia fetida*) üzerine uygulanan tribenuron metil'in etkisini incelemişlerdir. Çalışmada maddenin solucanda selüloz aktivite azalması ve bununla birlikte toprağın yapısını olumsuz

yönde etkilediğini sonuçlandırmışlardır. Maddenin tahriş etme ve yok etme yapısından dolayı zarar verdiği düşünülmüştür. Rachedi ve ark. (2018) ise tribenuron metili, toprakta yaşayan ve ekolojik döngüyü sağlayan aktinobakterilere (Actinobacteria) uygulayarak büyüme ve karakteristik direnç durumlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda maddenin aktinobakterilerde (Actinobacteria) morfolojik hasar oluşturduğu ve canlının maddeye karşı adaptasyon göstermediği ve direnç oluşturmadığını belirtmişlerdir. Marzouk ve ark. (2012), tribenuron metilin sıçanda (*Rattus*) kemik iliği hücrelerindeki sitogenetik etkilerini incelemişler ve maddenin zararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre dozlar 5, 25, 50 ve 100 mg ve 48 saat aralıkla 21 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda doz miktarı arttıkça mitotik aktivitede azalma ile kromozomal anomaliliklerin sıklığında artış göstermişlerdir.

Herbisit çeşitlerinin, balık gelişimine teratolojik etki vermesi çalışmalarda incelenen konudur. Wiegand ve ark. (2001), Atrazine'nin (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine) zebra balığı (*Danio rerio*) gelişimi üzerindeki teratolojik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 4, 10 ve 20 mg L<sup>-1</sup> doz solüsyonları içerisindeki embriyoların gelişimi 48 saat boyunca izlenmiştir. Çalışma sonucunda doz arttıkça

koryon çıkışında gecikme, epiboli süresinde gecikme ve kalp, dolaşım gibi fonksiyonel bozukları tespit etmişlerdir. Maddenin balık gelişimine morfolojik hasarlar bıraktığı düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiştir.

Perez ve ark. (2013), s-trazin (atrazin ve terbutilazin) herbisit zebra balığı (*Danio rerio*) gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada ikili herbisit karışımından oluşan solüsyonun, embriyoda sinerjistik etki ve morfolojik bozulmalara neden olduğu; ayrıca larvada yüzme davranışlarında bozulma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise kullanılan herbisit dozu arttıkça, zebra balığı larvasında vitellüs kesesinde ödem ve omurgada var olan eğriliğinden dolayı dengeli yüzemediği gözlenmiştir. Velki ve ark. (2017) Diuron adlı herbisit zebra balığı (*D. rerio*) embriyo ve larvalarının akut toksisitesi ve davranışlarına etkilerini incelemişlerdir. 1.2 ve 3.8 mg L<sup>-1</sup> Diuron uygulamaları sonucu embriyolarda davranışsal değişiklikler, koryon içerisinde kendiliğinden kıvrılma hareketlerinde azalma ve doz arttıkça kalp atışında azalma tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise kullandığımız tribenuron metilin dozu arttıkça kalp atışında azalma olduğu görülmüştür.

Bir herbisit türü olan metamifob zebra balığı embriyolarında anormalliklere neden olmuş, embriyolarda oksidatif stres ve

hücre apoptozunu indüklemiştir (Zhao, 2019). Farklı dozda benoxacor uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarında çok sayıda malformasyon gözlenirken, en belirgin malformasyon vücut eğriliği olduğu açıklanmıştır. Bunun yanında kalp atış sayısında azalma olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2020). Chen ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada tralopiril uygulanması sonucu zebra balığı embriyolarında gelişimsel toksisite gözlenmiştir. Tralopiril'in zebra balığı embriyolarında tiroit hormon konsantrasyonunu düşürdüğü, amino asit ve lipit metabolizmasını etkilediği açıklanmıştır. Embriyonik gelişimdeki bozukluğun metabolizma ve tiroit sistemi bozukluğundan kaynaklanabileceği açıklanmıştır. 2,4-D uygulaması zebra balığı embriyolarında, boyda kısılma, perikardiyal ödem ve vitellüs kesesi malformasyonlarına neden olmuştur (Li ve ark., 2017).

### Kaynaklar

- Akbulut C, Ozturk B, Uzun A, Yon ND (2017). Tribenuron methyl exposure inhibits oogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Indian J Fish* 64: 127–131.
- Baghfalaki M, Shalvei F, Hedayati A, Jahanbakhshi A, Khalili M (2012). Acute toxicity assessment of tribenuron-methyl herbicide in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), common carp (*Cyprinus carpio*) and Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). *Global Veterinaria* 8: 280–284.
- Chen J, Saleem M, Wang C, Liang W, Zhang Q (2018). Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm (*Eisenia fetida*). *Scientific Reports* 8: 1–9.
- Chen X, Teng M, Zhang J, Qian L, Duan M, Cheng Y, Zhao F, Zheng J, Wang C (2020). Tralopyril induces developmental toxicity in zebrafish embryo (*Danio rerio*) by disrupting the thyroid system and metabolism. *Science of the Total Environment* 746: 141860.

Sonuç olarak, farklı herbisitlerin canlıların embriyo, davranış ve dokuları üzerine olumsuz etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda herhangi bir model organizmada tribenuron metilin embriyo üzerine etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu bağlamda çalışmamız öncü bir çalışmadır. Farklı dozlarda olsa bile herbisitlerin ekosisteme girmesi pek çok canlıya zarar vermektedir. Bu bağlamda tribenuron metil ve bunun gibi herbisitlerin maruziyetinden mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Tribenuron metil uygulamasının dokuların hücre morfolojisinde değişimlere sebep olduğu histolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın bu konuda yapılacak diğer çalışmalara temel olacağı düşünülmektedir.



- EPA (Environmental Protection Agency) (2009). Types of Pesticides. Washington D.C., USA.
- Glaberman S, Padilla S, Baron MG (2017). Evaluating the zebrafish embryotoxicity test for pesticide hazard screening. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 1221–1226.
- Glaberman S, Padilla S, Barron MG (2017). Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environ Toxicol Chem* 36: 1221–1226.
- IBM Corp (2015). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF (1995). Stages of embryonic development of zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253–310.
- Li K, Wu J, Jiang L, Shen L, He Z, Wei P, Lv Z, He MF (2017). Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere* 171: 40–48.
- Liu S, Deng X, Bai L (2020). Developmental toxicity and transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to chiral herbicide safener benoxacor. *Science of the Total Environment* 143273.
- Marzouk A, Mossa H, Sabra F (2012). Cytogenetic effects of technical and formulated Tribenuron-methyl on rat bone-marrow cells. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 7: 330–337.
- Perez GL, Vera MS, Miranda LA (2011). Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. *Herbicides and Environment* 16: 343–368.
- Pérez J, Domingues I, Monteiro M, Soares AM, Loureiro S (2013). Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research* 20: 4671–4680.
- Rachedi K, Zermane F, Tir R, Ayache F, Duran R, Lauga B, Boulahrouf A (2018). Effect of sulfonyleurea tribenuron methyl herbicide on soil actinobacteria growth and characterization of resistant strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 79–86.
- Toros S, Maden S (1985). Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Tyler SA, Gurian J (1950). Determination of the LD<sub>50</sub> by use of probit, angular, and logit transformations. United States. <https://doi.org/10.2172/4420363>
- Velki M, Paolo C, Nelles J, Seiler T, Hollert H (2017). Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180: 65–76.
- Vural N (1984). Toksikoloji. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S (2001). Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 199–205.
- Yön ND, Öztürk B, Akbulut C (2016). Histological effects of tribenuron methyl spleen tissue of zebrafish. 2<sup>nd</sup> International Congress of Forensic Toxicology Industrial and Environmental Toxicology, Ankara-Turkey.
- Zhao F, Li H, Cao F, Chen X, Liang Y, Qui L (2019). Short-term developmental toxicity and potential mechanisms of the herbicide metamifop to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere* 236: 124590.