

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI AĞIR METALLERİN *Eisenia andrei* (TOPRAK SOLUCANI)
ÜZERİNE GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE ETKİSİ

Ahmet Aşkın YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI AĞIR METALLERİN *Eisenia andrei* (TOPRAK SOLUCANI) ÜZERİNE GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE ETKİSİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Eisenia andrei türü solucanlar, hem çevresel hem de ekonomik açıdan faydalı olmaları sebebiyle çok önemli ve organik atıkların yönetimi için sıklıkla kullanılan organizmalardır. Ekotoksikoloji, fizyoloji, genetik çalışmalarda yaygın kullanımları nedeniyle bu tez çalışmasında da biyobelirteç olarak seçilmiştir. Gerçekleştirilen bu tez kapsamında kadmiyum ve bakır ağır metallerinin üç farklı konsantrasyonda (LC_{50} değerlerinin yarısı, iki katı ve LC_{50} değerine yakın olacak şekilde ayarlanmış), 14 gün süreyle *Eisenia andrei* türüne uygulanması ve etkilerinin gen düzeyinde incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda OECD' nin uygun gördüğü test toprağı hazırlanmış ve 10 adet plastik kutuya bölünerek ardından ağır metaller ortama eklenmiştir. Uzun süreli karıştırıldıktan sonra homojen hale getirilen toprak numuneleri toprak analizine MTA Genel Müdürlüğü' ne gönderilmiş ve ardından solucanlar ortama alınmıştır. Topraktaki ayarlanan ağır metal konsantrasyonları; kontrol, 500, 1000, 2000 ppm Cd, 250, 500, 1000 Cu, 500 ppm Cd +250 ppm Cu, 1000 ppm Cd +500 ppm Cu, 2000ppm Cd+1000 ppm Cu şeklindedir. Her düzenekten 24 saat ve 14 günün sonunda örneklem alınmış, ağır metal uygulamasından önce ve sonra solucanlar tartılmıştır. Daha sonra RNA izolasyon basamağına geçilmiş, agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. İzole edilen RNA' lardan cDNA sentezlenmiş, sentezin sonrasında Real-Time PCR ile Metallothionein geninin ekspresyon profiline bakılıp, veriler analiz edilmiştir. Bu gen, ağır metal detoksifikasyonunda çok önemli role sahiptir. Yapılan ağırlık ölçümleri analizleri sonucunda, ağır metal uygulaması yapılan topraklardaki solucanlarda genel manada anlamlı azalma görülmüştür. Hayatta kalma oranları ise % 76 ile % 0 sıfır arasında dağılım göstermiştir. Real-Time PCR sonuçlarına bakılacak olursa, Metallothionein geninin ekspresyon seviyesinde, ağır metal oranları sabitken, zaman faktörü ile önemli derecede artış görülmüştür. Zaman sabit tutulduğunda ise, sadece Cd uygulamasında, artan konsantrasyonlarla doğru orantılı olarak anlamlı seviyede azalma görülmüştür. Cu uygulamasında ise 1 gün için, 250 ppm 'den 1000 ppm 'e çıktığında yaklaşık 95 kat artış görülürken, 14 günde yaklaşık 2 kat artış görülmüştür. İki metal birlikte uygulandığında ise 1 gün için profil, sadece Cd uygulandığındaki gibidir. 14 gün maruz kalanlar için ise şablon sadece Cu uygulamasındaki gibidir ve anlamlı bir artış söz konusudur. Bu çalışma, *Eisenia andrei* türü organizmaya, Cd ve Cu' un birlikte, LC_{50} değerlerinin yaklaşık 2 katı dozun uygulandığı, bu dozlara maruz kalan solucanların gen ekspresyon profilinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Mayıs 2020, 38 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, LC_{50} , RT-PCR, in vivo, UV spektrofotometri, Metalloiyonin, Bakır, Kadmiyum

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT HEAVY METALS ON THE *Eisenia andrei* (SOIL WORM) ON THE GENE EXPRESSION LEVEL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E .Sümer ARAS

Eisenia andrei is very important species used for the management of organic wastes because it is both environmentally and economically beneficial. It was chosen as a biomarker in this thesis project because of its widespread use in ecotoxicology, physiology and genetic studies. In this study, it was aimed to apply cadmium and copper heavy metals to *Eisenia andrei* in three different concentrations (adjusted to be close to half, twice the LC₅₀ value and LC₅₀ value) for 14 days and to examine their effects at the gene level. In this context, the test soil deemed appropriate by the OECD was prepared and divided into 10 plastic boxes and then heavy metals were added to the environment. In this context, the test soil prepared appropriately by the OECD approved standart and divided into 10 plastic boxes and then heavy metals were added to the environment. Soil samples, which were homogenized after long-term mixing, were sent to MTA for the soil analysing and then worms were taken to the test environment. The heavy metal concentrations set in the soil are control, 500, 1000, 2000 ppm Cd, 250, 500, 1000 Cu, 500 ppm Cd 250 ppm Cu, 1000 ppm Cd 500 ppm Cu, 2000ppm Cd 1000 ppm Cu. Samples were taken from each setup at the end of 24 hours and 14 days and worms were weighed before and after heavy metal application. Then, RNA isolation step was fallowed and the integrity and quality was checked by agarose gel electrophoresis. From the isolated RNAs, cDNA was synthesized, the expression profile of the Metallothionein gene was examined by Real-Time PCR and the data were evaluated. This gene has a very important role in heavy metal detoxification. As a result of the weight measurements analysis of the worms, a significant decrease was observed in the worms in the soil which the heavy metals were applied. Also their survival rates ranged from 76% to 0% zero. Considering Real-Time PCR results, Metallothionein gene expression level increased significantly with time factor while heavy metal ratios were constant. When the time was kept constant, a significant decrease was observed in Cd application only in direct proportion with increasing concentration. In Cu application, when it is increased from 250 ppm to 1000 ppm for one day, approximately 95 times increase was observed in expression, while in 14 days it increased approximately two times. When the two metals are applied together, the profile is for one day, revealed the same result with Cd application. For those who are exposed to 14 days, the pattern is just like Cu application and there is a significant increase. This study is the first study in which approximately twice the dose of Cd and Cu is applied to the *Eisenia andrei* and LC₅₀ values and the metallothionein gene expression profiles are displayed in worms exposed to these doses.

May 2020, 38 Pages

Anahtar Kelimeler: *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, RT-PCR, in vivo, UV spectrophotometer, Metallothionein, Copper, Cadmium

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkânı sunan ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. E. Sümer Aras'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Araştırmalarımda yardım ve desteğini benden esirgemeyen, tezin her safhasında bana katkılarını sunan Sayın Doç. Dr. İlker Büyük'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Araştırmalarımda kullandığım solucanları ve kitleri temin etmede yardımcı olan, bana bir süre laboratuvarını açıp, desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hatice Mergen'e (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü);

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Simay Akbulut, Aybüke Okay ve Özlem Bakır'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olan sevgili aileme; sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ahmet Aşkın YILMAZ
Ankara, Mayıs 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1 Materyal	11
3.1.1 Solucalar	11
3.1.2 Topraklar	11
3.1.3 Kitler.....	11
3.2 Yöntem	12
3.2.1 Solucanların temini ve tanımlanması	12
3.2.2 Solucanlara ağır metal uygulanması ve örneklem alınması.....	13
3.2.3 RNA izolasyonu	17
3.2.4 Total RNA örneklerinin jel elektroforezi.....	17
3.2.5 cDNA sentezi.....	17
3.2.6 Real time PCR	18
3.2.7 İstatistiksel analiz	19
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	20
4.1 Toprakların Hazırlanması ve Ağır Metal Konsantrasyonu.....	20
4.2 Solucanlar Örneklerinin Ağırlık Değişimi ve Hayatta Kalma Oranları.....	22
4.2.1 Solucan örneklerinin alınması	22
4.2.2 Hayatta kalma oranları	25
4.3 RNA İzolasyon sonuçları	26
4.4 RNA 'ların Jel Elektroforezde Görüntülenmesi	28
4.5 Real-Time PCR Sonuçları	29
5. SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	38

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
°C	Santigrad Derece
Cd	Kadmiyum
Cq	Quantification cycles
Cu	Bakır
Da	Dalton
GST	Glutatyon S-Transferaz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
dk	Dakika
g	Gram
h	Saat
L	Litre
LC _{50x}	Letal Konsantrasayon
M	Molar
MC	Metallotiyonin
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Potential of Hydrogen
ppm	Parts per million
sn	Saniye
V	Volt

Kısaltmalar

ANOVA	Analysis of Variance
BLAST	Basic Local Alingment Search Tool
cDNA	Complementary DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinukleotidtrifostat karışımı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikası
IWEE	International Workshop on Environmental Engineering
MÖ	Milattan Önce
MTA	Maden Tetkik Arama
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OECD	Organisation for Economic Co- operation and Development
RNA	Reoksiribonükeik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Eisenia andrei türü solucanın anatomisi (Hong vd. 2001'den uyarlanmıştır) ...	2
Şekil 3.1 Elde edilen dizinin analiz gösterimi.....	12
Şekil 3.2 Dizinin alignment sonuçları	13
Şekil 3.3 En yüksek skorlu alignment sonucu	13
Şekil 3.4 Test toprağı	15
Şekil 4.1 Ağır metal koyulmadan önceki test toprağı analiz sonuçları.....	20
Şekil 4.2 Ağır metal eklendikten sonraki toprak numunelerinin analiz sonuçları	21
Şekil 4.3 Ağırlık değışimlerinin grafiksel gösterimi.....	25
Şekil 4.4 RNA 'ların jel elektroforez gösterimi	29
Şekil 4.5 Metallothionein gen ekspresyon değışiminin grafiksel gösterimi	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kitler, kodları ve firmalar	11
Çizelge 3.2 Real-Time PCR 'da kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	19
Çizelge 4.1 Analize gönderilen toprak numunelerinin numaraları	21
Çizelge 4.2 Uygulamadan önce tartılan 50 solucanın ağırlıkları	23
Çizelge 4.3 Ağır metal uygulamasından sonra yaşayan birey sayısı, ağırlıkları ve ortalamaları.....	24
Çizelge 4.4 Her bir test toprağındaki solucanların başlangıç ve 2. hafta ağırlık ortalamaları.....	25
Çizelge 4.5 Solucanların hayatta kalma oranı	26
Çizelge 4.6 Solucanların numaraları, RNA ' larının saflık oranları ve konsantrasyonları	27
Çizelge 4.7 Metallothionein gen ifadesinin analiz sonuçları	30

1. GİRİŞ

Solucanlar hem çevresel hem de ekonomik açıdan faydalı olmaları dolayısıyla çok önemli organizmalardır. En önemli toprak ekosistem mühendisleri olarak tanınırlar. Eski Mısır' da, Kleopatra döneminde (M.Ö 69-30), toprak solucanları kutsal hayvan ilan edilmiştir. O dönemde toprak solucanlarının, dünya tarihi boyunca diğer hayvanlardan daha fazla rol oynadığı belirtilmiştir (Sehar vd. 2016).

Toprak solucanlarının topraktaki aktivitelerinin, toprak ekosisteminin işleyişinin yanı sıra mikro-flora ve mikro-fauna türleri ve sayıları üzerinde derin bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 4000-6000 toprak solucanı türü vardır, ancak bu sayı muhtemelen grubun dünyadaki çeşitliliğinin yarısını temsil eder. *Eudrillus eugeniae*, *Eisenia fetida* ve *Eisenia andrei*, ülkelerin çoğunda solucan gübresinde kullanılan toprak solucanlarından birkaçıdır (Sehar vd. 2016). Taksonomik sınıflandırması şu şekildedir:

Regnum: Animalia

Phylum: Annelida

1. Sınıf Polychaeta

2. Sınıf: Oligochaeta

1. Familya: Lumbricidae

1. Cins: *Lumbricus* spp.

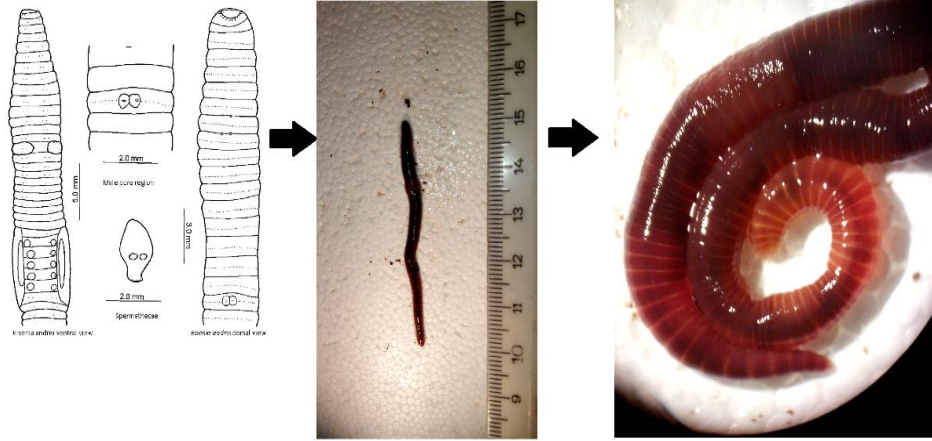
2. Cins: *Eisenia* spp.

(Kaygorodova ve Sherbakov 2006)

Eisenia cinsine mensup bireyler kırmızımsı renkli, epilobousları prostomium, birbirine yakın çift şekilde setalara sahip, ilk 5 segmentin yaklaşık 4' ünde dorsal gözenek, 10.' da kesesiz kalsifer bezi, 9-12 segmentler arası dört çift vezikül, 9/10 ya da 10/11' de iki çift sperm kesesi, görünmeyen nefroporlar ve düzensiz değişen mesanelere sahiptir (Jadwiga vd. 2015).

Eisenia andrei, organik atıkların yönetimi için en yaygın kullanılan solucanlardan biridir. Aynı zamanda ekotoksikoloji, fizyoloji, genetik çalışmalarda kullanılan, özellikle dünya çapında geniş dağılım gösteren, yaşam döngüleri kısa, geniş sıcaklık ve nem tolerans aralığına sahip canlılardır. Haploid durumda (n=11) 11 adet kromozomları vardır. İlk olarak *Eisenia foetida*'nın farklı bir morfotipi olarak kabul edilse de, isimleri *Eisenia foetida foetida* ve *Eisenia foetida unicolour* olarak kabul edilmiştir ancak şu an literatürde iki ayrı tür olarak kabul görmektedirler. *Eisenia andrei* tekdüze kırmızı renge sahiptir. Sintopik tür olmasından dolayı gübre ve kompostlarda karışık kolonilerde yaşarlar (Domínguez vd. 2005).

Türkiye’de de solucan gübresi üretiminde kullanılan solucanların başında gelir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *Eisenia andrei*’den elde edilen gübrenin, bitki verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneylerde bitkinin, bu tür solucanın kullanıldığı topraktan, kullanılmayana kıyasla daha çok mineral aldığı ve daha hızlı gelişim gösterdiği geçmiş literatür bilgisinde yer almaktadır (Bellitürk 2018).



Şekil 1.1 *Eisenia andrei* türü solucanın anatomisi (Hong vd. 2001’den uyarlanmıştır)

Uzunluk: 48-95 mm

Çap: 2,8-4,0 mm

Gövde: Kesikli silindirik

Segment: 75-98

Seta: Çift halinde birbirine çok yakın

Prostomium: Epilobus

Vücut Pigmentasyonu: Koyu kırmızımsı kahverengi

Dorsal Pore: İlk 4/5 veya 5/6 pigmentte (Hong vd. 2001).

Özellikle metalürjik olan insan aktiviteleri, toprakta metal elementlerin birikmesine neden olur. Ağır metallerin toprakta birikimi, insan sağlığı için bir tehdittir. Daha önce yüksek kadmiyum konsantrasyonundan kaynaklı kanser vakaları tanımlanmıştır. Ek olarak metal eser elementlerin yüksek miktarda bulunması, hayvanların üreme ve bağışıklık sistemlerinde strese yol açarak bozulmalara neden olur. Metal elementler, toprakta maruz kalan canlılar üzerinde bir stres oluşturabilir. Metallerin neden olduğu detoksifikasyon mekanizmalarını ve fizyolojik değişiklikleri daha iyi anlamak için kirli toprakla temas halinde olan bitkiler ve hayvanlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Moleküler biyolojik tekniklerin ekotoksikolojiye uygulanması ile birlikte, canlı organizmalarda kirletici maddelerin etki mekanizmaları daha iyi anlaşılmıştır. Çevresel stresörler ve genom arasındaki ilk entegrasyon, gen ekspresyon profilleridir. Organizmalar, dışsal değişikliklere tepkisini protein sentez yoluyla gösterirler. Bu nedenle, güçlü bir araç olan gen ifadesindeki değişikliklerin analizi, bir popülasyonda bir stresin varlığını teşhis etmek ve bu strese karşı verilecek olan cevabı mekanik kurallara göre analiz etmek için kullanılır (Brulle vd. 2008b).

Biyolojik sistemlerde iz metallerin eldesi; büyüme, solunum, iç sinyal ve diğer gerekli faaliyetler için esastır. Ancak, bu köklü bağımlılığın sonucu olarak, aşırı derecede yüksek reaktif ve potansiyel olarak tehlikeli temel metallerin yanı sıra, temel elementlerin analogları olarak dokulara giren toksik metallerin zarar vermesinden kaçınmaları gerekir. Bunlardan biri olan kadmiyum, başlıca metal kaplamalarda ve nikel-kadmiyum bataryalarda kullanılır. Ayrıca kadmiyum; madenlerin eritilmesi, fosil yakıtların kullanılması, çöp yakma, kentsel trafik ve fosfatlı gübre kullanımı gibi faaliyetlerle atmosfere ve toprağa sürekli salınmaktadır (Wang vd. 2010).

Ağır metaller işlevsel olarak iki ayrı gruba ayrılır: demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn) gibi temel metaller; civa (Hg), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) gibi temel olmayan elementler. Temel metaller, çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan kofaktörler olarak bazı enzimlerde ve elektron transfer proteinlerinde katalitik görevler üstlenirler. Tüm ağır metaller, oranlarına ve oksidatif strese neden olmalarına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katılırlar. Ayrıca temel olmayan elementler, biyomoleküllerle doğrudan etkileşime girerek ya da biyomoleküllerle yer değiştirerek çeşitli biyolojik süreçleri inhibe edebilirler. Dolayısıyla canlılar için oldukça zararlıdırlar. Günümüzde sanayi faaliyetleri, madencilik, atıkların serbest bırakılması, kanalizasyon suları, tarımda ağır metal içeren pestisit kullanımı ve dengesiz mineral içeren gübre kullanımı gibi etkenler ağır metal kirliliğine neden olmaktadır (Brulle vd. 2008b).

Uygulanacak bir diğer metal Bakır (Cu)' dır. Bakır, canlılar için gerekli ve hayati öneme sahip metallerden biridir. Elektron transfer reaksiyonu gibi pek çok önemli reaksiyonların gerçekleşmesinde görev alır (Sitokrom oksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi). Memeli canlılarda Cu^{2+} , oksijen taşınmasında görevli, alyuvarların yapımında da payı olan bir elementtir. Bitkilerde ise bakır, klorofilin yapısında yer alır ve enzimlerin doğru çalışması için iz miktarlarda bulunması gerekir. Bakır omurgasızlarda ise, hemosiyaninin (kanda oksijen taşıyan pigment) yapısına girer, bu yüzden omurgasızların kanı yeşil-mavidir. Metabolizmada fazla miktarda bulunması toksik etkiye sebep olur. Etki ettiği canlının yapısına, boyutuna, bakırın kimyasal formuna, doza ve maruz kalma süresine göre canlılar üzerinde oluşturduğu negatif etkiler değişiklik gösterir. Bu nedenle kompleks ve büyük yapıdaki organizmalarda vücutta bulunduğu oran elzemken, küçük ve basit yapılı canlılarda aynı miktar ölümcül etki yaratır. Doğada birikmesi, özellikle sanayi atıklarının suya karışması ve pestisit kullanımı ile gerçekleşir (Ustaoğlu vd. 2015).

Toprakta metal birikimi canlılar için her zaman tehdit oluşturmuştur. Bu kirlilik, bir hücreli mikroorganizmalardan en yüksek yapılı canlılara kadar bütün yaşam formlarını etkilemektedir. Evrimsel süreçte canlılar, ağır metalleri detoksifiye etmede birçok yöntem geliştirmişlerdir. En önemlilerinden biri genetik olarak verilen cevaptır. Genetik

cevap için bu çalışmada inceleme yapılacak olan gen Metallothionein' dir (Homa vd. 2015).

Ekotoksikolojide moleküler biyolojik tekniklerin uygulanmaya başlanması, organizmalarda kirletici maddelerin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Wang vd. 2010). Toprak solucanları, toprak biyokütlesinin ana bileşenleri arasındadır ve toprağın yapısını, verimliliğini korumada major öneme sahiptirler (Peijnenburg vd. 1999). Annelida, Oligochaeta grubu, en çok incelenen faunistik gruplardan biridir. Çoğu kıta ekosisteminde önemli rol oynayan bu hayvanlar; toprak mikrofaunasının ciddi bir bölümünü temsil etmekte, yapının korunması ve toprağın verimliliğinin sürdürülmesinde görev almaktadır. Annelidler, metal kirliliğinden büyük oranda etkilenirler. Toprağın metalik kirlenmesi; cinsel olgunlaşmayı geciktirebilir, enzimatik aktiviteyi değiştirebilir, büyümeyi yavaşlatabilir ve gen ekspresyonunu düzenler (Brulle vd. 2008b).

Uzun yıllar boyunca gen ekspresyon profillerinin analizleri sayesinde Oligochaeta'daki biyobelirteç adayları tanımlanmıştır. Bunlardan en iyi bilineni Metallothionein' dir (MT). Sistein bakımından zengin (yaklaşık % 30), düşük molekül ağırlığına sahip (6000-8000 Da) bu protein, kadmiyum gibi metallerin detoksifikasyonunda ve çinko gibi temel eser elementlerin homeostazisinde görev alır. Metallothionein (MT), metal maruziyetinin iyi bir biyomarkeri olarak kabul edilir çünkü solucanlarda metallerle maruz kaldığında MT' yi kodlayan transkriptlerin ve proteinlerin, doz ve zamana bağlı artışı gözlenir (Brulle vd. 2008b). Metallothioneinler, sitotoksositeye karşı hücreyi metal iyonlarından koruyan, şelat bakımından zengin protein/peptid ailesidir. Çoğu hayvanda, ağır metallerle tolerans, aromatik amino asitlerin yokluğu ve at MT' sine sınırlı homoloji ile karakterize edilen, Metallothionein indüksiyonuna bağlıdır. Genomik olarak kodlanmış Sınıf II MT' lerin transkript seviyelerini ölçerek metallerin toprak makro omurgasızları üzerindeki etkisini tahmin etmek, oligochaete solucanları olan *Lumbricus rubellus* ve *Eisenia fetida*, nematod *Caenorhabditis elegans* ve bahar kuyruğu *Orchesella cincta* dahil olmak üzere bir dizi karasal türde gerçekleştirilmiştir (Brulle vd. 2008a).

Toprak solucanlarındaki biyobelirteç çalışmalarının geçmişi IWEE I' in (International Workshop on Environmental Engineering) çok ötesine uzanır. Stenersen ve arkadaşları (1979), glutatyon-S-transferaz (GST) ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu gibi bir dizi iyi yapılandırılmış biyobelirteç olduğunu ve solucanlara uygulanabileceğini göstermiştir. Bu öncü çalışmadan bu yana, yararlı biyobelirteçlerin sayısı büyük ölçüde artmıştır. Bu biyobelirteçler dört ana tipte kategorize edilebilir:

- 1) Hücresel fonksiyon ve bütünlüğün etkilerini ölçmek için hücresel bazlı analizler: Bunlar, nötr kırmızı birikim deneyi kullanılarak lizozomal membran stabilitesinin ölçülmesini; organik kirleticiler ve metallerin etkilerini ölçmek için bağışıklık aktivitesi analizleri; genotoksinlere maruz kaldıktan sonra DNA iplik kopmasının ölçülmesi ve sperm sayısı, morfolojisinin değerlendirilmesi için DNA komet analizidir.
- 2) Detoksifikasyon enzimleri ve proteinlerinin aktivitesinin ölçülmesi: Bu çalışmalar içinde, faz 1 sitokrom P450 enzimlerinin, GST' ler gibi faz 2 enzimlerinin ölçümlerini; süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi antioksidanların aktivitesi ve metallothioninlerin ekspresyon ölçümleri örnek verilebilir.
- 3) Moleküler yanıtlar, doğrudan detoksifikasyon mekanizmalarından ziyade maruziyetin etkilerine bağlıdır. Sitokrom C oksidaz ve mitokondriyal büyük alt birim gen, lizozomal membrana bağlı genler ve metal içeren enzimler gibi mitokondriyal genlerin regülasyonunun artmasına (mRNA seviyesinde) rağmen, en iyi bilinen protein şaperonlarıdır. Bu alandaki en son çalışmada, önemli bir yaşam döngüsü özelliği olan, üreme ile olası bir bağlantı gösteren moleküler belirteçler tanımlanmıştır.
- 4) Son biyobelirteç grubu, bireysel yanıtlara odaklanmak yerine, tam veya kısmi transkriptom, proteom veya metabolom içindeki yanıtı kaydeder. Kapsamlı metabolik profil oluşturma (NMR spektroskopisi kullanılarak); bakıra,

tarlalardaki metal karışımlara ve florlu organik bileşiklere maruz kalan solucanlardaki spesifik düşük moleküler ağırlıklı metabolit değişiklikleri tanımlamak için kullanılmıştır. Son zamanlarda, kimyasal savaş ajanlarına konsantrasyon tepkilerini değerlendirmek için protein imza kalıpları kullanılmıştır.

IWEE III, potansiyel biyobelirteç yanıtlarının mekanik temelini daha ileri analizlerini önermiştir. Öngörülen çalışma tipine bir örnek Stürzenbaum Metallothionein'dir. Stürzenbaum ve arkadaşları, MT-2 kadmiyum tarafından daha güçlü bir şekilde düzenlenmiş olmasına rağmen, solucanlarda iki ana metallothionein (MT-1 ve MT-2) izoformunu tanımlamışlardır. MT-2' nin biyokimyasal çalışmaları, rekombinant proteinin molekül başına 6 kadmiyum atomuna bağlandığını göstermiştir. Amino asit sekansının analizi, proteinin hücre içi organellere entegrasyonunu kolaylaştırmak için translasyon sonrası modifiye edilebildiğini göstermiştir. Bu bölümlendirme daha önce solucanlarda bulunmuştur ve immünohistokimya ile, MT-2' nin bağırsakları çevreleyen hücreler içindeki veziküllerde konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir (Spurgeon vd.).

Projede bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) ağır metalleri, belirli oranlarda, toprak ortamında solucanlara in vivo olarak uygulanmıştır. Uygulama bu iki metal için hem ayrı ayrı, hem de birlikte olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deneyler, *Eisenia andrei* türü solucanla, OECD tarafından belirlenen toprakta ve koşullarda gerçekleştirilmiştir ve deney koşulları şu şekilde planlanmıştır:

<u>Toprak Türü</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Nem</u>	<u>pH</u>
% 70 Kuvars Kum	22° C	% 60 sabit nem	7.0 ± 0.1
% 20 Kaolinit Kili			
% 10 Sfagnum			

(Brulle vd. 2007).

Bu araştırmanın amacı *Eisenia andrei* türü solucanda Metalloproteinin geninin bakır ve kadmiyum ağır metallerine bir ve on dört gün sonunda verdiği cevabı gen ekspresyon düzeyinde incelemektir. Böylece solucanın topraktaki ağır metalleri absorbe ettiği, genetik cevap oluşturduğu ve toprağı temizlediğı gösterilmiş olacaktır.

Çalışmada farklı olarak, bu iki ağır metal LC₅₀ değerlerinin üstünde ve ilaveten birlikte uygulandığında nasıl bir profil oluştuğı değerlendirilecektir. Ayrıca solucanların ağırlıkları deneyin başında ve sonunda ölçülerek değışimler izlenecektir. Son olarak solucanların sayılarına bakılarak hayatta kalma oranlarının nasıl etkilendiğı anlaşılacaktır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

Daha önce yapılan birçok araştırmada ağır metallere birlikte, toprak solucanlarında bazı genlerin ifadesinin arttığı ve strese cevap olarak proteinlerin seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. Bunların bazılarına değinilecek olursa,

Ma (1982), Lumbricid toprak solucanlarında, ilk trofik seviyede metal davranışı üzerine yaptığı araştırmada; biyoakümülyasyon potansiyelinin, kirlenme derecesine ve toprağın metal bağlama kapasitesine bağlı olduğunu göstermiştir (Ma 1982).

Brusseau (1997) yaptığı çalışmada, diğer toksik ağır metallere benzer şekilde ve zararlı organik bileşiklerin aksine, Cd' un toprakta biriktiğini, kirlenmesinin uzun yıllar boyunca sürdüğünü ve edafik fauna üzerindeki etkilerinin devam ettiğini göstermiştir (Brusseau 1997).

Vivian Hsiu-Chuan vd. (1998)' nin yaptıkları çalışmada *Caenorhabditis elegans* türü solucanda Cd maruziyeti ile değişen 49 adet cDNA tanımlanmıştır. *Caenorhabditis elegans*' ta, kadmiyum maruziyetinden sonra ifadeleri değişen bir grup gen bulunmuştur (Vivian Hsiu-Chuan vd. 1998).

Brulle vd. (2007), 80 mg/kg Cd ihtiva eden toprak içerisinde *E. fetida* üzerinde yaptıkları çalışmada, metallothionein geni ekspresyon düzeyi için 14 güne kadar önemli derecede sürekli artış gözlemlenmişlerdir. Cd oranı 800 mg/kg konsantrasyona çıktığında ise erken indüklenme ile birlikte 2 günde 85 kat artış, daha sonra bir düşüş, ardından tekrar 80 kata kadar bir yükseliş gözlemlenmişlerdir. Cu maruziyetinde ise, 40 mg/kg orandaki toprak için Metallothionein mRNA seviyesinde, kontrolle arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. 120 mg/kg Cu maruziyetinde, 14 saat için anlamlı artış gözlenmiştir. Toprakta 400 mg/kg bakıra maruz kalan hayvanlarda ise artış şekli oldukça benzer görülmüştür, bu genin önemli bir indüksiyonu, 1 günlük maruziyete kadar artmış, sonra dalgalı bir grafik ortaya çıkmıştır (Brulle vd. 2007).

Homa vd. (2015)'nin yaptıkları çalışmada, *Eisenia andrei* türü solucana 3 gün ve 7 gün Cd, Cu uygulanmış, coelomocytes örnekleri alınmıştır. Deney sonuçları, 3 ve 7 günün sonunda, Mt gen ekspresyon düzeyinin uygulanan Cd molaritesi ile aynı oranda arttığını göstermiştir. Cu uygulamasında ise 3 gün için önce yükselmiş, sonra düşmüştür fakat 7 günün sonunda sürekli olarak doğru oranlı artış görülmüştür (Homa vd. 2015).

Maity vd. (2018), *Eisenia fetida* ve *Eutyphoeus waltoni* türü solucanlar üzerine yaptıkları çalışmada, 28 günlük 30, 60 ve 120mg/kg oranlardaki maruziyet için, artan doz ve sürede Cd birikiminin arttığını göstermişlerdir. Ayrıca her iki türde, 28 günlük maruziyetin sonunda, artan Cd oranıyla birlikte lipid peroksidasyonu hariç detoksifikasyon enzimlerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Maity vd. 2018)

Neuhauser vd. (1984) yaptıkları çalışmada Cu için LC₅₀ değerini 643 µg/g olarak bulmuşlardır (Neuhauser vd. 1984).

Van Gestel ve Van Dis (1988)' in *Eisenia andrei* ile yaptıkları çalışmada, Cd için LC₅₀ değerini > 1000 mg/kg bulmuşlardır (Van Gestel and Van Dis 1988). Neuhauser vd. (1984) ise 1843 mg/kg bulmuştur. Spurgeon vd.(1994), yaptığı çalışmada, *Eisenia fetida* için LC₅₀ değerini 683 mg/kg bulmuştur (Neuhauser vd. 1984).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Solucanlar

Deneyde kullanılan solucanlar EpiGen Biyoteknoloji Ltd. Şti. tarafından sağlanmıştır. Saklama kabına koyulan solucanlar Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Moleküler Biyoloji Laboratuvarı' na ulaştırılmıştır. Gelen solucanlar kontrollü koşullarda steril su ve kendi yemi olan, organik besince zengin hayansal gübre ile beslenmiştir.

3.1.2 Topraklar

Tez çalışması kapsamında kullanılacak toprak türleri; kuvars kum, kaolinit kili ve sfagnumdur ve EpiGen Biyoteknoloji Ltd. Şti. tarafından temin edilmiştir. Bu üçünün karışımından oluşan toprak, ağır metal uygulamalarında solucanın yaşam alanı olarak kullanılmıştır.

3.1.3 Kitler

Tez kapsamında kullanılan kitler ve ürün kodları Çizelge 3.1' de yer almaktadır.

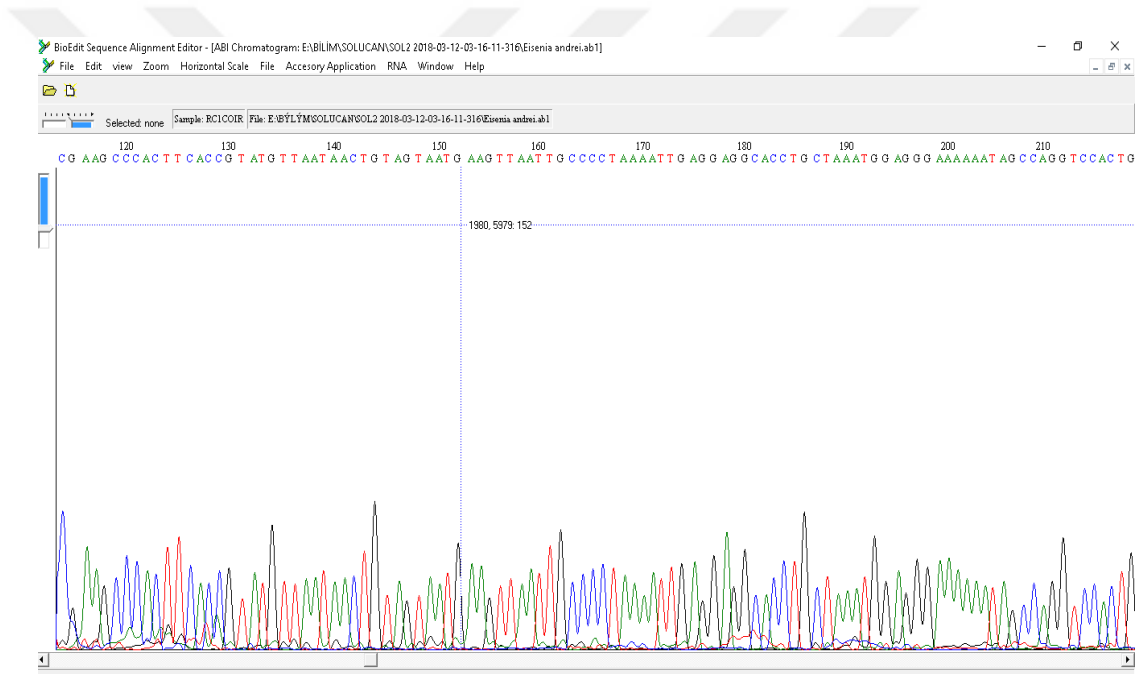
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kitler, kodları ve firmalar

KİT ADI	KODU	FİRMA
mRNA Isolation Kit	R2070	ZYMO Research
cDNA Synthesis Kit	BIO-65053	Bioline
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	BIO-92005	Bioline

3.2 Yöntem

3.2.1 Solucanların temini ve tanımlanması

Solucanlar, karton kutu içerisinde, humuslu toprak ortamında laboratuvara getirilmiştir. John M. Walker' ın (1985) Fenol-Kloroform Yöntemi ile DNA izolasyonu yapıp Sanger Dizileme Yöntemi ile COI geni dizilenmiştir. Dizileme Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü' nde, The Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen dizi BioEdit programı ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.1 Elde edilen dizinin analiz gösterimi

Analiz edildikten sonra dizi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> sitesi kullanılarak BLAST aracı ile alignment yapılmıştır, gelen solucan türünün *Eisenia andrei* olduğu % 99,73 eşleşme ile kanıtlanmıştır.

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE26535 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475668.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE26534 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475667.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE25872 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475665.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE16566 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE16542 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE16540 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475658.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE13612 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475646.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate CE13558 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	MH475645.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate K_Ea55 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	K0781380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eisenia andrei isolate P_Ea39 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	686	686	100%	0.0	99.73%	K0781379.1

Şekil 3.2 Dizinin alignment sonuçları

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1583995908

100 sequences selected

Download GenBank Graphics Next Previous

Eisenia andrei isolate CE26535 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: [MH475668.1](#) Length: 588 Number of Matches: 1

Range 1: 128 to 501 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
686 bits(371)	0.0	374/375(99%)	1/375(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  GGAAGAGAT AAAAGT AGT AAC ACC CACGGT AAT AACT ACAGCT CAT ACA AAT AGGGGGAT 60
          |||
Sbjct 501 GGAAGAGAT AAAAGT AGT AAC ACC CACGGT AAT AACT ACAGCT CAT ACA AAT AGGGGG-AT 443

Query 61  TCGTTC TAGT CGAAG CCCACTT CACCGT ATGTT AAT AACTGT AGT AATGAAGTT AATTGC 120
          |||
Sbjct 442  TCGTTC TAGT CGAAG CCCACTT CACCGT ATGTT AAT AACTGT AGT AATGAAGTT AATTGC 383

Query 121  CCCTAAAATTGAGGAGGCACCTGCTAAATGGAGGGAAAAAATAGCCAGGTCCTACTGAGGG 180
          |||
Sbjct 382  CCCTAAAATTGAGGAGGCACCTGCTAAATGGAGGGAAAAAATAGCCAGGTCCTACTGAGGG 323

Query 181  CCCCOCGTGCGCTAAGTTACTGGATAGGGGCGGGTAAACTGTCCACCCTGTTCCAGCACCC 240
          |||
Sbjct 322  CCCCOCGTGCGCTAAGTTACTGGATAGGGGCGGGTAAACTGTCCACCCTGTTCCAGCACCC 263

Query 241  CTTTTCCACTGCAGCAGAGGATACTAGGAGAATTAGGGAAGGGGCGAGAAGTCAAATCT 300
          |||
Sbjct 262  CTTTTCCACTGCAGCAGAGGATACTAGGAGAATTAGGGAAGGGGCGAGAAGTCAAATCT 203

Query 301  TATGTTGTTGAGACGTGGAAGGCTATGCTGGAGCTCCAGTATAAGAGGTAGAAGTCA 360
          |||
Sbjct 202  TATGTTGTTGAGACGTGGAAGGCTATGCTGGAGCTCCAGTATAAGAGGTAGAAGTCA 143

Query 361  GTTTCCAAATCCACC 375
          |||
Sbjct 142  GTTTCCAAATCCACC 128

```

Şekil 3.3 En yüksek skorlu alignment sonucu

3.2.2 Solucanlara ağır metal uygulanması ve örneklem alınması

Uygulama OECD' nin belirlediği test toprağında yapılmıştır. Toprak karışımı % 70 kuvars kum, % 20 kaolinit kili, % 10 sfagnumdan oluşmaktadır. Deneyde kullanılmak

üzere hazırlanan 50 kg toprak için 35 kg kuvars kum, 10kg kaolinit, 5 kg sfagnum dikkatlice karıştırılmıştır. Karıştırılan topraktan 2 adet 1 kg numune alınmış ve analiz için MTA Genel Müdürlüğü' ne gönderilmiştir. Analizin sonuçları Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

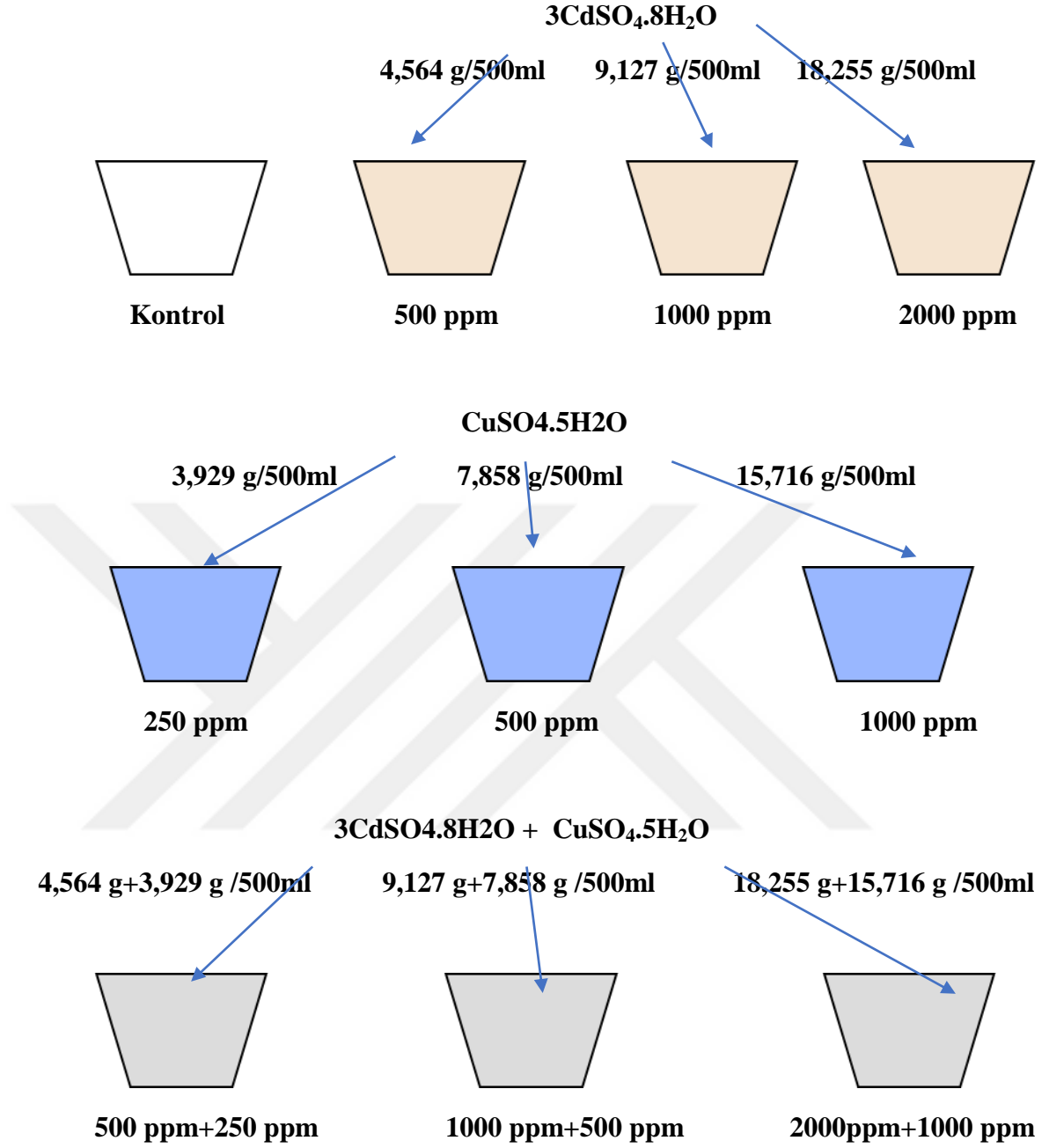
Bir diğer aşamaya geçmeden önce stok yuvadan alınan 50 solucan tartılmış, ağırlıklarının ortalaması alınmıştır. Uygulamanın sonunda da kalan bireylerin ağırlık ölçümleri elde edilmiş, veriler analiz edilmiştir.

MTA Genel Müdürlüğü' nden analiz sonuçları geldikten sonra karışımdan, ölçüleri 42,5 cm 28,5 cm 14,5 cm olan 10 lt lik 10 adet plastik kaba 5' er kg dağıtılmıştır. Dağıtma işleminden sonra kontrol seti dışında, her bir uygulama toprağı için konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar 5 kg kuru toprak ağırlığına göre yapılmıştır. Hassas terazi kullanılarak $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bileşikleri gerekli ölçülerde tartılmıştır ve 500 ml suda çözülmüştür. İyice çözüldükten sonra uygulama topraklarına eklenmiştir.



Şekil 3.4 Test toprağı

Deney düzeneğı aşağıdaki şekildeki gibidir:



Ağır metal eklendikten sonra deney ortamının sıcaklık, nem ve pH kontrolü yapılmıştır. Ölçümler 22° C ortam sıcaklığını, % 60 sabit nemi ve pH 6,5 değerini göstermiştir. Bu veriler elde edildikten sonra kontrol kabına 40 birey, diğerlerine 60 birey eklenmiştir. Deney süresi boyunca her iki günde bir uygulama yapılan topraklar kontrol edilmiş, değerler sabit tutulmaya çalışılmıştır fakat pH 2,5 ile 4 arasına düşmüştür. Geri kalan süre boyunca pH, bu aralıkta gidişat göstermiştir.

Örnekleme 24 saat ve 14 günde alınmıştır. Her örnekleme saatinde, bütün deney setinden 2 birey alınmış, ependorflara aktarılmış ve sıvı azot kullanılarak soğuk zincir bozulmadan -80°C 'ye koyulmuştur. 14 günün sonunda, tüm örneklemin elde edilmesinin ardından total RNA ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir.

3.2.3 RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, ZYMO Research izolasyon kiti (ZYMO Research, USA) kullanılarak yapılmıştır. -80°C 'den çıkarılan solucanlar, önce homojenizatörde parçalanmış, sonra kitin prosedürü uygulanarak soğuk zincirin sürdürülmesi suretiyle RNA izole edilmiştir.

3.2.4 Total RNA örneklerinin jel elektroforezi

İzole RNA' lar, UV ışığı altında jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmiştir. Bunun için % 1,6' lık agaroz jel dökülmüştür. Hassas terazi kullanılarak agarozdan 1,6 gram tartılmış, cam erlene eklenmiştir. Üstüne 100 ml TBE buffer eklenmiş ve mikro dalga fırında, agaroz çözünene kadar ısıtılmıştır. Ardından 5 μL Etidyum Bromür ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra iki taraklı elektroforez kalıbına yavaşça dökülmüştür. 20 dk kuruduktan sonra örnekler sırayla yüklenmiştir. Yükleme için kullanılan malzemelerin ölçümleri şunlardır:

- 5 μL RNA örneği
- 2 μL Loading Dye

Yükleme gerçekleştirildikten sonra 120 V' ta 20 dk yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından jel, UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.2.5 cDNA sentezi

RNA sentezini takiben Real Time PCR yöntemini gerçekleştirmek için çift zincirli DNA sentezlenmesi gerekmektedir. Bunun için tek zincirli RNA' nın Reverse

Transkriptaz enzimi ile çift zincirli oligonükleotide dönüşmesi zorunludur. Bunun için Boline cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Uygun saflığa sahip RNA' ların konsantrasyonlarına bakılarak, reaksiyonda 1000 ng olacak şekilde ayarlanmış ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun hacmi ve koşulları şu şekildedir:

- RNA 1000 ng olacak kadar
- 2 µL 5x Trans AMP Buffer
- 0,5 µL Reverse Transkriptaz (Enzim)
- Son hacim 10 µL olacak kadar su

25° C 10 dk

42° C 15 dk

85° C 5 dk

4° C ∞

3.2.6 Real time PCR

Ağır metale maruz kalan solucanlarda, gen ekspresyon düzeyindeki değişikliğe bakmak için Real-Time PCR metodu kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında 1 genin mRNA seviyesindeki değişikliği incelenmiş, housekeeping gen olarak da B-aktin seçilmiştir. İncelenen gen, ağır metal detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynadığı bilinen Metallothioneins (MTs)' dir. Bu genlere ait PCR için kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

Metallothionein (mt):

Forward 5'-AAAGTGAGTGCTTGCC-3'

Reverse 5'-ACTGATGACAGAGTTCCG-3'

B-actin:

Forward 5'-GAGTACGACGAGTCCG-3'

Reverse 5'-AGCATGTGTGAGTCCT-3'

PCR reaksiyonu, DNA' yı boyama mantığına dayanan SYBR Green (Bioline,UK) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon hacmi aşağıda gösterildiği gibidir:

Çizelge 3.2 Real-Time PCR 'da kullanılan kimyasallar ve miktarları

KİMYASAL ADI	MİKTARI	REAKSİYONDAKİ KONSANTRASYON
SYBR Green(2x)	5 µL	1x
Forward Primer(10 uM)	0,4 µL	400 nM
Reverse Primer(10 uM)	0,4 µL	400 nM
cDNA(1000 ng)	1 µL	100 ng
Su	3,2 µL	

Reaksiyon koşulları:

95° C 120 sn

95° C 5 sn

55° C 10 sn

72° C 15 sn

55° C 20 sn

4° C ∞

} 40 Döngü

Reaksiyon sonucu Cq değerleri elde edilmiştir. Veriler Delta-Delta Ct metodu ile analiz edilmiştir.


3.2.7 İstatistiksel analiz

İstatistiksel hesaplamalar için önce Excel programına veriler girilmiştir. Aralarında fark olup olmadığını ortaya koymak için F Testi (ANOVA, Analysis of Variance) uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Toprakların Hazırlanması ve Ağır Metal Konsantrasyonu

Materyal-metot kısmında belirtildiği üzere topraklar hazırlandıktan sonra iki numune MTA Genel Müdürlüğü' ne toprak ağır metal analizi için gönderilmiştir. Analiz sonuçları, deneye başlamak için ağır metal oranının uygun olduğunu göstermiştir.



T.C.
ENERJİ VE TABİİ KAYNAKLAR BAKANLIĞI
MADEN TETKİK VE ARAMA GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
Maden Analizleri ve Teknolojisi Dairesi Başkanlığı
Üniversiteler Mahallesi Dumlupınar Bulvarı No: 139 06800 Çankaya/ANKARA
Tel: 0312 201 10 00 pbx Faks: 0312 287 54 09
http://www.mta.gov.tr numune@mta.gov.tr

MTA
MAT-19008749
29/08/2019

ANALİZ/TEST RAPORU
ANALYSIS/TEST REPORT

ANALİZ/TEST SONUÇLARI
ANALYSIS/TEST RESULTS

Analiz/Test Kodu : 35-30-AJ-58
Analiz/Test Metodu :

Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)	Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)
19-H-005751	oecd-1	<0,1	19-H-005752	oecd-2	<0,1

Analiz/Test Kodu : 35-30-AJ-11
Analiz/Test Metodu :

Barkod	Numune İşareti	Ag ppm	As ppm	Bi ppm	Co ppm	Cu ppm	Mo ppm	Ni ppm	Pb ppm	Sb ppm	V ppm	Zn ppm
19-H-005751	oecd-1	<1	8	<5	<5	6	9	8	<5	<5	17	3
19-H-005752	oecd-2	<1	9	<5	<5	6	6	7	<5	<5	16	3

Şekil 4.1 Ağır metal eklenmeden önceki test toprağı analiz sonuçları

9 adet test toprağı, ağır metal uygulandıktan sonra tekrar analize gönderilmiştir. Bu toprakların numaralandırması aşağıdaki gibidir:

Çizelge 4.1 Analize gönderilen toprak numunelerinin numaraları

NUMARA	TOPRAKTAKİ AĞIR METAL ORANI
1	500 ppm Cd
2	1000 ppm Cd
3	2000 ppm Cd
4	250 ppm Cu
5	500 ppm Cu
6	1000 ppm Cu
7	500 ppm Cd + 250 ppm Cu
8	1000 ppm Cd + 500ppm Cu
9	2000ppm Cd +1000 ppm Cu

Analiz sonuçları aşağıdaki gibidir:

ANALİZ/TEST SONUÇLARI
ANALYSIS/TEST RESULTS

Analiz/Test Kodu : 35-30-AJ-58

Analiz/Test Metodu :

Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)	Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)	Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)	Numune Kayıt No	Numune İşareti	Cd (ppm)
19-H-008991	1	460.0	19-H-008992	2	1140.0	19-H-008993	3	2450.0	19-H-008994	4	2.5
19-H-008995	5	1.1	19-H-008996	6	3.5	19-H-008997	7	525.0	19-H-008998	8	945.0
19-H-008999	9	1420.0									

Analiz/Test Kodu : 35-30-AJ-11

Analiz/Test Metodu :

Bar kod	Numune İşareti	Ag ppm	As ppm	Bi ppm	Co ppm	Cu ppm	Mo ppm	Ni ppm	Pb ppm	Sb ppm	V ppm	Zn ppm
19-H-008991	1	<1	9	<5	<5	8	15	8	<5	<5	14	4
19-H-008992	2	<1	10	<5	<5	8	16	8	<5	5	14	4
19-H-008993	3	<1	10	<5	<5	6	14	7	<5	<5	12	3
19-H-008994	4	<1	9	<5	<5	331	17	8	<5	<5	14	3
19-H-008995	5	<1	10	<5	<5	251	16	8	<5	<5	13	3
19-H-008996	6	<1	11	<5	<5	1209	15	7	<5	<5	13	3
19-H-008997	7	<1	10	<5	<5	295	15	8	<5	<5	13	3
19-H-008998	8	<1	9	<5	<5	491	15	8	<5	<5	13	3
19-H-008999	9	<1	10	<5	<5	724	15	8	<5	<5	13	3

Şekil 4.2 Ağır metal eklendikten sonraki toprak numunelerinin analiz sonuçları

Raporda görüldüğü üzere konsantrasyon değerleri, 500 ppm Cu numunesi haricinde hedeflenen değerlere yakındır. Bu sebeple 500 ppm Cu parametresi değerlendirmeye alınmamıştır.

4.2 Solucan Örneklerinin Ağırlık Değişimi ve Hayatta Kalma Oranları

4.2.1 Solucan örneklerinin alınması

Deney düzeneğine aktarılmadan önce rastgele 50 adet solucan seçilmiş ve tartılmıştır. Daha sonra deney kaplarının her birine, tartılan 50 solucan da dahil 60 adet solucan eklenmiştir. Çalışmada planlanan son zaman parametresi olan 2 haftanın sonunda kalan solucanlar tartılmış ve ağırlık ortalamaları alınmıştır. Çizelge 4.2' de ağır metal uygulamasından önceki tartımlar ve ağırlık ortalamaları verilmiştir

Çizelge 4.2 Uygulamadan önce tartılan 50 solucanın ağırlıkları

SOLUCAN	UYGULAMADAN ÖNCE SOLUCAN AĞIRLIKLARI (gr)
1. Birey	0,71
2. Birey	0,675
3. Birey	0,615
4. Birey	0,81
5. Birey	0,743
6. Birey	0,752
7. Birey	0,757
8. Birey	0,438
9. Birey	0,633
10. Birey	0,515
11. Birey	0,515
12. Birey	0,562
13. Birey	0,532
14. Birey	0,635
15. Birey	0,6
16. Birey	0,824
17. Birey	0,843
18. Birey	0,577
19. Birey	0,539
20. Birey	0,551
21. Birey	0,626
22. Birey	0,982
23. Birey	0,684
24. Birey	0,725
25. Birey	0,629
26. Birey	0,824
27. Birey	0,696
28. Birey	0,728
29. Birey	0,69
30. Birey	0,71
31. Birey	0,46
32. Birey	0,431
33. Birey	0,503
34. Birey	0,353
35. Birey	0,819
36. Birey	0,436
37. Birey	0,567
38. Birey	0,674
39. Birey	0,561
40. Birey	0,688
41. Birey	0,746
42. Birey	0,594
43. Birey	0,435
44. Birey	0,534
45. Birey	1,012
46. Birey	0,603
47. Birey	0,542
48. Birey	0,926
49. Birey	0,589
50. Birey	0,543
Ortalama	0,64272

Çizelge 4.3’ te 2 haftanın sonunda kalan solucanlar, ağırlıkları ve ortalamaları verilmiştir.

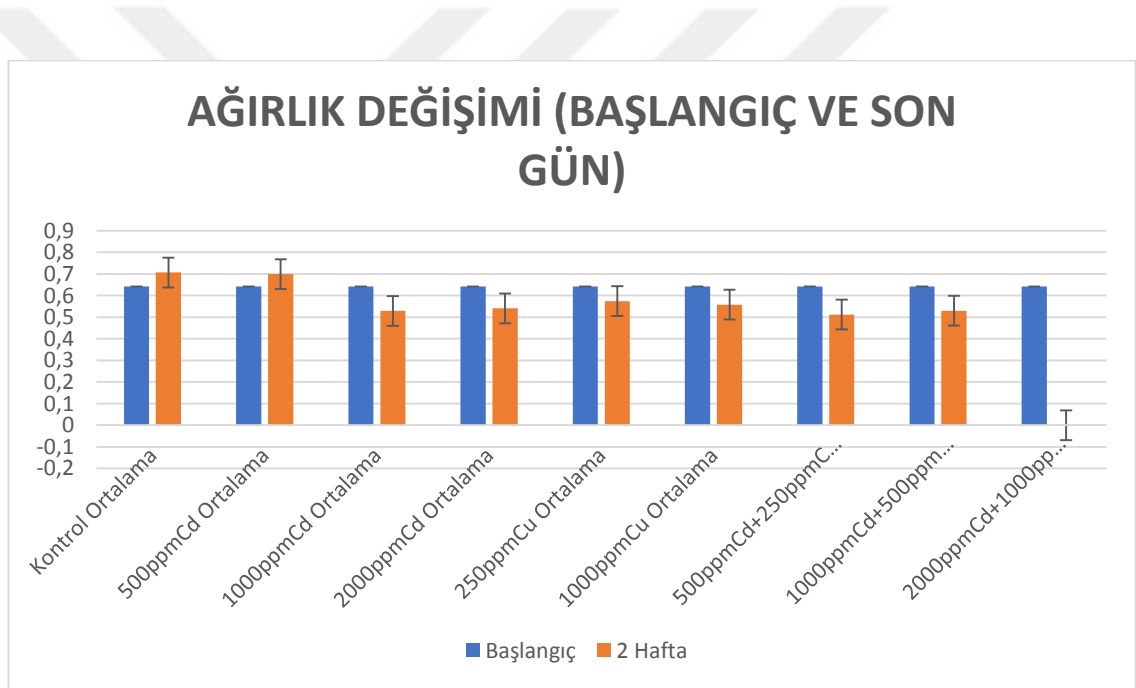
Çizelge 4.3 Ağır metal uygulamasından sonra yaşayan birey sayısı, ağırlıkları ve ortalamaları

DENEY SETİ	YAŞAYAN BİREY SAYISI+SON ÖRNEKLEM SAYISI	AĞIRLIKLARI	ORTALAMALARI
Kontrol	34+3	26,159	0,707
500 ppm Cd	20+3	16,085	0,6993478
1000 ppm Cd	44+3	24,851	0,5287447
2000 ppm Cd	26+3	15,68	0,5406897
250 ppm Cu	19+3	12,641	0,5745909
1000 ppm Cu	15+3	10,047	0,5581667
500 ppm Cd + 250 ppm Cu	31+3	17,403	0,5118529
1000 ppm Cd + 500 ppm Cu	9+3	6,357	0,52975
2000 ppm Cd + 1000 ppm Cu	X	X	X

Ağır metal uygulama öncesi ve sonrası elde edilen solucan ağırlıklarının ortalamaları karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.4.’te gösterilmiştir. Şekil 4.3’ e göre kontrol ve 1 numaralı topraktaki bireylerin ağırlıklarında artış gözlenirken, 9 numaralı toprak hariç diğer topraklardaki bireylerin ağırlıklarında bir azalma görülmüştür fakat bu değişimler istatistiksel anlamda belli belirsiz seyretmiştir. Bireysel olarak solucanların ağırlıklarının değişimlerini inceleyecek olursak kontrol % 10 artmıştır. İstisna olarak 500 ppm Cd ihtiva eden 1 numaralı topraktaki solucanların ağırlıklarında yaklaşık % 9 artış görülürken, Cd içeren diğer 2 topraktaki solucanlarda ortalama yaklaşık % 17 civarı bir azalış görülmüştür. Sadece Cu olanlarda ise yaklaşık % 12’ lik bir azalma gözlenmiştir. 9 numaralı toprakta deney sonunda hiç canlı bulunmadığı için ağırlığı 0 kabul edilmiştir. Diğer Cd ve Cu ağır metallerinin birlikte bulunduğu topraklardaki solucanlarda ise % 19’ luk bir azalma görülmüştür. Homa vd. (2015) tarafından bu çalışmadaki ağır metallerin denendiği bir başka çalışmada solucan ağırlıklarındaki değişimin sadece bakır ve çinko ağır metallerine maruz kalınması durumunda çok az olduğu görülmüştür. Ancak bu tez çalışmasında Cd uygulamasını takiben de topraktaki bireylerin ağırlıklarında farklılık gözlenmiştir.

Çizelge 4.4 Her bir test toprağındaki solucanların başlangıç ve 2. hafta ağırlık ortalamaları

	Başlangıç	2 Hafta
Kontrol Ortalama	0,64272	0,707
500ppmCd Ortalama	0,64272	0,6993478
1000ppmCd Ortalama	0,64272	0,5287447
2000ppmCd Ortalama	0,64272	0,5406897
250ppmCu Ortalama	0,64272	0,5745909
1000ppmCu Ortalama	0,64272	0,5581667
500ppmCd+250ppmCu Ortalama	0,64272	0,5118529
1000ppmCd+500ppmCu Ortalama	0,64272	0,52975
2000ppmCd+1000ppmCu Ortalama	0,64272	0



Şekil 4.3 Ağırlık değişimlerinin grafiksel gösterimi

4.2.2 Hayatta kalma oranları

Solucanların test toprağına aktarımı esnasında ergin bireyler seçilmiştir. 14 günün sonunda hayatta kalan bireyler tekrar sayılmıştır. Test topraklarındaki solucanların hayatta kalma oranları Çizelge 4.5' te verilmiştir. Kontrol toprağındaki bireylerin yaşam oranının % 76 olduğu görülmüştür. Ancak ağır metal uygulaması yapılan topraklardaki solucanların yaşam oranlarının % 50 ve altında olduğu belirlenmiştir. İstisna olarak

1000 ppm Cd ve 500 ppm Cd+250 ppm Cu olan topraklardaki bireylerin yaşam oranlarının ikisinin de % 67 olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalara göre bu iki değerin daha düşük olması; 1,4,ve 7 (LC₅₀ değerinde düşük) nolu topraklardaki hayatta kalma oranlarının %50 'den yüksek olması, ağır metal oranı arttıkça yaşam yüzdesinin düşmesi beklenmiştir. Elde edilen bu sonuçların nedenleri arasında toprakların asiditesinin değişken ve düşük olması, bazı yerlerinde fazla, bazı yerlerinde az miktarda metal olması, alınan solucanların hayatta kalma açısından metal dayanıklılığının suş temelli farklı olması söz konusudur.

Çizelge 4.5 Solucanların hayatta kalma oranı

	BAŞLANG IÇ SAYISI	14. GÜN BİREY SAYISI	ÖRNEK İÇİN ALINA BİREY SAYISI	ÖLEN BİREY SAYISI	YAŞAM ORANI	ÖLÜM ORANI
KONTROL	60	34	15	11	76%	24%
500ppmCd	60	20	15	25	44%	56%
1000ppmCd	60	30	15	15	67%	33%
2000ppmCd	60	26	15	19	58%	42%
250ppmCu	60	19	15	26	42%	48%
1000ppmCu	60	15	14	31	33%	77%
500ppmCd+						
250ppmCu	60	31	14	15	67%	33%
1000ppmCd						
+500ppmCu	60	9	12	39	19%	81%
2000ppmCd						
+1000ppmCu	60	X	5	55	0%	100%

4.3 RNA İzolasyon Sonuçları

Total RNA izolasyonu, kit ile yapıldıktan sonra numaralandırılmış, ardından Nanodrop cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler Çizelge 4.6' da gösterilmiştir. Elde edilen saflık oranlarının ve konsantrasyonların uygun olduğu görülmüş, uygun olmayan bireylerin yerine aynı deney setinden yeniden izolasyon yapılmıştır. Beklenen saflık oranları 1.8 ile 2 arasındadır. İncelenen A₂₆₀/A₂₈₀ değeridir. DNA ve RNA çözeltilerinin ultraviyole ışığı emdiği maksimum değer 260 nm, proteinlerin ise 280 nm' dir (Sambrook vd. 1989). Bu bilgiler baz alınarak A₂₆₀/A₂₈₀ oranı, bize elde edilen RNA' nın kirliliği hakkında bilgi verecektir. Bu saflık

oranları ve konsantrasyonlar bir sonraki aşamaya geçmek için uygun görülmüş ve elektroforez aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 4.6 Solucanların numaraları, RNA ' larının saflık oranları ve konsantrasyonları

SOLUCANLAR	SAFLIK ORANI (260/280)	KONSANTRASYON(n g/μL)
<u>24 SAAT</u>		
24 Saat Kontrol 1. Birey	1,8	836,4
24 Saat Kontrol 2. Birey	1,93	921,5
24 Saat 500 ppm Cd 1. Birey	1,98	1168,9
24 Saat 500 ppm Cd 2. Birey	1,92	1144
24 Saat 1000 ppm Cd 1. Birey	1,92	786,1
24 Saat 1000 ppm Cd 3. Birey	1,91	255,6
24 Saat 2000 ppm Cd 1. Birey	1,88	2256,2
24 Saat 2000 ppm Cd 2. Birey	1,81	638,7
24 Saat 250 ppm Cu 1. Birey	1,79	374,7
24 Saat 250 ppm Cu 2. Birey	1,89	1396,6
24 Saat 1000 ppm Cu 1. Birey	1,96	206,1
24 Saat 1000 ppm Cu 2. Birey	1,94	240,5
24 Saat 500 ppm Cd + 250 ppm Cu 1. Birey	1,89	384,1
24 Saat 500 ppm Cd + 250 ppm Cu 2. Birey	1,86	514,4
24 Saat 1000 ppm Cd + 500 ppm Cu 1. Birey	1,8	406,4
24 Saat 1000 ppm Cd + 500 ppm Cu 2. Birey	1,89	2227,1
24 Saat 2000 ppm Cd + 1000 ppm Cu 1. Birey	1,88	1094,3
24 Saat 2000 ppm Cd + 1000 ppm Cu 2. Birey	1,88	659,3

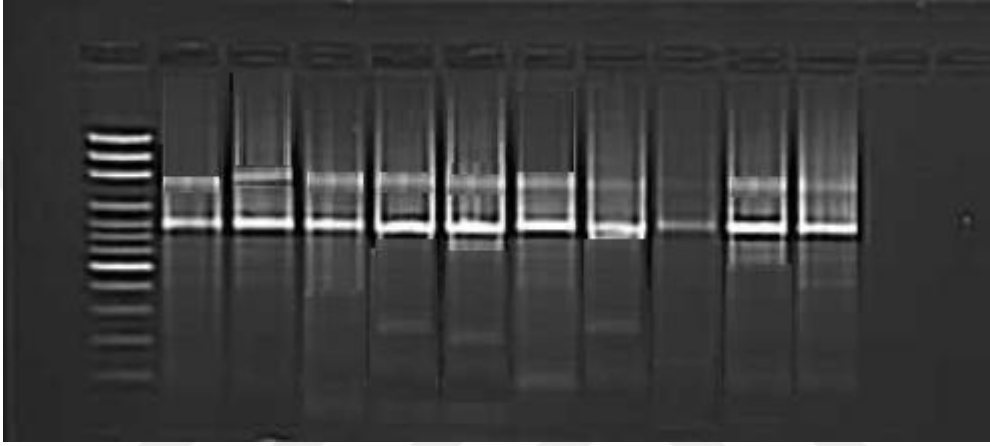
Çizelge 4.6 Solucanların numaraları, RNA ' larının saflık oranları ve konsantrasyonları (devam)

2 HAFTA		
2 Hafta Kontrol 1. Birey	1,83	306,3
2 Hafta Kontrol 2. Birey	1,85	465,6
2 Hafta 500 ppm Cd 1. Birey	1,8	917,6
2 Hafta 500 ppm Cd 2. Birey	1,98	1195
2 Hafta 1000 ppm Cd 1. Birey	1,75	220,5
2 Hafta 1000 ppm Cd 2. Birey	1,98	1910
2 Hafta 2000 ppm Cd 1. Birey	1,81	453,4
2 Hafta 2000 ppm Cd 2. Birey	1,9	487,2
2 Hafta 250 ppm Cu 1. Birey	1,72	2247,6
2 Hafta 250 ppm Cu 2. Birey	1,73	306,8
2 Hafta 1000 ppm Cu 1. Birey	1,94	624,1
2 Hafta 1000 ppm Cu 2. Birey	1,95	691,3
2 Hafta 500 ppm Cd + 250 ppm Cu 1. Birey	1,92	775,4
2 Hafta 500 ppm Cd + 250 ppm Cu 2. Birey	1,82	258,8
2 Hafta 1000 ppm Cd + 500 ppm Cu 2. Birey	1,76	598,9
2 Hafta 1000 ppm Cd + 500 ppm Cu 3. Birey-	1,96	509
2 Hafta 2000 ppm Cd + 1000 ppm Cu 1. Birey	X	X
2 Hafta 2000 ppm Cd + 1000 ppm Cu 2. Birey	X	X

4.4 RNA 'ların Jel Elektrofrezde Görüntülenmesi

Total RNA izole edildikten sonra % 1,6' lık agaroz jelde yürütülmüştür. Ökaryotlarda ribozomal RNA, üç alt birimden oluşur, bunlar 5.8S, 18S ve 28S' tir. Jelde görüneler ise ribozomal RNA' nın büyük alt birimi 28S ve küçük alt birimi 18S' tir (Brimacombe vd. 1985).

Alttaki şekilde de görüldüğü üzere büyük ve küçük alt birim, UV ışığında iki bant şeklinde net olarak görülmüştür. Her bir kuyucukta farklı bireylerden izole edilmiş RNA örnekleri olan bu jel görüntüsünde, küçük olan 18S daha hızlı yürümüştür. Büyük alt birim 28S ise boyutundan dolayı daha yavaş yürüdüğü için yukarıdadır ve iki bant da yanındakilerle aynı hizadadır. Altlarda görünen silik bantlar ise kirlilikten kaynaklanan önemsiz bantlardır. Bu sonuca dayanak daha sonraki aşamalara geçilmiştir.



Şekil 4.4 RNA 'ların jel elektroforez gösterimi

4.5 Real-Time PCR Sonuçları

cDNA sentezlendikten sonra Real-Time PCR yapılmış, bütün örnekler 2 gen açısından taranmıştır. Elde edilen Cq değerleri bir tablo haline getirilmiştir. Tablo değerleri grafiğe dönüştürülmüş, azalma ve artış seviyesine bakılmıştır.

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 500 ppm Cu olması istenen topraktaki bireyler alınmamıştır çünkü analiz sonuçları, topraktaki bakırın 500 ppm değerinin çok altında olduğunu göstermiştir. Bu değerler, analiz sonuçlarını etkileyeceği için çıkarılmıştır. Ayrıca 14 günün sonunda, 2000 ppm Cd + 1000 ppmCu eklenen toprakta hiç canlı birey kalmadığı için ekspresyon seviyesi 0 kabul edilmiştir.

Analizler, Livak ve Schmittgen' in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Metallothionein geni için en son elde edilen Delta-Delta Ct değerleri, kontrol bireylerine göre birbirlerine oranlanmış ve verilerin son hali elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Veriler incelendiğinde, kadmiyum için aynı zaman diliminde oran artarken Metallothionein geninin ekspresyon seviyesinde en az 1,5 kat bir azalış görülmüştür. 1 nolu toprakta 24 saat için ekspresyon kat sayısı 427 iken 2 nolu toprakta oran 46' ya, 3 nolu toprakta ise 10' a düşmüştür. Başka bir deyişle Cd miktarı iki katına çıktığında gen ifadesi yaklaşık % 89 azalmış, 4 katına çıktığında ise yaklaşık % 98 azalmıştır. 2 hafta için 1,2 ve 3 nolu topraktaki ekspresyon katsayıları sırası ile 1210, 420 ve 210' dur. Burada Cd miktarı 500 mg/kg iken katsayı 1210' a çıkmış, ağır metalin 2 kat arttığı toprakta ise 1 nolu toprağa göre yaklaşık % 65 azalmış, 4 kat olduğunda ise % 83 azalmıştır.

Çizelge 4.7 Metallothionein gen ifadesinin analiz sonuçları

Metallothionein	24 Saat	2 Hafta
Kontrol	1	1
Cd 500 (1 nolu toprak)	427,805346312738	1209,92046720124
Cd 1000 (2 nolu toprak)	46,7126740176669	420,194164455425
Cd 2000 (3 nolu toprak)	10,2242532506177	209,850806819103
Cu 250 (4 nolu toprak)	0,249579714604066	2,20264409197747
Cu 1000 (6 nolu toprak)	19,1387535656864	4,10695927026594
Cd 500+Cu 250(7 nolu toprak)	61,0826392911829	98,1361395015168
Cd 1000+Cu 500(8 nolu toprak)	30,2690596765727	110,103615942136
Cd 2000+Cu 1000(9 nolu toprak)	14,2728394343604	x

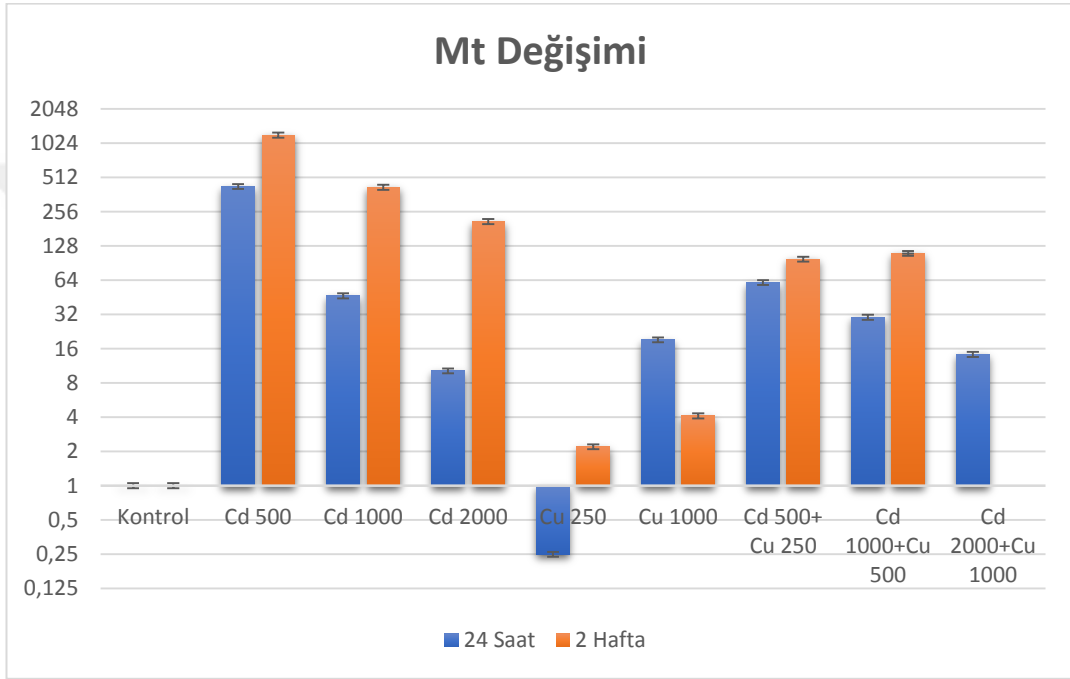
Sadece bakır uygulanan topraklar incelendiğinde ekspresyon seviyesinde ciddi bir artış görülmüştür. 24 saat için 4 nolu topraktaki Mt ekspresyon katsayısı 0,25 iken, ağır metal oranı 4 kat arttığında ise bu katsayı yaklaşık 19 olmuş, 76 kat artmıştır. 2 hafta sonundaki uygulamada, bu katsayı 2.2' den 4,1 'e çıkmış, 1,86 kat artmıştır.

İki metalin birlikte uygulandığı bireylerde; 24 saatte ağır metal konsantrasyonları 2 kat arttığında Mt ekspresyon seviyesinde $\frac{1}{2}$ oranında azalış, 4 kat arttığında ise yaklaşık $\frac{1}{4}$ oranında azalış görülmüştür. 2 hafta için incelersek, 7 nolu toprakta ekspresyon katsayısı 98 iken, ağır metaller 2 katına çıktığında 110 olmuş, yaklaşık 1.12 oranında artış görülmüştür. Bu şablon 24 saat için sadece Cd uygulandığında görülen profille aynıdır. 2 haftada ise bakırda görülen durum seyretmiştir. Şematik olarak Homa vd. 2015 'te yaptığı çalışma ile örtüşmemektedir. Cd için metal oranı arttıkça, ekspresyon seviyesinde giderek artış görülmektedir fakat bu çalışmada tam tersi bir durum söz konusudur. Bu durum Cd' un toksik etkisinin çok yüksek olması, uygulanan yüksek oranların hücrel faaliyetleri bozması ve dokulara öldürücü derecede zarar vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rorat vd. 2017). Cu' da ise temel metal olmasından kaynaklı, farklı durum görülmüştür. Bakırın kadmiyuma nazaran, Mt proteininin biyosentezini daha düşük oranda indüklediği belirtilmiştir (Homa vd. 2015). Buradan yola çıkarak bakırdaki katsayıların kadmiyumdan daha düşük oluşu bu açıklanabilir. İkisi birlikte uygulandığında ise 24 saat için, gen ifade profilinin Cd gibi olması, 2 haftada Cu olması muhtemeldir. Kadmiyumun toksik etkisi ön plana çıkmış, zaman geçtikçe Cu etkisini göstermiştir. Ayrıca kadmiyumun diğer metallerle sinerjistik etki yaptığı, birlikte uygulandığında Mt ekspresyonunu daha fazla arttırdığı gözlenmiştir (Demuynek vd. 2007). Mariño ve arkadaşları, Cu'nun sadece Cd iyonları olan diğer ajanların varlığında metalotiyoninlerle bağlanabileceğini öne sürmüşlerdir (Mariño vd. 1998).

Ağır metal oranları sabit tutulup, kendi içinde zaman açısında gen ekspresyon değişimi değerlendirilecek olursa; kadmiyuma maruz kalan bireylerde, 24 saatten 2 haftaya geçişte, 1 nolu toprakta Metallothionein gen ifadesinin yaklaşık 3 kat arttığı görülmüştür. 2. toprakta 9, 3. toprakta ise 21 kat artış gözlenmiştir.

Bakıra maruz kalanlarda ise 4 nolu topraktaki bireylerde 8.8 oranında bir artış, 6. toprakta ise 4.66' lık bir azalış görülmektedir. Bu durum Brulle vd. 2008(a)' de yaptığı çalışma ile uyumludur. 1 haftadan sonra yüksek Cu konsantrasyonlarında, Mt geni için ekspresyon seviyesindeki azalma söz konusudur.

Cd ve Cu birlikte uygulandığında ise, sadece Cd uygulandığındaki şablon görülmüştür. 7 nolu toprakta yaklaşık 1,6 oranında bir artış görülürken, 8 nolu toprakta 3.67' lik bir artış söz konusudur. 9 nolu toprakta deney sonunda hiç canlı birey kalmadığı için gen ekspresyon değişimi açısından değerlendirme yapılamamıştır. Bu durumun, kadmiyumun hücreye verebileceği zararlı etkinin bakıra göre daha baskın gelmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.5 Metallothionein gen ekspresyon değişiminin grafiksel gösterimi

5. SONUÇ

Bu çalışmada toprak solucanına (*Eisenia andrei*) 2 ağır metal ayrı ayrı ve birlikte uygulanmış, uygulama öncesi ve sonrası için ağırlık değişimine, hayatta kalma oranına, son olarak gen ekspresyon profili değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, genel anlamda kontrol solucanlarının ağırlık ortalamaları artarken, ağır metal uygulanan solucanların ağırlık ortalamaları anlamlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca ağır metaller toprak solucanlarının hayatta kalma oranlarını ciddi şekilde düşürmüş, yaşamsal faaliyetlerini etkilemiştir. İki ağır metal, LC₅₀ dozlarının yaklaşık iki katı kadar birlikte uygulandığında ise 14 gün sonunda hiç canlı birey kalmamıştır. Bununla beraber Cd 'un aşırı toksik etkisine karşın *Eisenia andrei* türü direnç göstermeyi başarmış, iki metal birlikte uygulandığında LC₅₀ dozlarına yakın oranlarda gen ekspresyon profilini değiştirerek hayatta kalmayı başarmıştır

Metallothionein geni için ağır metal uygulamasında biyobelirteç olduğu bir kez daha gösterilmiştir. Ağır metalin oranına göre solucanlarda, bu genin ekspresyon seviyesi değişmiş, zararlı etkisini daha da azaltmaya yönelik cevap oluşturmuştur. Ayrıca bu cevap ağır metalin türüne, uygulama süresine ve metallerin birlikte uygulama durumuna göre de değişmiştir. İlk defa Cd ve Cu, LC₅₀ değerlerinin yaklaşık iki katı kadar oranda birlikte uygulandığında, nasıl bir profil oluştuğu görülmüştür. Toksik metal iz metale göre cevap oluşturmada üstünlük sağlamış, gen ifade şablonu ona göre şekil almıştır

Solucanların toprağı ağır metal açısından temizlediği ve strese cevap oluşturduğu bir kez daha gösterilmiştir. Bu çalışmanın devamı olarak daha fazla metalle birlikte daha fazla gen incelenebilir ve uygulama süreleri uzatılabilir. Metal sayısı değiştirilerek çeşitli kombinasyonlar yapıp, RNA-Seq yöntemi ile total gen ekspresyon profili incelenebilir. Böylece bütün ilişkili genler belirlenip, ağır metal maruziyetinde nasıl bir değişim profili oluştuğu anlaşılabilir. Ayrıca mRNA seviyesindeki değişime ilaveten gen ürünü olan proteinler çalışılabilir. İlişkili genlerin son ürünü olan proteinlerin değişimi farklı metotlarla incelenebilir. Örneğin ileriki aşamalarda Western-Blot yöntemi kullanılarak ilişkili proteinlerin büyüklüğü, strese uğramamış solucanlardan

elde edilen proteinlerle kıyaslanabilir; konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması gibi çalışmalar yapılabilir. Biyoinformatik araçlar kullanılarak üç boyutlu yapıları incelenebilir. Bu araştırmalar bize proteinlerin konformasyonlarında nasıl değişiklikler olduğu, RNA'ların % kaçının proteine dönüştüğü hakkında bilgi verebilir. Ayrıca moleküler incelemenin yanı sıra ağır metallerin solucanlar üzerinde nasıl bir fiziksel değişime yol açtığı incelenmelidir. Boy, ağırlık, renk, üreme kapasitesi gibi özellikler stresin derecesi hakkında bize fikir verecektir.

Yukarıdaki bilgilere ek olarak farklı solucanlarla çalışılıp hangisinin daha dirençli olduğu belirlenebilir. İleride toprağı solucanlarla temizleme yönteminin geliştirilmesinde bu çalışmalar bize rehber olacaktır fakat buradaki sorun solucanların topraktan nasıl arındırılacağı ve yöntemin nasıl gerçekleştirileceğidir. Belki ilk aşamada büyük kara parçalarında yapmak güç olabilir ama küçük seralarda etkin bir rol oynayan sistemler geliştirilebilir.

Son olarak, günümüzde toprak kirliliği ve kuraklık ciddi bir sorundur. Küresel ısınmanın etkisi ve bilinçsiz sanayileşmeyle daha da tehlikeli boyutlara gelmesi olasıdır. Bu şartlar düşünöldüğünde toprağın hangi konsantrasyonlarda, hangi ağır metaller ile en verimli şekilde arındırılacağını öğrenmeye yönelik çalışmalar, başka canlılarla da yapılabilir. Böylece yaşadığımız gezegenin en önemli canlılarından olan bitkilere daha uygun şartlar bırakılmış olur, dolayısıyla onlarla beslenen hayvanlara da, yeryüzündeki bütün canlılara da daha optimal koşullar bırakmak söz konusu olabilir.

KAYNAKLAR

- Bellitürk, K. 2018. Some Evaluations about Use of Vermicompost in Agricultural Activity of Thrace Region, Turkey: A Review. *J Rise Research*, 6, 1-6.
- Brimacombe, R., Stiege, W. 1985. Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem. J.* (1985), 229, 1-17.
- Brulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A., Vandebulcke, F. 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism?. *Science Direct*, 144, 334-341.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah A.N., Morgan, A.J., Kille, P., Leprêtre, A., Vandebulcke, F. 2008a. cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 (2008), 47–55.
- Brulle, F., Cocquerelle C., Mitta G., Castric V., Douay F., Leprêtre A., Vandebulcke F. 2008b. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(12), 1441-1453.
- Brusseu, M.L. 1997. Transport and fate of toxicants in soils Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel (Eds.), *D. SoilEcotoxicology*, Lewis Publishers (1997), 33-53, USA.
- Chaffai, R., Koyama, H. 2011. Heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Advanced in Botanical research*, 60, 1-49.
- Demuynck, S., Grumiaux F, Mottier V, Schikorski D, Lemiere S, Lepretre A. 2007. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comp Biochem-Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 145:658–668.
- Domínguez, J., Velando A., Ferreiro A. 2005. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche' (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?. *Peda Biologia*, 49(2005), 81-87.
- Dvořák, J., Mančíková, V., Pižl, V., Elhottová, D., Šilerová, M., Roubalová, R., Škanta, F., Procházková, P., Bilej, M. 2013. Microbial Environment Affects Innate Immunity in Two Closely Related Earthworm Species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*. *Plos One*, 8(11), e79257.
- Gastaldi, L., Ranzato E., Capri, F., Hankard, P., Pérès, G., Canesi, L., Viarengo, A., Pons, G. 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146, 398-405

- Homa, J., Rorat, A., Kruk, J., Cocquerelle, C., Plytycz, B., Vandebulcke, F. 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 1397–1404
- Hong, Y., Kim, T.H., Na, Y.E. 2001. Identity of two earthworms used in vermiculture and vermicomposting in Korea: *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus*. *The Korean Journal of Systematic Zoology*, 17, 185-190
- Kaygorodova, I.A. ve Sherbakov, D.Y. 2006. Molecular Phylogenetic Study of the Systematic Position of Baikalian Oligochaetes in Clitellata. *Russian Journal of Genetics*, 42, 1390–1397.
- Jadwiga D. Plisko, Thembeke C. Nxele. 2015. An Annotated Key Separating Foreign Earthworm Species from the Indigenous South African taxa (Oligochaeta: Acanthodrilidae, Eudrilidae, Glossoscolecidae, Lumbricidae, Megascolecidae, Microchaetidae, Ocnerodrilidae and Tritogeniidae). *African Invertebrates*, 56(3), 663- 708
- Liao, V.H.C., Freedman, J.H. 1998. Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J.Biol.Chem*, 273, 31962–31970.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Ma, W. (1982). Biomonitoring of soil pollution: Ecotoxicological studies of the effect of soil-borne metals on lumbricid earthworms. In Annual REFERENCES Report 1982. Research Institute for Nature Management, Arnhem, The Netherlands.
- Maity, S., Banerjee, R., Goswami, P., Chakrabarti, M., Mukherjee, A. 2018. Oxidative stress responses of two different ecophysiological species of earthworms (*Eutyphoeus waltoni* and *Eisenia fetida*) exposed to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* 203, 307- 317.
- Mariño F, Stürzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ. 1998. Cu–Cd interactions in earthworms maintained in laboratory microcosms: The examination of a putative copper paradox. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 120:217–223.
- Neuhauser, E. G. . Malecki, M. R. & Loehr. R. C. 1984. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia foetida* after exposure to sublethal concentrations of metals. *Pedobiologia*, 27, 89-97.

- Peijnenburg, W.J.G.M., Baerselman, R., de Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L., Van Veen, R.P.M. 1999. Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(3), 294-310
- Rorat, A., Vandenbulcke, F., Gałuszka, A., Klimek, B., Plytycz, B. 2017. Protective role of metallothionein during regeneration in *Eisenia andrei* exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 203, 39-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sehar, T., Sheikh, G.G, Zargar, M.Y., Baba, Z.A. 2016. Identification and Screening of Earthworm Species from Various Temperate Areas of Kashmir Valley for Vermicomposting. *Advances in Recycling & Waste Management: Open Access*, 1, 1-6.
- Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Van Gestel, C.A.M. 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, 47, 588–606.
- Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., & Jones, D. T. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 84, 123–130.
- Ustaoğlu D., Terzioğlu K., Türe, H., Yılmaz E., Tunca, E. 2015. Sucul ortamlardaki bakırın (Cu), su mercimeği (*Lemna minor* Linneaus 1753) ile fitoremediasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 10-22.
- Van Gestel, C. A. M., Van Dis, W.A. 1988. The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soil*, 6, 262-265.
- Walker, J.M. 1985. *Nucleic Acids, Methods in Molecular Biology*, vol 2. The Humana Press, 31-31, USA.
- Wang, X., Chang, L., Sun Z., Ma H. 2010. Characterization of genes expressed in response to cadmium exposure in the earthworm *Eiseniafetida* using DDRT-PCR. *Ecology and Environmental Safety*, 73(2010), 1214-1220.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad : Ahmet Aşkın YILMAZ
Doğum Yeri : İzmir
Doğum Yeri : 28.03.1988
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kalaba Lisesi (2006)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2007-2012)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
(Şubat 2017- Haziran 2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar

Yöntem Temel Lisesi (09/2015 – 06/2016)
Kampüs Dershaneleri (09/2014 – 06/2015)
Biosel İthalat İhracat Tic.Ltd.Şti (01/2014 – 04/2014)
Çözüm Dershaneleri (10/2012 – 06/2013)
Düzen Laboratuvarı (09/2012 – 10/2012)
Hacettepe Üniversitesi / Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (04.07.2011 – 12.08.2011)
Marks&Spencer / Bayan Giyim (11/2007 – 10/2008)