

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO PİRİTİNİN *Oreochromis niloticus* ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Nejla ÖZCAN**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO PİRİTİNİN *Oreochromis niloticus* ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Nejla ÖZCAN**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018
NEVŞEHİR**

Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK danışmanlığında **Nejla ÖZCAN** tarafından hazırlanan “**Çinko Piritionun *Oreochromis niloticus* Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

19.01.2018

JÜRİ:

Başkan : Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

Üye : Doç. Dr. Özlem FINDIK

Üye : Yard. Doç. Dr. Hacer YELDAN

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulu’nun **14/2/2018** tarih ve **09/73** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

15/2/2018

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nejla ÖZCAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK'e, tez çalışmam süresince her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Sevil SUNGUR BİRECİKLİĞİL'e, teknik ve idari yardımlarından dolayı Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığına, Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmanın Doç. Dr. Ramazan MERT'in yürütücüsü olduğu NEÜBAP-13F40 nolu BAP projesi kapsamında yapılmış olması nedeniyle Doç. Dr. Ramazan MERT'e ve Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım ve tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini hissettiren değerli aileme minnettarlığımı sunarım.

ÇİNKO PİRİTİONUN *Oreochromis niloticus* ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nejla ÖZCAN

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2018

ÖZET

Bu çalışmada sucul ekosisteme evsel, endüstriyel ve genel amaçlı kullanım sonucunda kirletici olarak karışan çinko metal kompleksi olan çinko piritonun (ZnPT) LC₅₀ değerinin 1/24 (2,5µl/L) ve 1/12 (5µl/L)'sinin *Oreochromis niloticus* türünün fingerlinglerinde genotoksik etkileri, balık eritrositlerinde mikronükleus testi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda 24 ve 96 saat süreyle ZnPT'a maruz bırakılan bireylerin kontrol grubuna göre mikronükleus ve morfolojik düzensizlik değerlerinde artış görüldüğü tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Tilapia*, LC₅₀, Toksisite, nükleus düzensizlikleri

Tez Danışman: Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

Sayfa Adedi: 35

**DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF ZINC PYRITHIONE
ON *Oreochromis niloticus* BY MICRONUCLEUS TEST**

(M.Sc. Thesis)

Nejla ÖZCAN

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

January 2018

ABSTRACT

In this study, zinc pyrithione (ZnPT), which is a zinc metal complex pollutant mixed in domestic, industrial and general purpose use to aquatic ecosystem, has an LC_{50} value of 1/24 (2,5µL/L) and 1/12 (5µL/L) of *Oreochromis niloticus*. Possible genotoxic effects in the *Oreochromis niloticus* fingerlings were determined using micronucleus test in fish erythrocytes. As a result of the laboratory studies performed, it was determined that the individuals exposed to ZnPT for 24 and 96 hours showed an increase in micronucleus and morphological irregularities according to the control group.

Key Words: *Tilapia, LC_{50} , Toxicity, nucleus irregularities*

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

Page Number: 35

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
1.1. Çinko Pirition.....	2
1.2. Genetik Toksikoloji.....	3
1.3.Genetik Toksikoloji Testleri	4
1.4. Mikronükleus ve Mikronükleus Testi	4
1.5. Akuatik Toksikolojide Mikronükleus Testi	4
2. BÖLÜM	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. BÖLÜM	
MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal	9

3.1.1. Akvaryum Suyunun Fizikokimyasal Özellikleri.....	10
3.2.Yöntem.....	10
3.2.1. Balıkların Deneye Hazırlanması	10
3.2.2.Kimyasalın Hazırlanması	11
3.2.3.Deney Yöntemi ve Uygulama Planı.....	11
3.2.4.Mikronükleus Testi	12
3.2.5.Mikronükleus Sayım Kriterleri	14
3.2.6.Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi	14
4. BÖLÜM	
BULGULAR VE TARTIŞMA	15
4.1. Bulgular.....	15
4.1.1.Biyodeneyle Ait Araştırma Sonuçları	15
4.1.2.Davranış Değişimlerine Ait Gözlem Sonuçları.....	22
4.2. Tartışma.....	22
5. BÖLÜM	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	25
5.1. Genel Değerlendirme	25
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Çinko piritionun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....2

Tablo 3.1. Deney akvaryumlarındaki su kalitesi parametreleri10



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Çinko piritinin kimyasal formülü.....	2
Şekil 3.1. Nil Tilapyası (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	9
Şekil 3.2. Deney düzeneği.....	12
Şekil 3.3. Yama preparatlarının hazırlanması	13
Şekil 3.4. Preparatların boyama kuvvetlerine yerleştirilmesi	13
Şekil 3.5. Giemsa boyası ile preparatların boyanması	13
Şekil 4.1. Normal eritrositler.....	16
Şekil 4.2. Tomurcuklu nükleus görünümü.....	16
Şekil 4.3. Çentikli nükleus görünümü.....	17
Şekil 4.4. Binükleus görünümü.....	17
Şekil 4.5. Mikronükleus görünümü.....	18
Şekil 4.6. Normal koşullarda 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları	18
Şekil 4.7. Pozitif koşullarda 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	19
Şekil 4.8. Doz1: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	19
Şekil 4.9. Doz1: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	20
Şekil 4.10. Doz2: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	20

Şekil 4.11. Doz2: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....21

Şekil 5.1. ZnPt' ye 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan balıkların normal ve pozitif koşullara göre ortalama mikronükleus frekanslarının değerlendirilmesi26



SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Cu	: Bakır
Fe	:Demir
Zn ⁺²	: Çinko
Pb	: Kurşun
Co	: Kobalt
Mn	: Mangan
Cr	: Krom
Ni	: Nikel
Cd	: Kadmiyum
ZnPT	: Çinko Pirit
O ₂	: Oksijen
S	: Kükürt
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
UV	: Ultraviyole
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
LC ₅₀	: Ölüm Konsantrasyonu (%50)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
µg/L	: Mikrogram/litre
EMS	: Etilmetil sülfat
dk.	: Dakika
Sa.	: Saat

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hızlı ve kontrolsüz bir biçimde artan dünya nüfusu, yetersiz beslenme, plânsız şehirleşme, yanlış arazi kullanımı, tehlikeli maddeler, hızla yok olan yeşil alanlar ve ormanlar, bilinçsiz enerji üretimi ve tüketimi, turizm faaliyetleri, sanayileşme gibi birçok antropojenik etkinin yarattığı olumsuzluklar günümüzde ortaya çıkan en önemli çevre sorunlarıdır. Bu gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan kirliliğin boyutlarının hızla artış göstermesi nedeniyle dünyadaki ekosistemlerin dengeleri bozulmakta ve buna bağlı olarak doğal ortamda yaşayan canlıların da bu durumdan olumsuz etkilenmeleri sonucu doğmaktadır. Dünyadaki sucül ekosistemler, hava ve toprak ekosistemlerine göre daha yüksek oranda kirliliğe maruz kalmakta ve kirlilik sucül ekosistemde çok büyük alanlara dağılarak organizma üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunların başında çevre problemleri gelmektedir, bu sorunlar her geçen gün artarak karşımıza çıkmaktadır. [1, 2].

Doğal dengeyi bozan kirletici elemanlardan bir kaçı organik maddeler, ağır metaller, petrol türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktivite, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddelerdir [3].

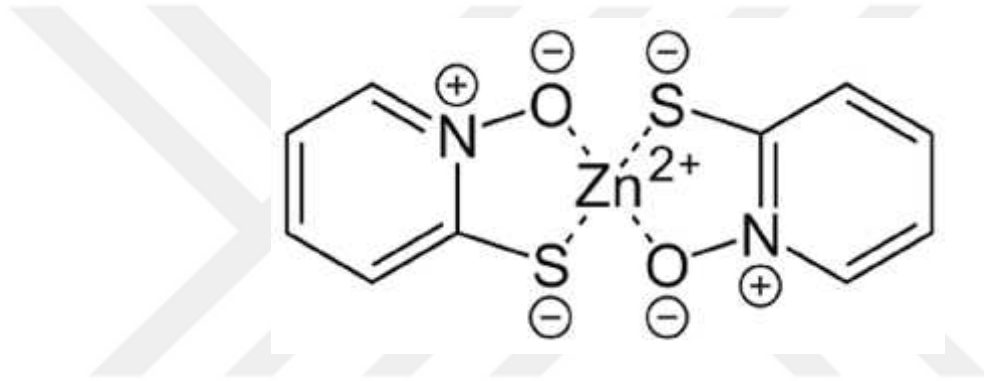
Toksik maddelerin önemli bir grubunu da ağır metaller oluşturmaktadır. Yoğunluğu 5gr/cm^3 'den büyük olan Cu, Fe, Zn, Pb, Co, Mn, Cr, Ni ve Cd gibi metal gruplarına ağır metaller adı verilmektedir [4]. Ağır metaller doğal yolların dışında jeolojik ayrışma, şehir sel suları, maden tasfiyeleri, endüstriyel maddeler, tarımda tercih edilen gübreler ve ilaçlar, endüstriyel baca gazları, şehir içi ve şehirlerarası araç trafiği, çöp toplama alanlarının sızıntı suları ile sucül ekosistemlere yayılarak ve sucül ortamlarda ciddi kirlenmeler olmaktadır [5-9].

Doğaya bırakılan antropojenik maddeler zamanla ayrışıp çevreye dönmekte ve teknolojinin fazla olarak ürettiği kalıcı toksik maddeler ve ağır metaller ortamda her geçen gün biraz daha artmaktadır. Tehlikeli boyutlarda ağır metal birikimleri sonucunda doğal suların kalitesi bozulmakta ve doğal sularda çeşitli tuzlar halinde bulunan ağır metaller genel olarak her türden su organizmasına akut toksik etkiye sahiptir [10].

1.1. Çinko Pirition

Çinko, doğada birçok mineral ile birleşim halinde bulunduğundan, ekosistemdeki, başlıca kaynağını endüstriyel ve madensel atıklar oluşturur [11]. Bu atıklardan farklı olarak atmosferik parçacıklar, evsel ve tarımsal atıklar, sucul ekosistemlerde çinko derişimini arttıran nedenlerdendir [5].

Çinko pirition (ZnPT); çinko koordinasyon kompleksidir ve yaygın olarak anti-kepek şampuanı olarak kullanılır [12].



Şekil 1.1. Çinko piritionun kimyasal formülü [13]

Tablo 1.1. Çinko piritionun fiziksel ve kimyasal özellikleri [13]

Molekül formülü	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ Zn
IUPAC ismi	bis(2-pyridylthio)zinc1,1'-dioxide
CAS numarası	13463-41-7
Molar hacmi	317,70 g/mol
Erime noktası	240°C
Sudaki çözünürlüğü	8 ppm (Ph 7)

Çinkonun membran bütünlüğünün korunmasında görev yaptığı gibi antioksidant bir rolünün olduğu da belirtilmiştir [14]. Buna ek olarak çinko hücre bölünmesinde, büyüme, metabolizma ve bağışıklık sisteminde de önemli roller oynamaktadır [15]. Organizmalarda çinkonun reaktif oksijen türleri, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve singlet Oksijen (O₂) gibi hücreye zarar veren serbest radikallere karşı koruyucu görev

yaptığı belirtilmektedir [16]. Çinkonun O₂ ve Kükürt (S) dönerleriyle çok kolay kompleks yapabildiği, nükleik asit biyosentezinde görev aldığı ve dokuların düzelmesiyle ilgisinin olduğu belirtilmiştir [17]. Çinkonun yüksek derişimleri ise sucul organizmalar üzerinde toksik etkiye sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir [18].

Balıklarda çinkonun hedef organı solungaç epiteli olup hypoksiya neden olmakta diğer taraftan ozmoregülasyon bozuklukları, asidosis, atardamarlarda düşük oksijen basıncı ve solungaç ve iç organlarda gaz değişimi aksamalarına neden olduğu bildirilmektedir [19]. Bunun yanı sıra çinkonun balıklarda solunum ve kalp fizyolojisinde değişimlere neden olduğu da belirtilmektedir [20]. Çinkonun organizmalarda yaptığı biyokimyasal değişimler arasında enzimler üzerinde yer alan diğer metallerin yerini alması, tiyol gurupları ve bazı aminoasitlere bağlanarak polipeptid zincirinde yapısal değişimlere neden olması, canlı hücrelerde enerji metabolizmasını etkilemesi, aşırı metallothionein üretimine neden olması ve tüm membranlarda iyon taşınım kanallarıyla etkileşime girmesi sayılabilir [21].

Birçok organizma için gerekli bir element olan Zn⁺²'nin, subletal derişimlerinde balıklarda büyümeyi geciktirici ve durdurucu etkilere neden olduğu, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği; doğurganlığı ve ozmoregülatör kapasiteyi bozduğu belirtilmektedir [22].

1.2. Genetik Toksikoloji

Genetik toksikoloji, kimyasallar ve radyasyonun kalıtsal materyaller ya da hücreler üzerindeki toksik etkilerini incelemektedir. Genetik toksikoloji ayrıca mikronükleus formasyonunu, kromozomal anomalileri, kromozomal anöploidileri ve memeli hücrelerindeki morfolojik ve neoplastik transformasyonları da kapsamaktadır. Buna ek olarak kimyasal karsinojenleri ve bunların onkogenleri aktivasyonunu, tümör supresör genlerindeki kötü huylu mutasyonları da incelemektedir. Genetik toksikoloji araştırmacılara DNA hasarını, kimyasal karsinojen UV ve iyonize radyasyonun mutajenik ve karsinojenik etkilerini ölçmeye olanak tanımaktadır [23].

1.3.Genetik Toksikoloji Testleri

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, çeşitli mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikleri bulmak için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. 1970’lerden bu yana mutajenik ve genotoksik olan maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Genotoksisite testleri birçok fiziksel ve kimyasal ajanın genetik araçtaki etkilerini ve güvenirliliklerini araştırmada geniş kullanım alanlarına sahiptir [24-28].

1.4. Mikronükleus ve Mikronükleus Testi

Mikronükleus; ana çekirdekten ayrı, asentrik kromozom veya kromatid fragmanları veya mitoz sırasında telofazın tamamlanmasında anafazda ayrılma sırasında iğ ipliklerine tutunmadığından çekirdeğe dâhil olmayan DNA parçalarıdır. Dolayısıyla mikronükleus, anafazda asentrik fragmanlara neden olan kromozom kırılmaları gibi klastojenik veya anöjenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir [29].

Mikronükleus sayısındaki artış, ajanların oluşturduğu sayısal ve yapısal olarak kromozom anomalilerinin dolaylı bir göstergesi şeklinde değerlendirilebilmektedir. Mikronükleus ara safhalı hücrelerde kolaylıkla saptanabilir. Mikronükleus testi, *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen bir test olmakla beraber sitogenetik hasarı tespit etmede, kromozom analizlerine göre kolay yapılabilir, daha fazla hücre sayımı ve istatistiki açıdan daha uygun sonuç eldesi gibi avantajlardan dolayı yaygın şekilde kullanım alanına sahiptir [30].

1.5. Akuatik Toksikolojide Mikronükleus Testi

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 1979 yılında 129 maddelik öncelikli çevre kirletici listesi yayınlamıştır [31]. Takip eden yıllarda bu liste yeni maddelerin eklenmesiyle yıldan yıla artış göstermiştir. OECD verilerin göre 1994 yılında mevcut olan 100.000 civarındaki kimyasal maddeye yılda yaklaşık 1.500 yeni kimyasalın eklendiğini öne sürülmektedir. Endüstriyel teknolojinin ilerlemesiyle

birlikte, endüstriyel atık kaynakları daha da karmaşık bir hale gelmekte ve bundan dolayı da atık suların toksisitesi de daha ciddi düzeylere ulaşmaktadır. Havayı ve toprağı kirleten doğal veya antropojenik kirleticiler nihayetinde su ortamına da ulaşmakta ve bu atıkların birikimi ve kalıcılığı biyolojik yaşamı tehdit eder hale gelmektedir. Kirleticilerin sucul ekosistemlere atılmasının hem bentozda hem de demersal ve pelajik ortamdaki besin zincirlerinde birikmesine yol açabileceğı bilinmektedir. Bu nedenle insanlar kirliliğe maruz kalmış sucul ortamda yaşayan canlıları besin olarak tükettikleri sürece toksik maddelere ömür boyu maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, kirleticilerin suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi oldukça önemlidir [32].

Suların biyolojik denetimi, kirletici konsantrasyonlarının sucul canlıların dokularındaki tespiti ile gerçekleştirilmektedir. Bu prosedür "doz göstergeleri" ve "etki göstergeleri" olarak isimlendirilen biyolojik parametrelerin muhtemel değişikliklerini ortaya çıkaran biyolojik belirteçlerdir. Doz göstergelerinin kullanılması, nelerin aranması gerektiğine ilişkin bilgiyi ima ederken, etki göstergelerinin kullanılması, henüz tanımlanmamış maddeler tarafından üretilen hasarın tespit edilmesine imkan vermektedir. Bu biyolojik göstergeler arasında, muhtemel kanserojenik özelliklere sahip sayısız madde tarafından üretilen hasarın tespit edilmesine izin verdiği için sitogenetik testler özellikle yararlıdır. Stahl [33, 34] endüstriyel atık suların %30'unun genotoksik kimyasallarla kirlendiğini belirtmiştir. Günümüzde bu durumun çok yüksek seviyelere ulaşmış olduğunu tahmin etmek zor değildir.

Mevcut sitogenetik tahlillerde klostojenik ve anevizik ajanların neden olduğu yapısal ve sayısal kromozomal aberasyonların tespitinde sıklıkla mikronükleus testi kullanılmaktadır. Mikronükleus testinin laboratuvar araştırmalarında ksenobiyotiklerin genotoksitesini değerlendirmek ve in situ çalışmalar sırasında su kalitesini değerlendirmek için uygun bir araç olduğu kabul edilmektedir [32].

Bu çalışma ile toksisitesi yüksek olan çinko piriton ağır metalinin canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılmasından hareketle 1/24 (2,5µl/L) ve 1/12 (5 µl/L)'sinin maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* türünün fingerlinglerin de oluşacak genotoksik etkilerin, mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mikronükleus, 19. Yüzyılın sonunda Howell ve Jolly'nin, kedilerden ve sıçanlardan alınan küçük inklüzyonları bulmasıyla tanındı. Howell-Jolly cisimleri olarak adlandırılan küçük inklüzyonlar, şiddetli anemi hastalarının periferik kan eritrositlerinde de görülmektedir [35].

Countryman ve Heddle [36] kültürde insan lenfositlerinin kullanıldığı bir yöntem bildirmişlerdir. Bu yöntemle Fenech ve Moley [37] tarafından sitokalazin B kullanılarak değişiklikler yapılmış ve bu değişiklikler insanlar tarafından kullanılarak günümüze kadar ulaşmıştır.

Lahdetie ve çalışma arkadaşları [38] ile Tates ve çalışma arkadaşları [39] erkek germ hücreleri kullanan bir yöntem bildirmişlerdir. Sundukları raporlarda, kimyasalların kalıtsal yan etkilerinin potansiyelini saptamak için mikronükleus testinin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Mikronükleus testi normalden büyük boyuttaki nükleusları da tespit etmektedir [40]. Mitotik aparatın bozulmasına neden olan kimyasalları tespit etmek için antikoru kullanarak kinetokora spesifik boyama başlatılmıştır [41]. Hayashi ve çalışma arkadaşları, periferik kandan mikronükleus izole etme yöntemi ve sentromere sahip olmayan mikronükleusları ayırt etme yöntemini bildirmişlerdir [42].

Balıklar sudaki genotoksikoloji alanında en çok kullanılan hayvanlardır. Balıklarla ilgili biyolojik izlenme tekniklerinin geliştirilmesi, düşük konsantrasyonda bile etki eden toksikantları kontrol etme imkânı sunmaktadır. Balıklar üzerine yapılmış olan ZnPT ile ilgili çalışmalara ve mikronükleus testine örnek olarak aşağıdaki çalışmalar gösterilebilir.

Clearwater ve çalışma arkadaşları [43] balıklar için besinlerde belirli oranlarda çinko bulunmasının şart olduğu bildirilmektedir ve bu oran çoğunlukla kuru yemde 20 mg/kg civarındadır. Borovansky [44], Chukhlovın [45] ve Wood [46] adlı araştırmacılar da çinkonun nispeten non-toksik bir element olduğunun kabul edilmesine rağmen, diğer

tüm ağır metaller de olduğu gibi canlının yüksek dozlara maruz kalması durumunda toksik etki gösterdiğini bildirmektedirler.

Thorp ve Lake bir tatlı su karidesi olan *Paratya tasamaniensis* için ZnPt'nin 96 saatlik LC₅₀ değerini 1,1 mg/l olarak bulmuştur [47] .

Burton ve Fisher; *Palaemonetes pugio* adlı karides türünde yapılan bir çalışmada çinko için 48 saatlik LC₅₀ değeri 11,3 mg/l olarak bildirilmiştir [48] .

Matthiesen, yaptığı çalışmada *Gastrosteus aculeatus*'un distile suda 0,5-1,0 mg Zn⁺²'ya maruz bırakılmasının balıkların 1-3 gün içerisinde ölümüne yol açtığını ancak sert suda 2.0-2.6 mg Zn⁺²'nın 700 saatlik bir süre boyunca balıklarda herhangi bir toksik etki göstermediğini kaydetmiştir [49] .

Phoxinus phoxinus ile yapılan bir çalışmada [50] 0,05-0,20 ppm Zn⁺²'ya maruz bırakılan balıkların 150 günlük süre sonunda kontrol grubuna oranla çok daha yavaş büyüme gösterdiğini tespit etmiştir. Araştırmacı aynı zamanda juvenillerin, erginlere oranla çinkoya daha duyarlı olduğunu vurgulamıştır. Brungs [51], Crandall ve Goodnight [52], Çinkonun sub-lethal konsantrasyonlarının uzun süreli uygulanmasının *Poecilia reticulatus*, *Pimaphales promelas* ve *Lebistes reticulatus* gibi balık türlerinde de büyümeyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Bu durumun çinko verilen balıklarda iştahın azalmasına ve/veya tat reseptörlerinin bozulmuş olmasına bağlı olabileceğini öne sürmüştür. Ancak diğer taraftan çinkonun, karaciğer mitokondrisinde inorganik fosfatın organik fosfata dönüştürülmesini bozduğu ve dokulara oksijen alımını inhibe ettiği bulunmuştur [53] .

Watson ve McKeown [54] 0,21-1,12 ppm çinkoya maruz bıraktıkları *Oncohyinchus mykiss*'de Zn uygulamasının balıklarda 7. güne kadar glukoz seviyesini arttırdığını, ancak sonraki dönemde glukoz seviyesinin tekrar normale döndüğünü tespit etmişlerdir.

Mishra ve Srivastava [55] ise 100 ppm çinkoya 90 saat süreyle maruz bırakılan *Colisa fasciatus*'da alyuvar ve akyuvar sayısı, hematokrit ve lökositin düştüğünü, trombosit sayısı, pıhtılaşma süresi ve hemoglobin seviyesinin değişmediğini, sedimentasyon oranının ise arttığını bulmuşlardır.

Grobler ve çalışma arkadaşları [56] *Tilapia sparrmanii*'de yaptıkları çalışmada çinkoya (98 mg/l) maruz bırakılan balıkların oksijen tüketim oranının düştüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada bu durumun solungaçlarda mukus birikimi ve/veya solungaçlarda meydana gelen yapısal hasar sonucu gelişmiş olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda çinkoya maruz bırakılan balıklarda laktik asit seviyesinin de yükseldiği bildirilmiştir [57].

Öner ve çalışma arkadaşları [58] 5, 10, 20 ve 30 gün süreyle $ZnCl_2$ 'e maruz bıraktıkları *O. niloticus* serum total protein seviyesinin değişmediğini tespit etmişlerdir.

Fırat ve Kargın [59] 0,5 mg/l'lik çinkoya 7 ve 14 gün süreyle maruz bıraktıkları *O. niloticus* albümin, seruloplazmin, plazma glukoz ve total protein seviyesinin her iki deneme süresinde de kontrol grubuna oranla yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Kurihara ve çalışma arkadaşları [60] tarafından *Umbra limi* ve *Carassius auratus* türlerinde kromozomal aberasyonları ve mikronükleusu incelenmiş, yine Ueda ve çalışma arkadaşları [61] tarafından ise *Rhodeus ocellatus* ve *C. auratus* türlerinde mitomisin C'nin etkileri mikronükleus testi ile belirlenmiştir.

Al-Sabti [62] tarafından ise *Carassius gibelio* türünde düşük konsantrasyonda selenyum, civa, metil civa ve bunların karışımının mikronükleus indüksiyonunu genotoksik etkileri belirlenmiştir.

Arkhipchuk ve Garanko [63] *Cyprinus carpio*, *C. gibelio* ve *Tilapia (Sarotherodon) mossambica* türlerinde bakır, kadmiyum iyonları ve kloral hidratın balık yüzgeçlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır.

Çavaş ve Adıgüzel [64] mikronükleus testi ile *C. auratus* türünde glifosatın periferik eritrositlerde sitogenetik ve DNA hasarını tespit etmişlerdir.

Gül ve çalışma arkadaşları [65] malathiona maruz kalan *Oxynoemacheilus angorae* türünün periferik eritrositlerindeki mikronükleuslarını incelemişlerdir.

Winter ve çalışma arkadaşları [66] *Pimephales promelas* türünün eritrositlerinde mitomisin C ve siklofosfamid akut tedavisi sonrası mikronükleus oluşumu ile ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Oreochromis niloticus son yıllarda sucul ekosistemdeki kirleticilerin biyolojik etkilerini incelemek için gösterge organizma olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 3.1). Bir sıcak su türü olan Nil tilapyası olumsuz çevre şartlarında kolaylıkla yaşayabilen bir balık olmakla birlikte organizmanın biyolojik yapısı incelendiğinde diğer balık türlerine oranla kötü çevre koşullarına daha dirençli oldukları görülmektedir [67].



Şekil 3.1. Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*)

Bu çalışmada da ZnPT'nin eritrositler üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, klinik olarak sağlıklı ve herhangi bir toksik maddeye maruz kalmamış olan *O. niloticus* fingerlingleri kullanılmıştır. Deney materyali olarak kullanılan *O. niloticus* bireyleri, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dr. Nazmi Tekelioğlu Tatlı Su Balığı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Kullanılan bireylerin ortalama ağırlıkları $37,08 \pm 0,02$ g ve total boyları ise $13,26 \pm 1,1$ cm olduğu belirlenmiştir. Balıkların deneylerde kullanılması Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13.06.2012 tarih ve 06 sayılı toplantısı ile onaylanmıştır.

3.1.1. Akvaryum Suyunun Fizikokimyasal Özellikleri

Araştırmada deney suyu olarak 24 saat bekletilen ve havalandırılarak kloru giderilmiş musluk suyu kullanılmıştır. Biyodeneyle sırasında hacmi 60 litre olan akvaryumlar 50 litre su ile doldurulmuştur. Akvaryum suyunun fizikokimyasal analizi günlük olarak portatif çoklu ölçüm cihazı (YSI Professional Plus) ile yapılmıştır. Deneyde kullanılan akvaryum suyunun su kalitesi değerleri Tablo 3.1. de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deney akvaryumlarındaki su kalitesi parametreleri

Parametre	Değer
pH	8,6
Çözünmüş Oksijen (mg/L)	5,7
Sıcaklık (°C)	22,8
Elektriksel İletkenlik (mS/cm)	609
Tuzluluk (ppt)	0,29
TDS (mg/L)	0,3914

3.2.Yöntem

3.2.1. Balıkların Deneye Hazırlanması

Çalışma için deney düzeneği Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında kurulmuştur. Deneyde kullanılan balıklar biyodeneyle önce dinlendirilmiş su ile dolu 50 litrelik tanklara konulmuş ve tanklar havalandırılmıştır. Balıklar deney öncesi 15 gün süre ile ortama uyum sağlaması için bu tanklarda bekletilmiştir. Uyum periyodu boyunca balıklar her gün bir kez ağırlıklarının % 2'si oranında granüllü alabalık yemi ile beslenmişlerdir ve deneyler başlamadan 48 saat önce yemlenme kesilmiş, bu süreç içerisinde balıkların hastalanma ve ölüm oranının % 5'ten fazla olmamasına dikkat edilmiştir [68]. Deney ortamındaki ışıklandırma, doğal periyoda uygun olarak 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney tanklarında aynı uyum periyodundaki tanklar gibi deklorize edilmiş şebeke suyu kullanılmış ve deney süresince tank suyunun sıcaklığı $22,8\pm0,7^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Kontrol grubu olarak ayrılan akvaryumlarda ki

bireylerde ölüm oranının %10'u geçmemesine ve %90'ının sağlıklı olmasına dikkat edilmiştir [68].

3.2.2. Kimyasalın Hazırlanması

Çinko piriton, dimetilsülfoksit (DMSO) (oatine powder, Arch Biocides, UK) içinde çözülerek hazırlanmış, saf su ile seyreltilerek 2,5 ml/L ve 5,0 ml/L olmak üzere iki farklı doz hazırlanmış ve uygulama süresince karanlık ortamda depo edilmiştir.

3.2.3. Deney Yöntemi ve Uygulama Planı

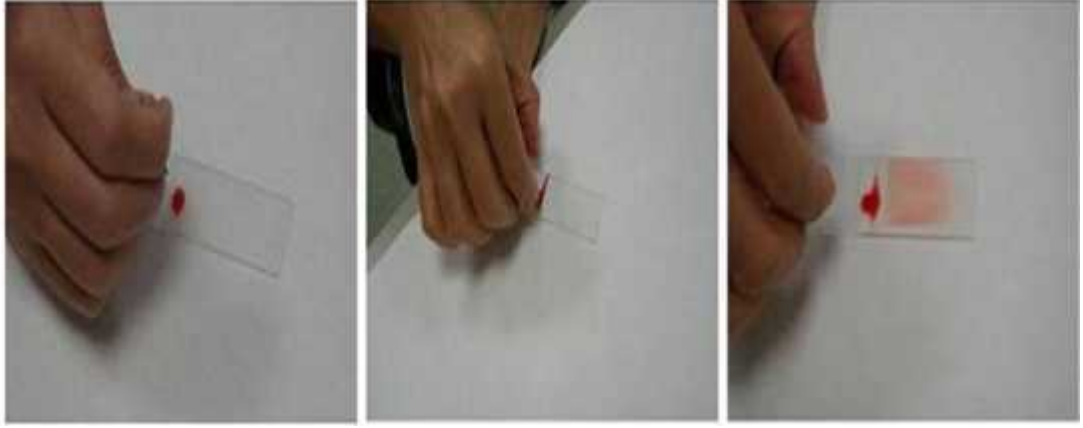
Balıklar rastgele olmak üzere kontrol ve deney gruplarına ayrılmıştır. Deney grubu (4 akvaryum) ve kontrol grupları (2 akvaryum) için toplam 6 adet akvaryum kullanılmış ve her birine 12 birey yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). Deney gruplarına Doz1: 2,5 µl/L ve Doz2: 5 µl/L olmak üzere iki farklı doz uygulanmıştır. Deney iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Akvaryumların üzeri çalışma süresince plastik bir örtü ile kapatılmıştır. Akvaryumlarda doz uygulamasından önce ve deney süresince balıkların olası davranış değişiklikleri takip edilmiştir. Deney doz uygulamasından itibaren 24 ve 96 saat süre devam ettirilmiştir. Bütün bireylerden 24 ve 96 saat sonunda kalp ve kuyruk bölgelerinden kan alınmıştır.



Şekil 3.2. Deney düzeneği

3.2.4. Mikronükleus Testi

Mikronükleus analizleri periferel kırmızı kan hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için kullanılan balıkların kalp ve kuyruk kısımlarından alınan kanlar, her örnek için hazırlanmış olan üç temiz lama ince bir tabaka şekilde yayılmıştır (Şekil 3.3). Hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra %95'lik etanolde 20 dk. süresince sabitlenmiştir (Şekil 3.4). Sabitlenen bu preparatlar tekrar havada kurutulduktan sonra %5'lik Giemsa solüsyonunda 20 dk. süresince boyanmışlardır (Şekil 3.5). Boyama işleminden sonra preparatlar, saf sudan geçirilerek fazla boya uzaklaştırılarak, sayımları yapılmak üzere mikroskop altında incelemeye alınmıştır [69].



Şekil 3.3. Yayma preparatlarının hazırlanması



Şekil 3.4. Preparatların boyama küvetlerine yerleştirilmesi



Şekil 3.5. Giemsa boyası ile preparatların boyanması

3.2.5. Mikronükleus Sayım Kriterleri

Her bireyden 6 preparat hazırlanmış olup her preparattan 1000 hücre sayılarak mikronükleus değerlendirilmesi yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda mikronükleus ile karıştırılabilen yapılarla karşılaşmamak için mikronükleus sayımlarında genel olarak standardize edilmiş ölçütler göz önüne alınmaktadır. Bu ölçütleri şöyle sıralayabiliriz.

Mikronükleuslar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır,

Mikronükleuslar ana nükleus 'la aynı mikroskopla görülebilecek görüntüyü vermeli,

Mikronükleuslar ana nükleus'un ile boyama tonları benzer olmalı,

Mikronükleuslar ana nükleus'un çevresine yakın durumda bulunmalı,

Mikronükleuslar boyut olarak ana nükleus'un 1/3'ünden küçük olmalıdır.

3.2.6. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi

Morfolojik nükleus düzensizlikleri periferik yayma ile kırmızı kan hücrelerinde değerlendirilmiştir. Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco ve çalışma arkadaşlarına göre [70]; çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmişlerdir. Değerlendirmeler için her preparattan 1000 hücre sayılmıştır.

a) Çentikli nükleus: Hücre zarında çekirdek içerisine doğru oluşan ve girintilere sahip çekirdek yapısıdır.

b) Tomurcuklu nükleus: Hücre zarından dışarı doğru küçük tomurcuklanmalara sahip çekirdek yapısıdır.

c) Loblu nükleus: Tomurcuklu nükleuslara göre büyük ve çok sayıda sayı da loblar içeren çekirdek yapısıdır.

d) Binükleus: Bir hücre içerisinde iki adet çekirdek bulunma durumudur.

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

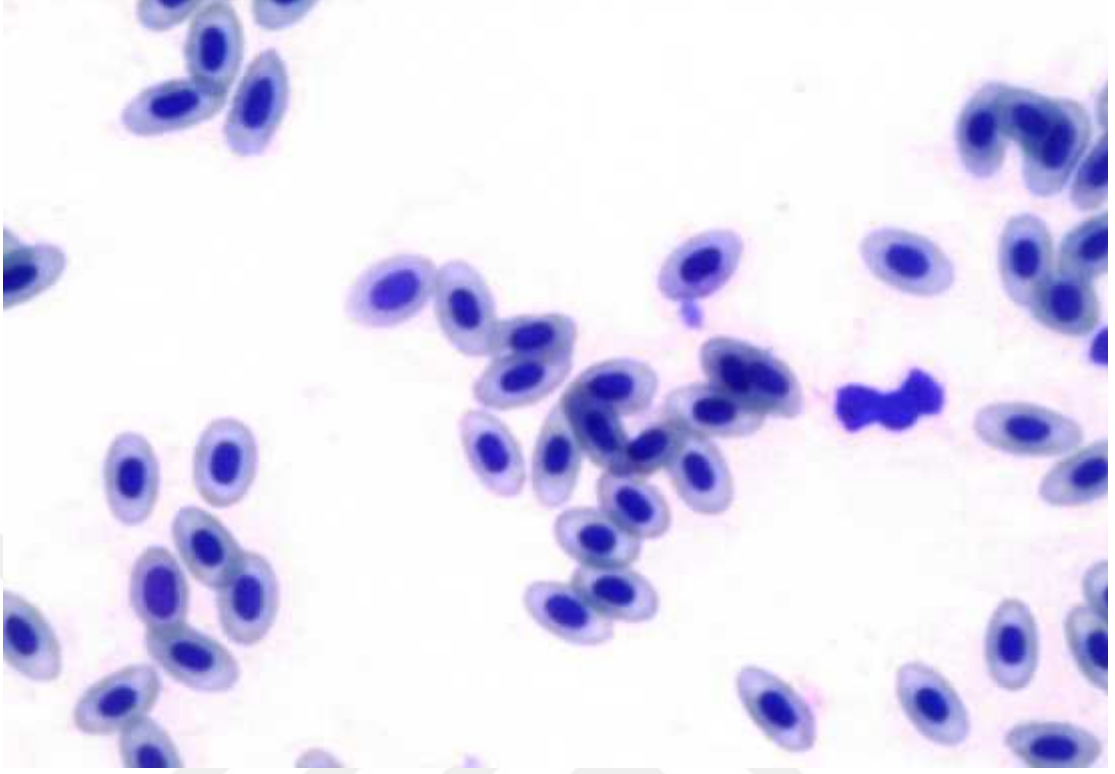
4.1.1. Biyodeneylere Ait Araştırma Sonuçları

Bu araştırmada sucul ekosistemin indikatör organizmalardan birisi olan balıklara (*O. niloticus*) toksisite gösterdiği düşünülen ZnPT kullanılmıştır. Araştırmanın hipotezi akut LC₅₀ değerinin 1/24 ve 1/12'si olan 2,5 ve 5 µl/L sublethal doz seviyesinde ZnPT 'ye, çevresel kirleticilere ergin balıklardan daha hassas olduğu bilinen Nil tilapyası fingerlingleri, maruz bırakıldıklarında mortalite (ölüm) görülmeden ve davranış değişiklikleri olmadan genotoksik hasarların mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

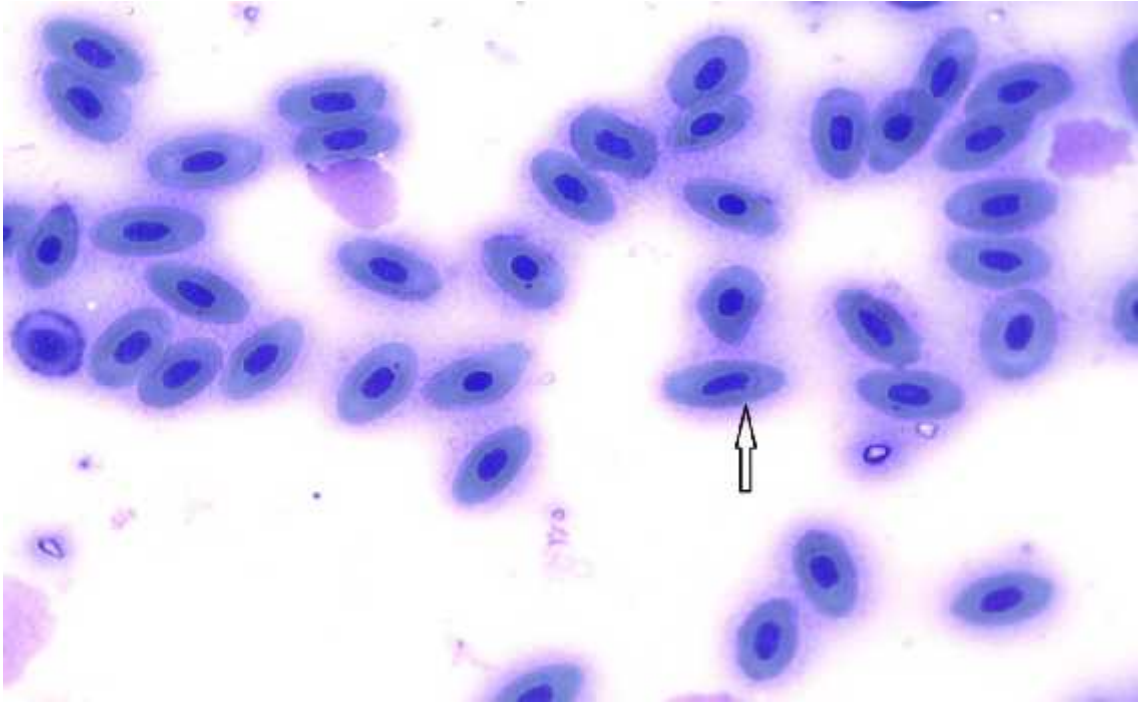
Bu amaçla laboratuvar şartlarında Nil tilapyası fingerlingleri 15 gün adaptasyon süresinin sonunda hesaplanan 2,5 ve 5 µl/L ZnPT konsantrasyonlarına 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılarak bu sürenin sonunda balıklardan alınan kanlar ile preparatlar hazırlanmış ve ışık mikroskobu altında mikronükleus sayımları yapıp, değerlendirilmiştir.

Boyaması yapılmış olan preparatların mikroskop altında incelenmesi sonucunda mikronükleus frekansları ile kromozom anomalilerinden tomurcuklu nükleus, çentikli nükleus, loblu nükleus ve binükleus frekansları belirlenmiştir.

Mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri kırmızı kan hücrelerinde incelenmiştir. Mikroskopta incelenen eritrosit hücrelerinin fotoğrafları 100'lük objektifte immersiyon yağı kullanarak çekilmiştir (Şekil 4.1-Şekil 4.5)



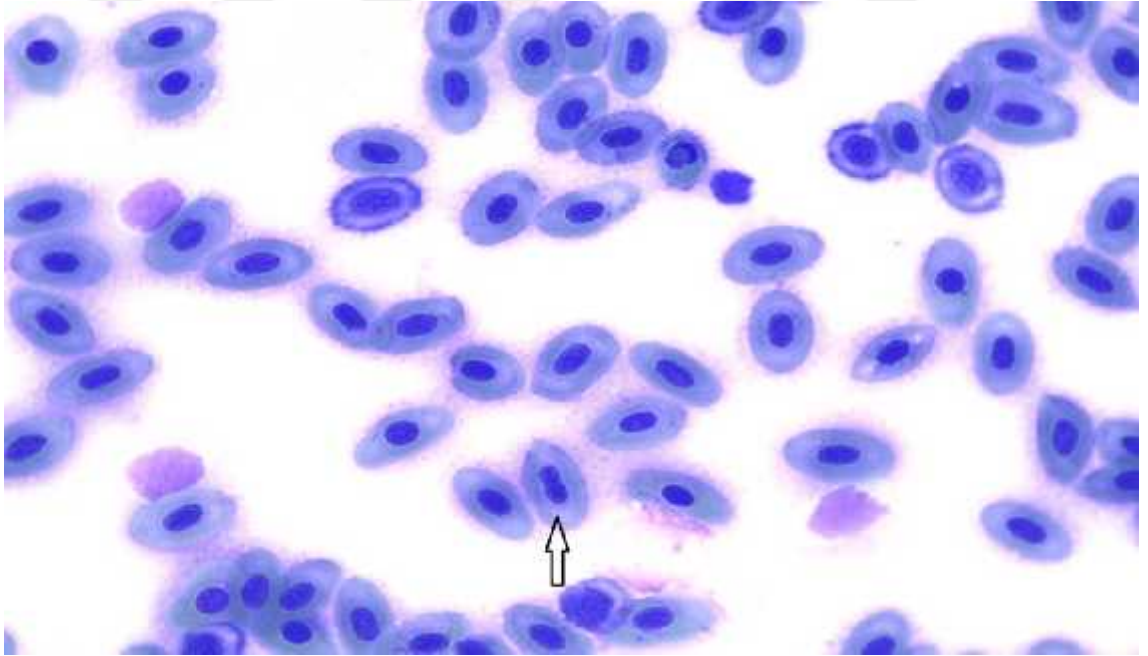
Şekil 4.1. Normal eritrosit



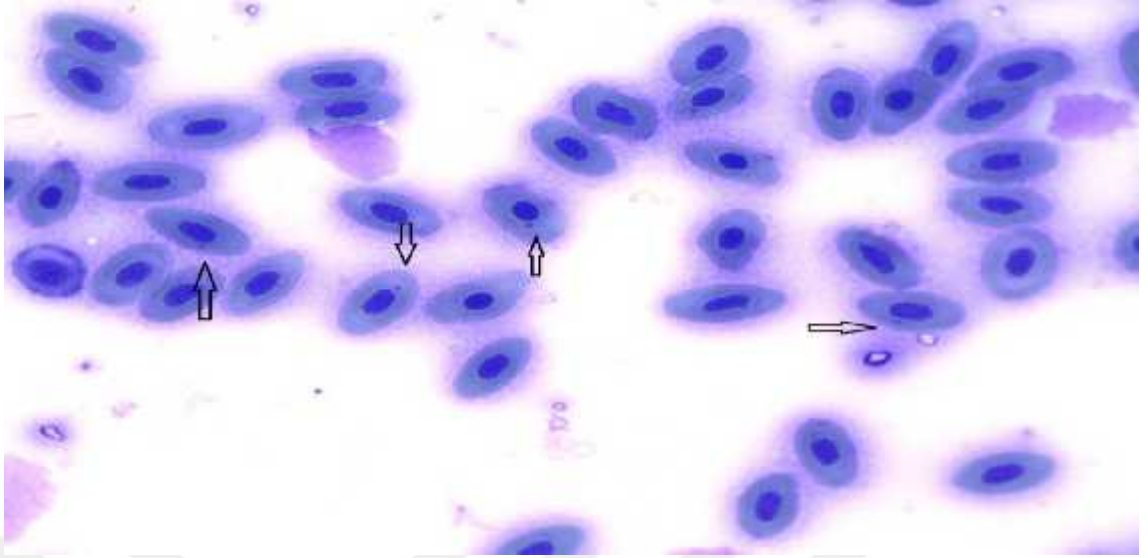
Şekil 4.2. Tomurcuklu nükleus görünümü



Şekil 4.3. Çentikli nükleus görünümü

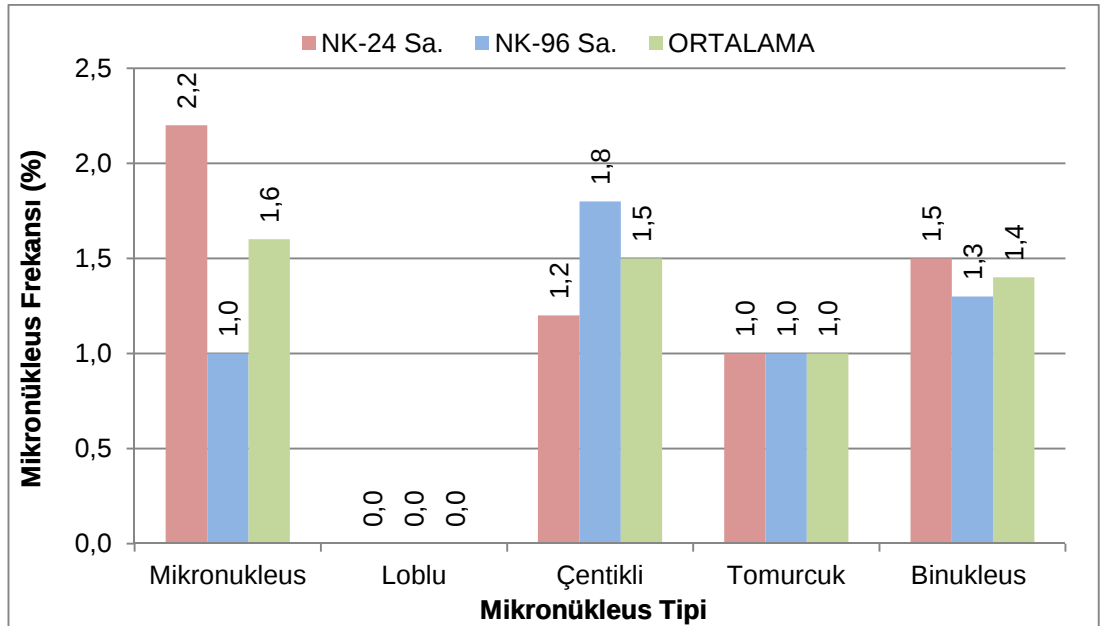


Şekil 4.4. Binükleus görünümü

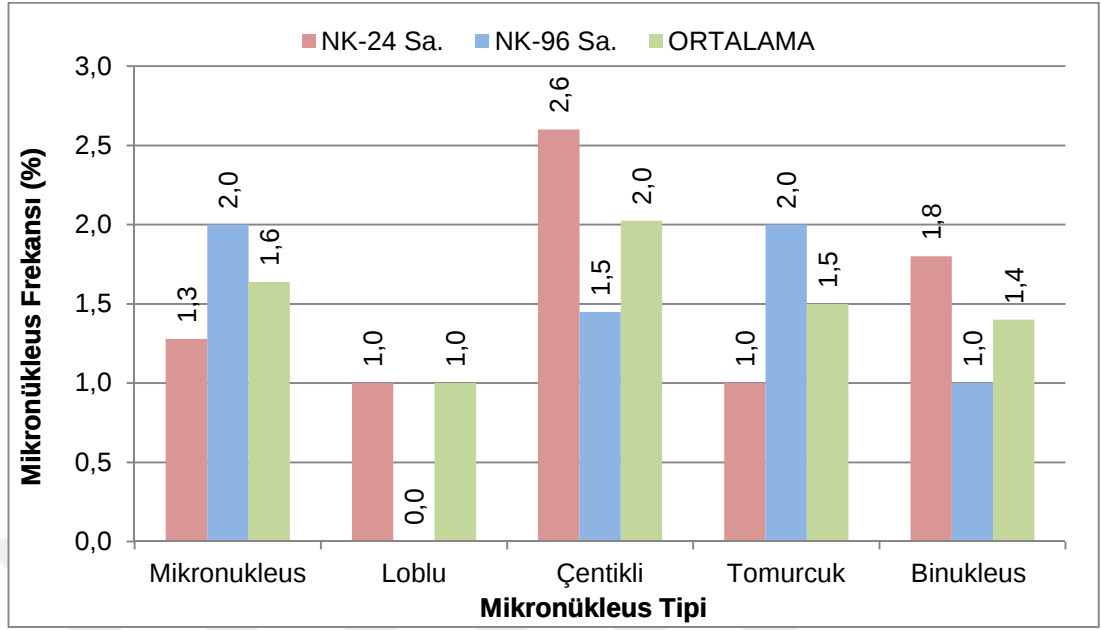


Şekil 4.5. Mikronükleus görünümü

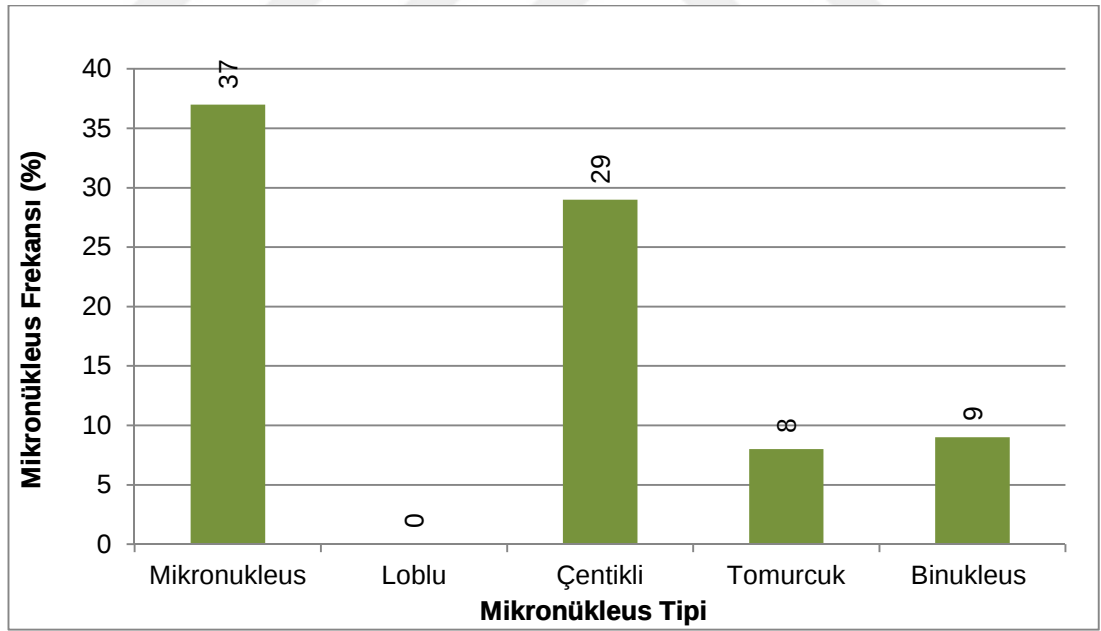
Belirtilen dozlarda ZnPT'a maruz kalan tilapialarda deney sonrası alınan kanlar ile kontrol grupları arasındaki genotoksik hasarlar mikronükleus testi ile incelenmiştir. Etil Metan Sülfat (EMS) yalnızca genotoksisite testinin pozitif kontrolü olarak kullanıldığı için deney sonuçlarında kıyaslama yapabilmek için bu gruptaki balıklardan da kan alınmış ve mikronükleus testi yapılmıştır.



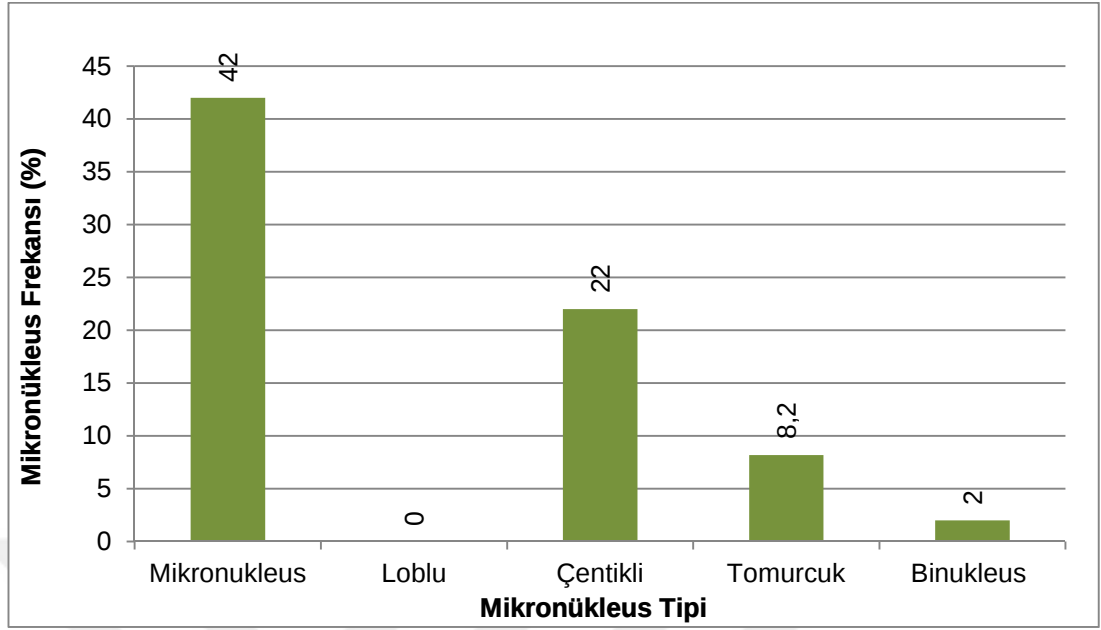
Şekil 4.6. Normal koşullarda 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



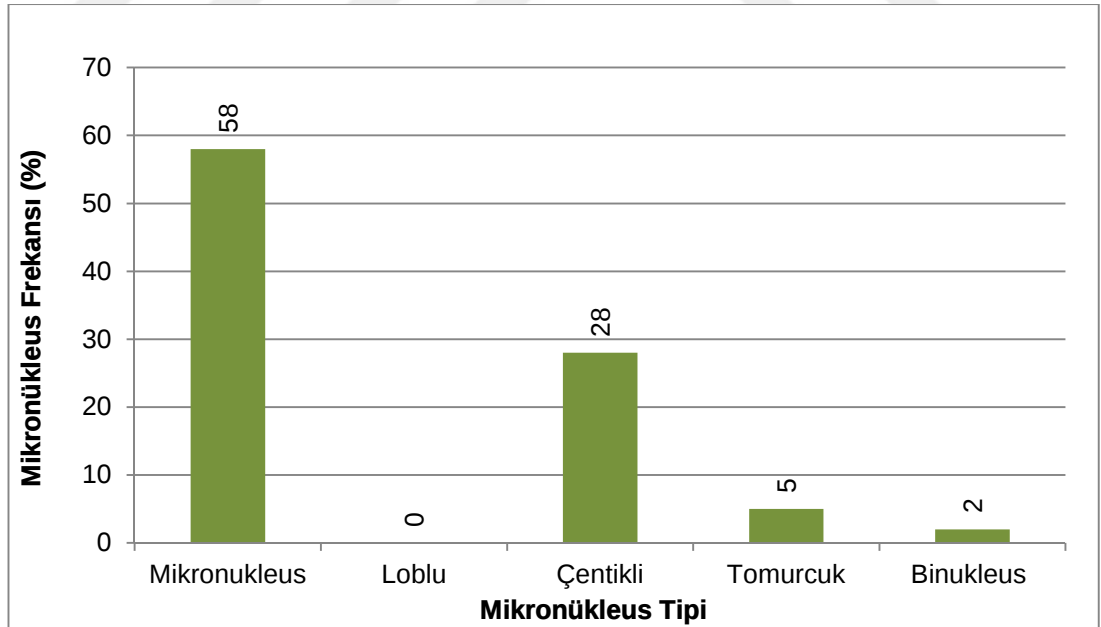
Şekil 4.7. Pozitif koşullarda 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



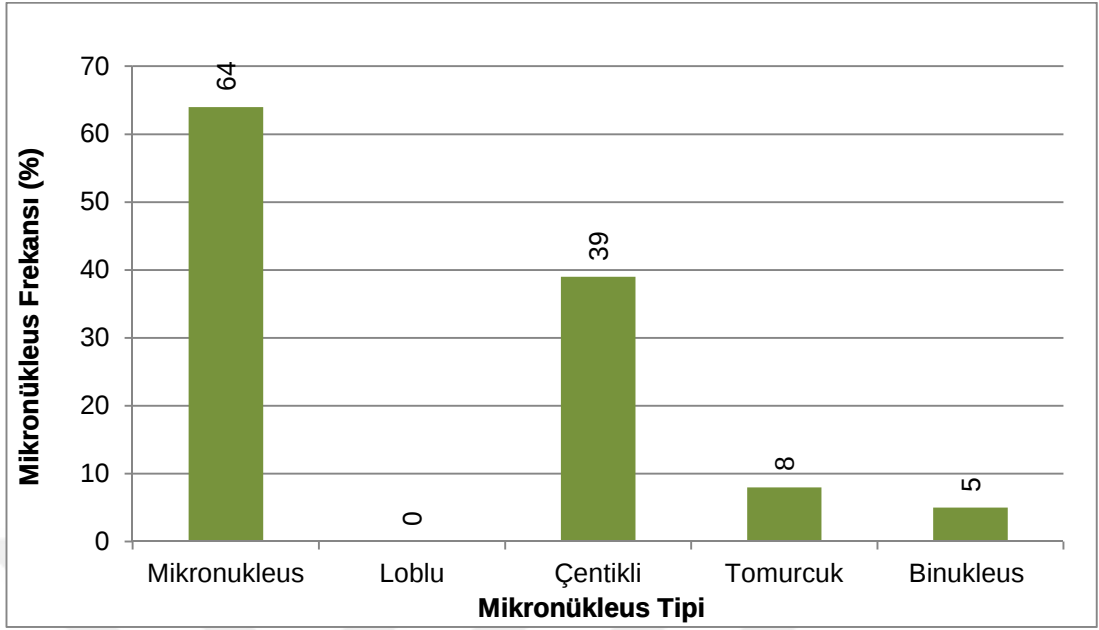
Şekil 4.8. Doz 1: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



Şekil 4.9. Doz 1: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



Şekil 4.10. Doz 2: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



Şekil 4.11. Doz 2: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları

Kontrol grubundaki balık materyallerinden elde edilen 1000X6 eritrosit hücresi sayımı sonuçlarına göre ortalama mikronükleus sayısı %6, toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %1,3 olarak belirlenmiştir.

Doz1 için; 2,5 µl/L 24 ve 96 saat boyunca ZnPT ‘ye maruz bırakılan balık materyallerinden elde edilen 1000X6 eritrosit hücresi sayımı mikronükleus ortalaması %39,5 toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %13,03 olarak belirlenmiştir.

Doz2 için; 5 µl/L 24 ve 96 saat boyunca ZnPT‘ ye maruz bırakılan balık materyalinden elde edilen 1000x6 eritrosit hücresi sayımı mikronükleus ortalaması %61 toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %14,49 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler sonucunda uygulanan ZnPT’nin doz artışına ve zamana bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit frekansında kontrol grubuna göre artış olduğu saptanmıştır.

4.1.2. Davranış Değişimlerine Ait Gözlem Sonuçları

Belirli konsantrasyonların üzerinde doğrudan organizmanın ölümüne neden olan ağır metaller öldürücü dozun altındaki yüksek konsantrasyonlarda davranış değişimlerine ve genetik yapıda bozulmalara neden olabilmektedir [18].

Sucul organizmalar stres faktörlerinde kaldıklarında beslenme, büyüme ve üreme davranışlarını değiştirerek tepki gösterirler [18].

Kontrol grubundaki balıklarda davranış ve yüzme hareketleri normal olup deney süresince ölüm görülmemiştir. Belirlenen süre ve derişimlerde denenen ZnPT'nin etkisinde balıklarda mortalite gözlemlenmemiştir. Ancak deney süresince ZnPT'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıklarda;

- ❖ Ani irkilme,
- ❖ Baş aşağı ve dikey yüzme,
- ❖ Yüzme hareketlerinde koordinasyon bozuklukları,
- ❖ Akvaryumun dip kısımlarında toplanarak hareketsiz durma,
- ❖ Su içerisinde ters dönme,
- ❖ Su yüzeyinde toplanma,
- ❖ Solunum güçlüğü ve hareketlerinde yavaşlama,
- ❖ Suyun dışına kaçma,
- ❖ Deney sonuna doğru tamamına yakınında renklerinde koyulaşma gibi değişimler gözlemlenmiştir.

4.2. Tartışma

Su kirliliğine neden olan kimyasal maddelerin bir kısmının kanserojen özellikte olması, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olması, kirliliğin şimdiki ve daha sonraki bireyler üzerinde yaratacağı olumsuz etkilerin düşünülmesi açısından, kirliliğe sebep olan kimyasallar üzerine yapılan sitogenetik ve sitotoksisite çalışmalarının önemini her geçen gün arttırmaktadır [71].

Çinko, sucul ortamlarda çok az miktarlarda bulunur. Fakat doğal ya da endüstriyel, madencilik ve tarımsal aktiviteler gibi temelde antropojenik kaynaklı faktörlerin etkisi

ile giderek artan derişimlerde bulunmaktadır. Sonuç olarak balıkların da içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan miktarlarının etkisinde kalmaktadırlar [72].

Çetinkaya (1998), Zn^{+2} zehirlilik oranının organizmanın türüne ve yaşına, özellikle suyun fizikokimyasal özelliklerine, yoğunluğuna bağı olduğu, ayrıca su sertliğindeki artışın Zn^{+2} zehirliliğinde azaltmalara neden olduğu ve çinkonun subletal yoğunluğunda organizmada üreme, gelişme ve immunitiyi azalttığı ve davranışlarını değıştirdiğini ortaya koymuşlardır. Suda tolere edilebilir maksimum Zn^{+2} alabalıkgillerde (Salmonidae) 0,03-0,5 mg/L, sazangiller (Cyprinidae) için 0,3-2,0 mg/L olduğunu bildirmiştir. Sazanda Zn^{+2} için öldürücü dozun altındaki yoğunluklarda 0,4 mg/L, zehir yoğunluğunun 2 mg/L, LC_{50} ise 0,78 mg/L olduğunu bildirmiştir. Ayrıca LC_{50} değıerinin su sertliğinin artışıyla yükseldiğini, sırasıyla 160, 385 ve 768 mg/L sertlikte LC_{50} değıerinin 3,82, 9,40 ve 12,32 mg/L olduğunu bildirmiştir [73].

Sharma ve Sharma (1995), tatlı su balığı olan *Cirrhinus mrigala*'nın gelişme aşamalarına çinkonun akut toksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada *C. mrigala*'nın yumurtalarının ileri gelişme safhalarına (larva, yavru, ergin) göre çinkoya dayanıklı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Deney süresince organizmanın solunum sayısında artış, kıvrılma hareketi ve denge kaybı gibi balık davranışlarındaki değışikleri gözlemlemişlerdir. Yumurta için çinkonun 24 saat LC_{50} değıerini 10 mg/L, yavru için 96 saat LC_{50} değıerini 7 mg/L, fingerlingler için 96 saat LC_{50} değıerini 0,35 mg/L olarak bildirmişlerdir [74].

Balıklarda ağır metallerin birikim göstermesi ve toksik etkileri diğeri bir taraftan suyun fizikokimyasal özelliklerine göre de değışim göstermektedir [75]. *Cyprinus carpio*'da dokulardaki kadmiyum birikiminin su sertliği ve alkanitesine bağı olarak değışim gösterdiği [76] *T. zilli* ve *C. lazera*'da ise çinko birikiminin sıcaklığa bağı olarak değışim gösterdiği belirlenmiştir [77]. *In vitro* koşullarında *O. niloticus* ile yürütölen bu araştırmada deney suyunun fizikokimyasal özellikleri Tablo 3.1' de verilmiştir.

Oreochromis niloticus ile yapılan bu çalışmada kontrol gruplarında izlenen balıklarda herhangi bir değışim olmazken, $ZnPT$ 'nin doz artışına ve zamana bağı olarak balıkların davranış ve yüzey şekillerinde farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca yapılan mikronökleus

testleri sonucunda mikronükleus sayılarında artış ve morfolojik nükleus düzensizlikleri gözlemlenmiştir.



BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

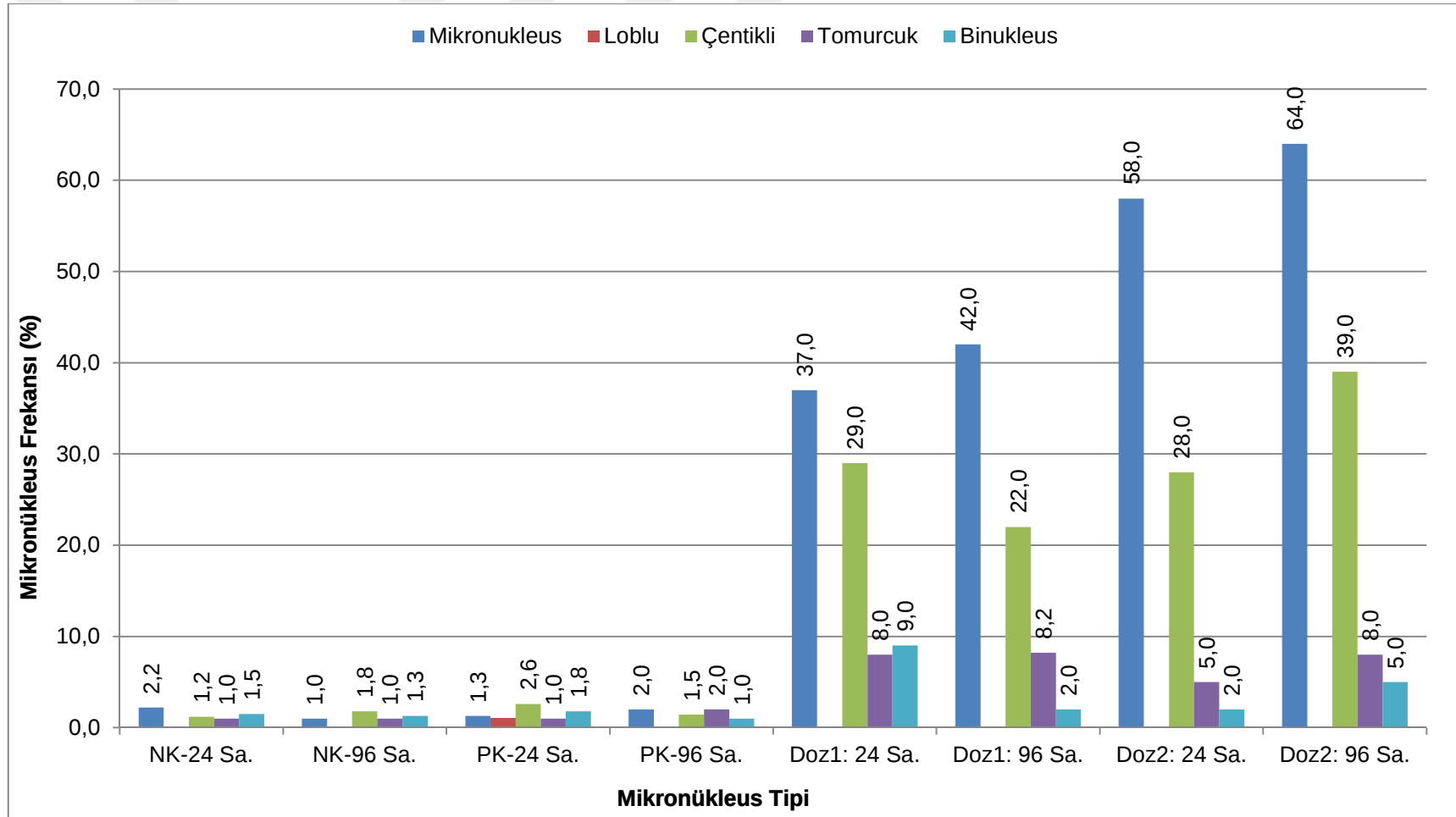
5.1. Genel Değerlendirme

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dr. Nazmi Tekelioğlu Tatlı Su Balığı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden getirilen *O. niloticus* bireyleri üzerine ZnPT'nin genotoksik hasarları mikronükleus testi ile incelenmiştir. Deney süresince hiçbir balık ölümü kaydedilmemiş olup, ZnPT uygulanan gruplarda ise; balık davranışlarında ve yüzme şekillerinde değişiklikler gözlenmiştir. Balıklar morfolojik olarak incelendiğinde ise ciltte ve yüzgeçlerdeki kılcallarda kanamalar tespit edilmiştir.

Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır ve mikronükleus sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. mikronükleus testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir.

Bu çalışma ile ZnPT'nin *in vitro* koşullarda *O. niloticus* türleri üzerine olan toksik etkileri mikronükleus testi ile belirlenmiştir.

Farklı dozlarda (Doz1: 2,5 µl/L ve Doz2: 5 µl/L) balıklara uygulanan ZnPT'nin bireyler üzerinde olumsuz etkileri gözlenmiştir. Dozların oranı ve süreleri arttıkça eritrositlerde görülen mikronükleus sayılarında ve çeşitlerinde artış görülmüştür.



Şekil 5.1. ZnPT 'ye 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan balıkların normal ve pozitif koşullara göre ortalama mikronükleus frekanslarının değerlendirilmesi

Sonuç olarak; yaptığımız bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular ZnPT'nin LC₅₀ değerinin 1/24 ve 1/12'si şeklinde uygulanan dozlarda mikronükleus sayılarında artış olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma bulgularına göre ZnPT diğer ağır metal bileşikleri gibi sucul ekosistemin kirlenmesinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sucul ortamda toksik madde kirliliğini engellenebilmesi için, ZnPT'nin mümkün olduğunca şampuan, merhem ve pudraların içinde, antifouling boyalarda, balık ağlarında, plastik ve kauçuk malzemelerin yapımında kullanılmaması, ZnPT yerine çevreye zarar vermeyen veya daha az zararlı kimyasalların tercih edilmesi sağlanmalıdır.

Yapılan araştırmalar, çevremizde her geçen gün sayıları artan birçok kimyasal maddelerin eser miktarlarının bile genotoksik ve mutajenik olabileceğini ortaya koymaktadır. Bunun için, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan fiziksel ve kimyasal ajanların başlıca insan genomu için mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Çünkü genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin aynı zamanda karsinojenik de olduğunu göstermektedir.

Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilen ve kolay uygulanabilen *in vivo* ve *in vitro* mikronükleus testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için güvenle kullanılabilecek bir genotoksisite testidir.

KAYNAKLAR

1. Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A., “Çevre Bilimi ve Çevre Teknolojisi”, Medisan Yayın Serisi, Yayın No, 36, Ankara, 1998.
2. Köse, E., Uysal, K., “Cinsi olgunluğa erişmemiş Pullu Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758)’ların kas, deri ve solungaçlarındaki ağır metal akümülayon oranlarının karşılaştırılması”, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17, 19-26, 2008.
3. Köse, E., “Enne Barajı’nda yaşayan balıklarda ağır metal birikiminin araştırılması” *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Kütahya, 2007.
4. Özdemir, H.İ., “Genel Anorganik ve Teknik Kimya”. *Matbaa Teknisyenleri Basımevi*, İstanbul, s. 1046, 1981.
5. Nussey, G., “Metal ecotoxicology of the Upper Olifants River at selected localities and the effect of copper and zinc on fish blood physiology.” *Ph. D-thesis*, Rand Afrikaans University, South Africa, s. 158, 1998.
6. Haktanır, K., “Çevre Kirliliği Ders Notu.” Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Teksir no. 107, s. 82-99, Ankara, 1983.
7. Tok, H.H., “Çevre Kirliliği.” Anadolu Matbaa Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, s. 266-283, 1997.
8. Uzunoğlu, O., “Gediz Nehrinden alınan su ve sediment örneklerinde bazı ağır metal konsantrasyonlarının belirlenmesi”, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 2-12, 26-73, Manisa, 1999.
9. Bryan, G., “Heavy metal contamination in the sea in: R. Johnston” *Marine Pollution Academic Press*, London, s. 185-302, 1976.
10. Bilgili, A., Sağmanlıgil, H., Çetinkaya, N., Yersan, E., Türel, İ., “Van Gölü suyunun doğal kalitesi ve buradan avlanan inci kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas 1811) örneklerinde bazı ağır metal düzeyleri”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (42), 445-450, 1995.
11. Hellawell, J.M., “Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management”, *Elsevier Applied Science Publishers Ltd.*, London and New York. s. 546, 1986.
12. Shuster, S., “The etiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents”, *British Journal of Dermatology*, 111, 235-342, 1984.

13. Thomas, K.V., "Determination of the antifouling agent zinc pyrrithione in water samples by copper chelate formation and highperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemicals ionisation mass spectrometry" *Journal of Chromatography*, s. 833, 105-109, 1999.
14. Bray, T.M., Bettger, W.J., "The physiological role of zinc as antioxidant", *Free Radical Biology and Medicine*, s. 8, 281-291, 1990.
15. Cousins, R.J., "Absorbtion, transport and hepatic metabolism of copper and zinc special reference to metallothionein and ceruloplasmin", *Physiological Reviews*, s. 65, 238-308, 1985.
16. Coudray, C., Rachidi, S., Favier, A., "Effect of zinc on superoxide dependent hydroxyl radical production in vitro", *Biological Trace Element Research*, 38, 273-287, 1993.
17. Cuvin-Aralar, M.L.A., "Survival and heavy metal accumulation of two *Oreochromis niloticus* (L.) strains exposed to mixtures of zinc, cadmium and mercury", *The Science of the Total Environment*, s. 148, 31-38, 1994.
18. Kargin, F., Erdem, C., "Bakır-Çinko etkileşiminde *Tilapia nilotica* (L.)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi", *Turkish Journal of Zoology*, s. 16, 343-348, 1992.
19. Spear, P.A., "Zinc in the aquatic environment, chemistry, distribution and toxicology", *National Research Council of Canada, Publication NRCC* s. 17589, 145, 1981.
20. Hughes, G.M., Tort, L., "Cardio-Respiratory responses of rainbow trout during recovery from zinc treatment", *Environmental Pollution Series A*, 37 (3), s. 225-66, 1985.
21. Gabryelak, T., Akahori A., Przybylska, M., Jóźwiak, Z., Brichon, G., "Carp erythrocyte lipids as a potential target for the toxic action of zinc ions", *Toxicology Letters*, s. 132, 57-64, 2002.
22. Watson, T.A., Beamish, F.W.H., "The effects of zinc on branchial adenosine triphosphatase enzymes in vitro from rainbow trout, *Salmo gairdneri*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 167-173, 1981.
23. Landolph Jr.J.R., "Genetic toxicology", *Encyclopedia of Toxicology* 3rd ed., *Academic Press*, Oxford. s. 715-725, 2014.

24. Choy, W.N., “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, *Marcel Dekker Inc.*, 390 p., New York, USA. 2001.
25. Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.G., Alvur, M., “DNA hasarı analizinde μ -Fadu ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103, 2004.
26. Zeiger, E., “History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, s. 44, 363-371, 2004.
27. Üstün, F., ‘Albendazol’ün olası genotoksitesi üzerine askorbik asitin etkisi.’ *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s. 100, İstanbul, 2007.
28. Atlı Gekeroğlu, Z., Gekeroğlu, V., “Genetik toksisite testleri”, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4 (3), 221-229, 2011.
29. Doherty, A.T., “The In Vitro Micronucleus Assay, Genetic Toxicology, Principles and Methods”, *Springer*, New York, s. 121-141, 2012.
30. Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z., “Genetoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4), 241-252, 2011.
31. Environmental fate of 129 priority pollutants, *U.S. Environmental Protection Agency.*, EPA-440/4-79-029, 1979.
32. Udriou, I., “The Micronucleus Test for Aquatic Toxicology”, *Aquatic Toxicology Research Focus*, Svensson, E.P., *Nova Publishers*, s. 145-160, 2008.
33. Tucker, J.D., Preston, R.J., “Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment”, *Mutation Research*, 365, 147-159, 1996.
34. Stalh, R.G., “The genotoxicity of organic compounds in natural waters and waste waters”, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 22, 94-125, 1991.
35. Hayashi, M., “The micronükleus test-most widely used in vivo genotoxicity test”, *Genes and Environment*, 38 (1), 2016.
36. Coutryman, P.I., Heddle, J.A., “The Production of micronuclei from Chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes”, *Mutation Research*, 41 (321), 1976.

37. Fenech, M., Morley, A.A. "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutation Research*, 147 (1-2), 29-36, 1985.
38. Lahdetie, J., Parvinen, M., "Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat", *Mutation Research*, 81, 103-115, 1981.
39. Tate, A.D., Dietrich, A.J.J., de Vogel, N., Newteboom, I., Bos, A., "A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals," *Mutation Research*, s. 121, 131-8, 1983.
40. Thomson, E.J., Perry, P.E., "The identification of micronucleated chromosomes, a possible assay for aneuploidy", *Mutagenesis*, 3, 415-418, 1988.
41. Degraffi, F., Tanzarella, C., "Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei, a new assay for the detection of aneuploidy", *Mutation Research*, 203, 339-45, 1988.
42. Hayashi, M., Maki-Paakkanen, J., Tanabe, H., Honma, M., Suzuki, T., Matsuoka, A., Mizusawa, H., Sotuni, T., "Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence in situ hybridization with a mouse centromeric DNA probe", *Mutation Research*, 307, 245-51, 1994.
43. Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., "Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish", *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology*, 132 (3), 269-313, 2002.
44. Borovansky, J., Blasko, M., Siracky, J., Schothorst, A.A., Smit, N. P.M., Pavel, S., "Cytotoxic interactions of Zn in vitro, melanoma cells are more susceptible than melanocytes", *Melanoma research*, 7, 449-453, 1997.
45. Chukhlov, A.B., Tokalov, S.V., Yagunov, A.S., Westendorf, J., Reincke, H., Karbe, L. "In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal rich complex environmental mixtures, potential role of zinc and cadmium excess", *Science of the Total Environment*, 281, 153-163, 2001.
46. Wood, C.M. "Toxic responses of the gill", In, Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. *Taylor&Francis*, London, s. 1-87, 2001.
47. Thorp, V., Lake, P., "Toxicity bioassays of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp, *Paratya tasmaniensis*", *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 25, 97-104, 1974.

48. Burton, D.J., Fisher, D.J., "Acute toxicity of cadmium, copper, zinc, ammonia, 3,3 - dichlorobenzidine, 2,6-dichloro-4-nitroaniline, methylene chloride, and 2,4,6-trichlorophenol to juvenile grass shrimp and killifish", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 776-783, 1990.
49. Matthiesen, P., "The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gasterosteus aculeatus*", *Journal of Fish Biology*, 5 (5), 607-613, 1973.
50. Bengtsson, B.E., "Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*", *Oikos*, 25, 370-373, 1974.
51. Brungs, W.A. "Chronic toxicity of zinc to the fathead minnow, *Pimephales promelas*", *Transactions of the American Fisheries Society*, 98, 272-279, 1969.
52. Crandall, C.A., Goodnight, C.J., "Effects of sub-lethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy *Lebistes reticulatus*", *Limnology and Oceanography*, 7, 233-239, 1962.
53. Hiltibran, R.C., "Effects of cadmium, zinc, manganese and calcium on oxygen and phosphate metabolism of bluegill liver mitochondria", *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 43, 818-823, 1971.
54. Watson, T.A., McKeown, B.A. "The effect of sublethal concentrations of zinc on growth and plasma glucose levels in rainbow trout", *Journal of Wildlife Diseases*, 12, 263-270, 1976.
55. Mishra, S., Srivastava, A.K., "Hematology as index of sub-lethal toxicity of zinc in a freshwater teleost", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 695-698, 1979.
56. Grobler, E., Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., "Toxic effects of zinc and iron on the routine oxygen consumption of the *Tilapia sparrmanii*", *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology*, 94(1), 207-214, 1989.
57. Grobler, E., "The effect of atrazine, zinc and iron on the hematology and oxygen consumption of *Tilapia sparrmanii*", *M.Sc. Thesis. Rand Afrikaans University, South Africa*, 118pp, 1988.
58. Öner, M., Atlı, G., Canlı, M., "Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (2), 360-366, 2008.

59. Fırat, O., Kargın, F., “Effects of zinc and cadmium on erythrocyte antioxidant systems of a freshwater fish *Oreochromis niloticus*”, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24 (4), 223-229, 2010.
60. Kurihara, Y., Rienkarn, M., Etoh, H., “Cytogenetic adaptive response of cultured fish cells to low doses of X-rays”, *Journal of Radiation Research*, 33, 267-274, 1992.
61. Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., “A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells”, *Water Science and Technology*, 25, 235-240, 1992.
62. Al-Sabti, K., “Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells”, *Mutation Research*, 320, 157-163, 1994.
63. Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., “Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 42-55, 2005.
64. Çavaş, T., Konen, S., “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, 2007.
65. Gül, S., Nur, G., Kaya, T.Ö., Kamber, U., Gürdegin, B., “Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Orthrias angorae* (Steindachner, 1987) exposed to malathion”, *Fresenius Environ Bulletin*, 16, 472-476, 2007.
66. Winter, M.J., Ellis, L.C., Hutchinson, T.H., “Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide”, *Mutation Research*, 629, 89-99, 2007.
67. Tekelioğlu, N., “İç Su Balıkları Yetiştiriciliği”, *Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*. Yayın No, 2, Adana, 2000.
68. Anonymous, “Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater”, *APHA, AWWA, WPCF*, Washington, D.C., 1971.
69. Arslan, P., Ali Dalgıç, M., Sarıçakmak, S., Sarıgil, N., Ülker, Ş., Koçak Memmi, B., “Çamaşır suyu ve bulaşık deterjanının *Lepistes* (*Poecillia reticulata* Peters, 1859) balıkları üzerindeki genotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması”, *Mehmet Akif Ersoy Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, s. 34, 2011.

70. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., “An assessment of the piscine micronucleus test as an in-situ biological indicator of chemicals contaminant effects”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2723-2136, 1990.
71. Toguyeni, A., Fauconneau, B., Boujard, T., Fositer, A., Kuhun, E.R., Mol, K.A. and Baroiller, J.F., “Feeding behaviour and food utilization in Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effect of sex ratio and relationship with the endocrine status”, *Physiology Behavior*, 62, 273-279, 1997.
72. Gül, S. “Kura-Aras havzasında yaygın olarak bulunan *Orthrias angorae* (Steindachner, 1897), *Orthrias panthera* (Heckel, 1843) ve *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)’de kromozomal çalışmalar” <http://uvf.ulakbim.gov.tr>, 2008.
73. Cıçık, B., “Bakır-çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio*)’nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri”, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12 (48), 32-36, 2003.
74. Çetinkaya, O., “Balıklarda Çinko (Zn) İhtiyacı ve Toksisitesi”, *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9 (1-2), 83-88, 1998.
75. Sharma, A., Sharma, MmS., “Acute toxicity of zinc certain developmantal stages of *Cirrhinus mriagala* (Hamilton)”, *Journal of Environmental Biology*, 16 (2), 157-162, 1995.
76. Witeska, M., Jezierska, B., “The effects of environmental factors on metal toxicity to fish”, *Fresenius Environmental Bulletin*, 12 (8), 824-829, 2003.
77. Hollis, L., Mcgeer, J.C., Mcdonald, D.G., Wood, C.M., “Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout”, *Aquatic Toxicology*, 46, 101-119, 1999.

ÖZGEÇMİŞ

Nejla ÖZCAN 1991 yılında Bartın’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Karabük’te tamamladı. Karabük Fevzi Çakmak Lisesi mezunu olup, 2009 yılında kazandığı Nevşehir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2015-2017 yılları arasında İstanbul Özel Bağcılar Tekden Hastanesinde çalıştı.

Adres: Yıldırım Beyazıt Cad. Zafer Mah. Mühürdar sok. No:10 Bahçelievler /İSTANBUL

E-posta: nezo.unal@hotmail.com