



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-DR-2015-01**

KÜLTÜR BALIKLARINDA BİYOBELİRTEÇLER İLE KİRLİLİĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Ersin KARTAL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-DR-2015-01

KÜLTÜR BALIKLARINDA BİYOBELİRTEÇLER İLE
KİRLİLİĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Ersin KARTAL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Mehmet Ersin Kartal tarafından hazırlanan “Kültür Balıklarında Biyobelirteçler ile Kirliliğin Değerlendirilmesi.” başlıklı tez, 26/01/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

- | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------|
| 1) Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK | ADÜ Veteriner Fakültesi | |
| 2) Prof.Dr.Ferda AKAR | ADÜ Veteriner Fakültesi | |
| 3) Prof.Dr.Kamil SEYREK | BÜ Tıp Fakültesi | |
| 4) Prof.Dr.Funda KIRAL | ADÜ Veteriner Fakültesi | |
| 5) Prof.Dr.Pınar Alkım ULUTAŞ | ADÜ Veteriner Fakültesi | |

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla/.../2015 tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Antropojenik kaynaklı birçok organik kirletici kimyasal maddeler özellikle son yüzyılda artan petrol tüketimi ve pestisit kullanımı ile beraber sulu ortamlarda birikerek zaman zaman sulu ortamlardaki canlı yaşamını tehdit edecek boyutlara ulaşmaktadır. Organik veya inorganik kirleticiler balıklarda solungaç deformasyonu, solunum bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, histopatolojik sorunlar ile beraber en büyük hasarı karaciğer enzimleri üzerinde oluşturmaktadırlar.

Kirletici faktörlerin biyolojik etkilerinin kirliliğin kendisine göre daha önemli oluşu 1970’li yılların başında dile getirilmeye başlanmıştır. Suda yaşayan canlılarda maruz kalınan kirliliğin organizmadaki etkileri, kirliliğin neden olduğu ksenobiyotik ile ilişkili bir molekül ya da ürünün organizmadaki doku ya da vücut sıvısında ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik ve diğer metabolitlerdeki değişimin ölçülmesi ile izlenmektedir. Belirli bir ksenobiyotik maddeye maruz kalan bir organizmanın genetik faktörlerini ve reseptörlerini de kapsayan bu değişimler biyobelirteçler (biomarker) şeklinde adlandırılmaktadır. Biyobelirteçlerde meydana gelen değişimler çevresel risk değerlendirmesi (ERA) süreçlerinde son 30-40 yılda giderek yaygınlaşan bir oranda kullanılmaktadır. Hatta bazı akademisyenler biyobelirteçlerin kirliliğin kendisinden daha önemli olduğunu belirtmektedirler.

Balıklarda ERA sürecinde kullanılabilecek biyobelirteçler; biyodönüşüm enzimleri, oksidatif stres parametreleri, biyodönüşüm ürünleri, stres proteinleri, metalotiyoneinler (MT) ve multi ksenobiyotik direnç (MXR), hematolojik parametreler, immünolojik parametreler, üreme ve endokrin parametreleri, nöromusküler parametreler, genotoksik parametreler, fizyolojik parametreler ve morfolojik parametreler şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada Bozdoğan sınırları içinde yer alan Kemer barajında doğal ortamda ve Fethiye’de beton havuzlarda yapılan kültür balıkçılığında üretilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) numunelerinde Faz-1 enzimi EROD aktivitesi, Faz-2 enzimi GST aktivitesi ve GSH, oksidatif stres parametresi olarak lipid peroksidasyonu ürünü olan

MDA ile nöromusküler parametre olan ACHE olmak üzere toplam beş parametre çalışılmıştır. Her geçen gün yaygınlaşan kültür balıkçılığında beslenmeden veya bulundukları ortam suyundaki değişikliklerden kaynaklanabilecek kirlenmenin, balıkların karaciğer ve kaslarındaki kirlilik biyobelirteçleri üzerindeki etkileri yukarıdaki biyobelirteçlerle araştırılması amaçlanmıştır.

“Kültür balıklarında biyobelirteçler ile kirliliğin değerlendirilmesi” (**VTF-12011**) isimli tez çalışması Adnan Menderes Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sularda Kirliliğe Sebep Olan Unsurlar	1
1.1.1. Organik Kirleticiler	1
1.1.2. Bitkilerin Anormal Büyümesine Neden Olan Kirleticiler ve Trofik Durum	4
1.1.3. Anorganik Kirleticiler	4
1.1.4. Sıcaklık	7
1.1.5. Pestisitler	7
1.2. Ekolojik veya çevresel risk değerlendirmesi (ERA)	8
1.3. Çevresel Kirlenmeyi İzleme Metotları	9
1.4. Biyoakümülayasyona Bağlı Belirteçler	10
1.5. Biyobelirteçler	12
1.6. Balıklarda Biyobelirteçler	15
1.7. Faz-I Enzimleri	18
1.7.1. Etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi	20
1.8. Faz-II Enzimleri (Konjugasyon enzimleri)	21

1.8.1. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH ve GSSG)	23
1.8.2. Glutatyon-S-Transferazlar (GST)	25
1.9. ACHE Aktivite İnhibisyonu (Nöromusküler Analiz)	25
1.10. Lipid Peroksidasyonu ve MDA analizi	26
1.11. Biyobelirteç türler	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Balık numunelerinin alınması	30
2.2. Su numunelerinin alınması	31
2.3. Kullanılan Cihazlar	31
2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.5. Kullanılan Çözeltiler	33
2.5.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözelti	33
2.5.2. ACHE tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	33
2.5.3. Glutatyon S Transferaz (GST) Aktivite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	34
2.5.4. Glutatyon (GSH) Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	34
2.5.5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	34
2.5.6 Mikrozomal Fraksiyon Hazırlamada kullanılan çözeltinin hazırlanması	35
2.5.7. 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	35
2.6. Kullanılan yöntemler	36
2.6.1. Sitozolik fraksiyon hazırlama	36
2.6.2. Mikrozomal fraksiyon hazırlama	36
2.6.3. Karaciğer ve Kas dokularında total protein tayini	37
2.6.4. Dokuda MDA Analizi	37

2.6.5. Dokuda Asetil Kolinesteraz Tayini (ACHE)	38
2.6.6. Dokuda Glutasyon (GSH) Analizi	39
2.6.7. Dokuda GST analizi	40
2.6.8. Dokuda EROD aktivitesinin analizi	41
2.6.9. Su Numunelerinin Analizi	42
2.5.10. İstatistiksel Analizler	43
3. BULGULAR	44
3.1. Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	44
3.2. Su Numunelerinin Kalitelerinin Değerlendirilmesi.	45
3.3. MDA Analiz Sonuçları	49
3.4. ACHE Analizi Sonuçları	51
3.5. Glutasyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi sonuçları	53
3.6. Glutasyon (GSH) analizi sonuçları	56
3.7. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) analizi sonuçları	58
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ	78
ÖZET	80
SUMMARY	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	96
TEŞEKKÜR	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

GA	Glukuronik Asit
ACHE	Asetil Kolin Esteraz
AHH	Hidrokarbon Hidroksilaz
AhR	Aril hidrokarbon reseptörü
ARNT	Aril Hidrokarbon reseptörü nükleer yerdeğiştirici
ATC	Asetiltiyokolin
BAM	Bioaccumulation Monitoring
BCF	Bioconcentration Factor
BCHE	Bütıl Kolin Esteraz
BEM	Biological Effect Monitoring
BKME	Bleached-Kraft Mill Effluent
BMF	Biomagnification Factor
BOD	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
BSA	Bovine Serum Albümin
BSAF	Biota Sediment Accumulation Factor
BTC	Butiriltiyokolin
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene
CHE	Kolinesteraz
CM	Chemical Monitoring
cyt P450	Sitokrom p450 izoenzimleri
DEHP	Di-2-Ethyl-Hexyl Phthalate

DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DO	Çözünmüş Oksijen
DRE	Dioksine Duyarlı Elementler
DTNB	5-5'- Dithiobis -2-Nitrobenzoik Asit
DTT	Dithiothreitol
EH	Epoksit Hidrolaz
EM	Ecosystem Monitoring
ERA	Ecological or Environmental Risk Assessment
EROD	Etoksirezorufin O-Deetilaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HAH	Halojenize Aromatik Hidrokarbon
HM	Health Monitoring
HSP	Isı Şok Protein
HSP90	90 kda Isı Şok Proteini
JTU	Jackson Turbidity Units
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LAS	Linear Alkylbenzene Sulfonate
MDA	Malondialdehit
MFO	Mixed-Function Oxidase
MO	Mikrozomal Monooksijenaz
MT	Metalotiyoneinler

MXR	Multi ksenobiyotik direnci
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAT	N-asetiltransferaz
NPE	Nonifenol Etoksilat
NTU	Units of Nephelometric
OCP	Organophosphate and carbamate pesticides
OP	Organofosfat
PAH	Poliaromatik hidrokarbonlar
PCB	Poliklorlu Bifenil
PCDD	Dibenzo-p-Dioksinler
PCDF	Poliklor Benzo Furanlar
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PTC	Propiyoniltiyokolin
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SPMD	Semipermeable Membrane Devices
ST	Sülfotransferaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloro asetik asit
TDI	Trofik Durum İndeksi
TSS	Total Suspended Load
UDP-GT	Üridin-5-Difosfat-Glukuronozil Transferaz
UGT	Udp-Glucuronil Transferaz

ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 2.6.3.	Total protein tayininde kör, numune ve standartın hazırlanması.	37
Çizelge 2.6.7.	GST analizi için kör ve numune tüplerinin hazırlanışı.	40
Çizelge 2.6.8.	EROD analizi için hazırlanan çözeltilerin 96'lık küvete ilave edilen hacimleri ve son derişimleri.	41
Çizelge 2.6.9.	Su kalitesi parametrelerinin analizinde kullanılan metotlar.	42
Çizelge 3.1.	Numune alınan istasyonlara ait suların fiziksel ve kimyasal parametreleri.	44
Çizelge 3.2a.	Kıtaici Yüzeysel Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleri.	46
Çizelge 3.2b.	Belirli NTU veya JTU aralıklarda bulanıklık değeriinin balıklara etkileri.	47
Çizelge 3.3a.	Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama MDA düzeyleri.	49
Çizelge 3.3b.	Mevsimlere göre ortalama MDA seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.	50
Çizelge 3.3c.	İstasyonlara göre ortalama MDA seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.	50
Çizelge 3.4a.	Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama ACHE aktiviteleri.	52
Çizelge 3.4b.	Mevsimlere göre ortalama ACHE aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.	52

Çizelge 3.4c.	İstasyonlara göre ortalama ACHE aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.	52
Çizelge 3.5a.	Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama GST aktiviteleri.	54
Çizelge 3.5b.	Mevsimlere göre ortalama GST aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.	54
Çizelge 3.5c.	İstasyonlara göre ortalama GST aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.	55
Çizelge 3.6a.	Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama GSH düzeyleri.	56
Çizelge 3.6b.	Mevsimlere göre ortalama GSH seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.	57
Çizelge 3.6c.	İstasyonlara göre ortalama GSH seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.	57
Çizelge 3.7a.	Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi düzeyleri.	59
Çizelge 3.7b.	Mevsimlere göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi ve önemlilik düzeyleri.	59
Çizelge 3.7c.	İstasyonlara göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi ve önemlilik düzeyleri.	59
Çizelge 3.7.7.	Tüm istatistiksel analizlerin özet tablosu.	61

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.3.	Çevresel kirliliğin izlenmesinde kullanılan metotlar.	10
Şekil 1.5.	Ksenobiyotiklerin biyodönüşüm metabolizması.	15
Şekil 1.6.	Karaciğer hücresinde ksenobiyotik bileşiklerin biyodönüşümünün basitleştirilmiş gösterimi.	16
Şekil 1.7.1.	Etoksirezorufin'in NADPH varlığında dealkilasyonu sonucu rezorufin'e dönüşümü.	20
Şekil 1.8.	A-Benzo(a)pyrene'in; B-Naftalin'in transformasyon mekanizması	22
Şekil 1.8.1.	Glutatyonun (GSH) kimyasal yapısı.	24
Şekil 1.10.	Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.	27
Şekil 2.1.	Gökkuşaağı alabalığı numunelerinin alındığı balık çiftlikleri.	30
Şekil 3.2.	Fethiye ve Kemer barajındaki sularda ocak ve temmuz dönemlerinde amonyak seviyeleri grafiği.	48
Şekil 3.3a.	Fethiye'de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama MDA seviyelerinin değişim grafiği	50
Şekil 3.3b.	Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama MDA seviyelerinin değişim grafiği.	50
Şekil 3.3c.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama MDA seviyelerinin mevsimlere göre değişim grafiği.	51
Şekil 3.3d.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama MDA seviyelerinin istasyonlara göre değişim grafiği.	51
Şekil 3.4a.	Fethiye'de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama ACHE aktivitesinin değişim grafiği.	53

Şekil 3.4b.	Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama ACHE aktivitesinin değişimi.	53
Şekil 3.4c.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama ACHE aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği.	53
Şekil 3.4d.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama ACHE aktivitesinin istasyonlara göre değişim grafiği.	53
Şekil 3.5a.	Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GST aktivitesinin değişim grafiği.	55
Şekil 3.5b.	Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GST aktivitesinin değişim grafiği.	55
Şekil 3.5c.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GST aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği.	55
Şekil 3.5d.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GST aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği.	55
Şekil 3.6a.	Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GSH seviyelerinin değişim grafiği.	57
Şekil 3.6b.	Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GSH seviyelerinin değişim grafiği.	57
Şekil 3.6c.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GSH seviyelerinin mevsimlere göre değişim grafiği.	58
Şekil 3.6d.	Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GSH seviyelerinin istasyonlara göre değişim grafiği	58
Şekil 3.7a.	Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama EROD aktivite değerlerinin değişimi grafiği.	60
Şekil 3.7b.	Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama EROD aktivite değerlerinin değişimi grafiği.	60

- Şekil 3.7c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama EROD aktivite değerlerinin mevsimlere göre değişimi grafiği. 60
- Şekil 3.7d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama EROD aktivite değerlerinin istasyonlara göre değişimi grafiği. 60

1. GİRİŞ

Su makro moleküllerin yapıtaşı olması, küçük moleküller ve iyonlar için iyi bir çözücü olması, iyi bir substrat ve kosubstrat olması, iyi bir ısı regülatörü olması ve enerjiyi iyi bir şekilde yönetmesi gibi özelliklerinin yanı sıra, kirliliğinin canlılar üzerindeki olumsuz etkisinden dolayı canlılık olaylarını biyomoleküler düzeyde inceleyen biyokimya bilimi açısından önemli bir biyomoleküldür (Bayşu ve Bayşu 2008). Yeryüzündeki su kaynaklarının ancak % 0.74 gibi küçük bir kısmı içilebilir su kaynağı durumundadır ve hem içilebilir su kaynakları hem deniz ve okyanuslardaki canlılar, insan nüfusunun son 65 yılda 2,5 milyardan 6,5 milyara çıkmasıyla ve ilerleyen sanayi faaliyetleriyle artan bir kirliliğe maruz kalmaktadır (Akın ve Akın 2007).

Yirminci yüzyılın başından beri antropojenik aktivite dramatik bir şekilde artmış; tarımsal ilaçlar, kimyasal gübreler, endüstriyel atıklar, petrol tüketimi ve evsel atıklar tüm çevresel faktörler üzerinde olumsuz etkilenmeye sebep olmuştur. Sulu ortamlar ksenobiyotikler, poliklorlu bifenil (PCB), klorlu pestisitler, poliklor benzofuranlar (PCDF) vb. klorlu organik bileşikler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), dibenzo p-dioksinler (PCDD) ve ağır metalleri kolaylıkla çevreye ulaşılabilir hale getirmektedir (Havelkova ve ark. 2007, Oost ve ark. 2003).

1.1. Sularda Kirliliğe Sebep Olan Unsurlar

1.1.1. Organik Kirleticiler

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bifeniller (PCB), di-2-etil-heksil ftalat (DEHP), lineer alkilbenzen Sülfonatlar (LAS), nonilfenol etoksilatlar (NPE), dibenzo-p-dioksinler (PCDD) ve poliklor benzo furanlar (PCDF) gibi yaklaşık 6000

organik bileşik arıtılmamış su kaynaklarında tespit edilmiştir ve bu kirlilik büyük oranda insan kaynaklıdır. Bunların bir kısmı yüksek oranda dayanıklı olmasına rağmen bir kısmı kirli su arıtma sistemlerinde parçalanabilmektedir (ICON 2001).

En önemli tarımsal alan kirliliği kaynağı tarımsal alanların aşınması ile oluşan topraktır. Taşınan bu toprağa sediment denir. Bu toprak yağmur suyu ile göl ve akarsulara taşınır suyu bulandırarak güneş ışığının su bitkilerine ulaşmasını engeller. Aynı zamanda balık larvalarının gelişimini engeller ve balıkların solungaçlarını tıkar. Ayrıca gübre, pestisit ve ağır metal gibi birçok kirlletici toprak ile (sediment) beraber taşınır ve sudaki yaşam için ölümcül olan alg çoğalması ve oksijen azalmasına sebep olur. Çiftçiler uygun tedbirlerle sedimentasyon ile toprak kaybını % 20-90 arasında engelleyebilmektedirler. Organik ve inorganik maddelerin bir karışımı olan sedimentler bakteriler için iyi bir ortamdır. Aerobik parçalanma oksijenle parçalanma sonucu meydana gelir ve karbondioksit, nitrik asit, sülfürik asit, fosforik asit gibi bileşikler oluşur. İlerleyen evrelerde aerobik solunum yapan bakteriler için oksijen yetersiz hale gelir ve ölürlür. Aerobik bakteriler öldükçe anaerobik bakteriler oluşur ve organik maddeleri oksijensiz solunumla indirgenme reaksiyonları sonucu parçalayarak metan, amonyak, amin grubu bileşikler, hidrojen sülfür, fosfin ve merkaptan (R-SH) gibi toksik bileşiklere çevirirler (EPA 2005).

Sediment bir ırmakta aşağı doğru iki şekilde hareket eder. Sediment tanecikleri süspansiyon halinde asılı olarak kalabilir (total suspended load-TSS), ya da ırmak dibine çökebilir (bed load). Sediment miktarı genelde TSS olarak ölçülmektedir ve bir litre sudan süzölmüş sedimentin mg cinsinden kuru ağırlığı suyun akış hızı ile çarpılarak hesaplanır (Georgia Environmental Protection Division 2001).

Bir su bitki ve hayvanların yaşamasına yetecek konsantrasyonda oksijen ihtiva etmiyorsa bu suya kirli su denir. Aquatik bitki ve hayvanların yaşayabilmesi için sudaki oksijen konsantrasyonunun belirli bir düzeyde olması gerekir. Oksijen konsantrasyonu düşüklüğünden en çok omurgalılar (balıklar) ondan sonra omurgasızlar etkilenir. En azda bakteriler etkilenir (Tan 2006).

Sentetik Organik Kirleticiler; petrol kökenli yakıtlar, plastikler, plastikleştiriciler, ilaçlar, deterjanlar, elyaflar, elastomerler, pestisitler, besin katkı maddeleri, çözücüler ve

yağlı boyalar gibi maddeler sentetik organik maddeler olarak adlandırılır. Yapay organik zirai mücadele ilaçları (pestisitler) uzun yıllar boyunca kullanılması durumunda biyokimyasal süreçte indirgenmeye uğrayarak besin zincirine girer ve canlılarda biyoakümülyasyon sonucunda zararlı etkiler ortaya çıkmaya başlar (Tan 2006).

Sentetik organik maddelerin bir kısmı doğal sularda bulunan su bakterileri tarafından parçalanamadıkları gibi atık madde işleme proseslerinde de parçalanamazlar. Zamanla suda aşırı miktarda birikirler ve suların kokusunu ve tadını olumsuz yönde etkilerler. Bu durum su ekosisteminde yaşayan balık türlerinde azalmaya sebep olabilirler (Tan 2006).

Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOD); aerobik şartlarda bakterilerin organik maddeleri parçalamak için ihtiyaç duydukları oksijen ihtiyacı olarak tanımlanır. Organik maddelerin biyolojik oksidasyonunun tamamlanması için 20 günden fazla bir süre gerekmeyle beraber, BOD miktarının büyük bir kısmının ilk 5 günde kullanıldığı görülmüştür. BOD reaksiyonları çoğunlukla birinci dereceden reaksiyonlardır. Reaksiyon hızı belli bir anda geriye kalan parçalanmamış organik madde miktarı ile orantılıdır (Güler ve Çobanoğlu 1994).

Bir suyun litresinin oksijen ihtiyacı 3 ppm olursa oldukça saf, 5 ppm olursa saflığı şüphelidir. Hiç işlem görmemiş atık sular (BOD) değeri 100 ile 400 ppm arasında değişir. Gıda endüstrisinden gelen atık suların BOD değerleri 10000 mg/l'te kadar yükselebilir (Tan 2006).

Balıklar ve diğer su hayvanlarının yaşamı suda çözünmüş oksijen miktarına bağlıdır. Sudaki çözünmüş oksijen miktarı suyun sıcaklığına, akarsudaki sediment miktarına, solunum ve organizmaların çürümesi esnasında kullanılan oksijen miktarına, bitkilerin fotosentezle ürettiği oksijen miktarına, akıntıya ve havalandırmaya bağlıdır. Çözünmüş oksijen miktarı mg/l ya da ppm ile ifade edilir. Soğuk sular sıcak sulara kıyasla daha fazla çözünmüş oksijen içerir. Bu yüzden sıcak su akıntıları akarsularda kaygılandırıcı bir durumdur. Alabalık 8 mg/l'nin üzerinde, çizgili levrek 5 mg/l'nin

üzerinde, sıcak su balıkları ise 2 mg/l'nin üzerinde çözünmüş oksijene (DO) ihtiyaç duyarlar (Georgia Environmental Protection Division 2001).

1.1.2. Bitkilerin Anormal Büyümesine Neden Olan Kirleticiler ve Trofik Durum

Antropojenik atıklar sonucu sudaki C, S, P, K, N ve diğer bazı eser elementlerin sudaki konsantrasyonu artmaya başlar. Bu su bitkilerinin aşırı büyümesi ve çoğalmasını takiben ve sudaki oksijen miktarının azalmasıyla sonuçlanır ki bu durumun oluşumu gölün trofik durumu incelenerek anlaşılır. Bunun sonucunda bazı balık türleri yaşayamaz hale gelebilir ve su ekosistemi zarar görür (Tan 2006).

Trofik durum göllerin mevcut doğası ve ileride meydana gelebilecek durumu hakkında bilgi verir, trofik durum indeksi (TDI) ile ifade edilir. Trofik durum belirlemede göllerin besinlerle zenginleşmesi, fitoplanktonun tür bileşimi, fauna, flora miktarı ve niteliği gibi birçok parametreye bakılır. Trofik durumdan yararlanılarak göller Oligotrofik, Mezotrofik ve Ötrofik olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Bu bölümlerin kesin bir nitelendirilmesi yoktur (Tülek 2006).

1.1.3. Anorganik Kirleticiler

Atık sularındaki tuzlar, metal bileşikler ve asidik mineraller suda asitliğin artması, tuzluluğun artması, toksikliğin artması gibi sorunlara yol açmaktadır (Tan 2006).

Asitliğin artması; yağmur sularıyla ya da madencilik drenajlarıyla ortaya çıkan kirliliktir. Yağmur sularıyla asitliğin artması havadaki kirlilikten kaynaklanmaktadır. Madencilik drenajlarından kaynaklanan kirlilik ise bakır, çinko, demir, kurşun gibi metallerin sülfür bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Metal sülfür bileşiklerinin en çok bilineni pirit (FeS₂). Pirit daha çok kömür madenlerinde kömür yıkama işlemi esnasında kömürden ayrılan bir bileşiktir. Sülfürik asit gibi kuvvetli asitler suya karıştığında sudaki karbondioksitin çözünürlüğü azalır bitkilerin büyümesi yavaşlar suyun tampon kapasitesi

düşer ve asidik değişimlere daha duyarlı hale gelir. pH 4'ün altında aquatik hayat durma noktasına gelir, birkaç cins bakteri ve bazı algler dışında omurgalı ya da omurgasız canlılar önemli oranda zarar görür (Tan 2006).

Asit yağmurları balıklara kimi zaman zarar veren ya da öldüren, balık popülasyonunu düşüren, bazı balık türlerinin yok olmasına sebebiyet vererek biyoçeşitliliği azaltan bir etkiye sahiptir. Asit yağmurları akarken topraktaki alüminyumun serbest kalmasına sebebiyet verir. Asit yağmurları ile beraber pH'ın düşmesi ve sudaki alüminyumun artması balıklar için toksik etkiye sahiptir. Bu durum balıkların ölmesine sebebiyet vermese de kronik strese yol açar, balıkların zayıf ve küçük olmasına neden olur (EPA 2008).

Bazı tür hayvan ve bitkiler asidik sulara dayanıklı olmasına karşın bazı türler pH'nın düşmesine karşı duyarlıdır. Çoğu türlerin genç olanları çevresel şartlara yetişkinlere göre daha duyarlıdır. pH 5'de balık yumurtalarının çoğu yumurtadan çıkamaz. Bazı asidik göllerde balık yaşamaz. pH birçok balık türünde yumurta oluşumuna ve gelişimine etki etmektedir. Yumurtadaki ve yumurtadan çıkan balığın kanındaki kalsiyum miktarını da düşürmektedir (Oğuzhan ve Atamanalp 2008).

Tuzluluğun Artması; Tuzların aquatik hayata zarar vermesi daha çok osmotik olayla ilgilidir. Aquatik canlıların hücrelerindeki tuz oranındaki denge yaşadıkları suda tuz oranının artması ile bozulur. Canlı hücresi osmoz nedeniyle su kaybeder ve ölür. Bu durum su ekosisteminde bazı türlerin yok olmasına sebebiyet verir. Kimyasalların yumurta ve embriyolara toksik etkisi üzerine su sertliği önemli oranda etki etmektedir. Su sertliği kimyasalların yumurta içerisine nüfuzunu ve yumurtaların açılma süresini etkilemektedir (Tan 2006).

Ağır metal kirliliği; Hg, Pb, Cd, Cr, Ni gibi bazı ağır metal katyonları canlı vücudunda birikerek toksik etki gösterirler. Bakır ve çinko karışımı uygulanan sazan (*Cyprinus carpio* L.) balığında solungaçlardaki çinko birikimi dışında en fazla bakır ve çinko birikimi karaciğerde, en az birikim ise kaslarda meydana gelmiştir (Cicik 2003).

Seyhan nehrinde *Cyprinus carpio*, *Barbus capito* ve *Chondrostoma regium* balıklarının solungaç, karaciğer ve kas dokularında yapılan kadmiyum, kurşun, bakır, krom ve nikel düzeyi tayininde solungaçlarda en fazla, kas dokusunda ise en az miktarda ağır metal kirliliğine rastlanmıştır (Canlı ve ark 1998).

Sazan balıkları yüksek hız yarı iletken üretiminde kullanılan galyum elementine farklı derişimlerde maruz bırakılmıştır ve elektron mikroskobu ile yapılan incelemede hepatositlerde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak sıra dışı şekil oluşumu görülmüştür. Sitopatolojik olarak çekirdekte sıra dışılık ve heterokromatin oluşumu, endoplazmik retikulumda bozulma ve vezikulasyon, mitokondride bozulma görülmüştür. Ayrıca hepatositlerin sitoplazmasında lizozomlarda çoğalmayla beraber elektron yoğun cisim ve yağlanma görülmüştür (Yang ve Chen 2003).

Asya tenyası ve Largemouth sarıbalığı, *Labeobarbus kimberleyensis* ile yapılan çalışmada 23 farklı ağır metalin konsantrasyonları araştırılmış ve en fazla ağır metal konsantrasyonunun sedimentlerde en az ağır metal konsantrasyonunun ise kas dokusunda olduğu görülmüştür. Tenya indikatör olarak kullanılmış ve mevsimsel olarak metal birikimi gözlenmiştir. Tenyada sonbaharda selenyum, civa ve kurşun birikimi; kışın bakır, çinko, selenyum, kadmiyum, antimon, talyum ve civa birikimi; ilkbaharda lityum, çinko, selenyum, kadmiyum ve antimon birikimi; yazın ise çinko birikimi görülmüştür. Genel olarak metal birikimi eğilimi ağırlıklı olarak sediment >su> tenya > karaciğer > omurilik > kas şeklinde gerçekleşmiştir (Retief ve ark 2006).

Yapılan birçok çalışmada ağır metaller balıkların üreme ile ilgili birçok problemlere yol açtığı görülmüştür. Kadmiyumun gökkuşağı balıklarında testosteron hormonunun seviyesini artırdığı; bakır, çinko ve kurşunun dere balıklarında yumurta verimini etkilediği, testis ve ovaryumlarda histopatolojik değişimlere yol açtığı; çinkonun ringa balığında kuluçka süresini kısalttığı ve larvaların normalden küçük olmasına sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca bakır balığın tüm vücudunu etkilerken; çinko ve kurşun testisleri bakırdan daha fazla etkilemiştir (Oğuzhan ve Atamanalp 2008).

1.1.4. Sıcaklık

Su sıcaklığı akuatik canlıların metabolizma hızını ve üreme fonksiyonlarını etkilemektedir. Sularda sıcaklık artışı canlıların metabolizmasının hızlanmasına bağımlı olarak oksijen ihtiyaçlarını da artırır. Oksijen yetersizliği ise canlılarda strese sebep olmaktadır. Sularda sıcaklığın artışı ayrıca çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olan organizmaların üremesine de sebebiyet vermektedir. Bitki örtüsünün zarar görmesi ve sanayi kaynaklı sıcak su atıkları sularda sıcaklık artışına neden olmaktadır. Örneğin kuzeydoğu Pasifik akıntısının sıcaklığının bitki örtüsü tamamen ortadan kaybolduğunda sekiz derece arttığı görülmüştür (Georgia Environmental Protection Division 2001).

1.1.5. Pestisitler

Tarım arazilerinde zararlı böcekler, hastalık etmenleri, ya da yabancı otlarla mücadele amaçlı kullanılan kimyasal maddelere pestisit denir. Pestisitler su kanallarında yaşayan bitkilere karşı kullanıldıklarında, pestisit imalat fabrikalarının atık suları kanalizasyon sularına karıştığında, yağmur suları, drenaj suları, sulama suları ile su kaynaklarına ulaşır ve akuatik canlıları tehdit ederler. Pestisitlerin yumuşakçalar, kabuklular ve su bitkileri gibi su canlılarına zararları bilinmekle beraber balıklarda meydana getirdikleri olumsuzluklar ekonomik açıdan daha fazla önemsenmektedir. Suyun pH'ı, sertliği, sıcaklığı ve balığın cinsi pestisitlerin verdiği zararın derecesini etkilemektedir. Pestisitlere maruz kalan balık solungaçları deforme olur ve solunum bozuklukları oluşur. Bunun yanı sıra kardiyovasküler sistemde de taşikardiye (kalp atışının hızlanması) ve bradikardiye (kalp atımının yavaşlaması) neden olur. Pestisitlere maruz kalan balıkların davranışlarında beslenme ve predasyon gibi davranışlarında meydana gelen değişim balıkların sağlığını kaybetmesine ve sinir sisteminde bozukluğa sebebiyet vermektedir. Pestisitlere maruz kalan balıkların solungaç, böbrek, karaciğer ve kas dokusunda histopatolojik değişimlere görülmektedir. Özellikle karaciğer ve böbrekte sulanma, iltihaplanma ve apoptozise sebep olmaktadır. Pestisitler balıkların üreme evrelerine farklı şekillerde etki etmektedir. Başarılı bir döllenmenin gerçekleşmesi için suyun çözünmüş oksijen miktarı (DO), su sıcaklığı gibi fiziksel özelliklerinin uygun ve besince zengin

olması gerekir. Pestisitler suyun fiziksel özelliklerini değiştirebilmekte ve üreme üzerinde dolaylı yoldan etkili olabilmektedir. Balıkların üreme göçleri anadrom, katadrom, oceanodrom ve limnadrom olmak üzere 4 farklı şekildedir. Balıklar pestisit kirlenmesine maruz kaldıklarında üreme için gerekli göçleri yapmayabilmektedirler. Pestisitlere maruz kalan balıklarda yumurta oluşumu yeterli sayıda gerçekleşmez. Dolayısıyla döllenme şansı azalır. PCB (poliklorobifenil), sazangillerde yumurta koymayı geciktirmektedir. Bazı kimyasallar ve pestisitler yumurtaların açılmasını geciktirirler, bazıları ise kuluçka süresini kısaltmaktadırlar. Kuluçka süresinin kısa olması, larvaların normalden küçük olmasına sebebiyet vermektedir. Normal şartlarda su ile temasa geçen spermiler hareketlilik kazanırken pestisit kirlenmesine maruz kalan sularda spermdeki bu hareketlilik gerçekleşmemektedir (Oğuzhan ve Atamanalp 2008).

1.2. Ekolojik veya çevresel risk değerlendirmesi (ERA)

Ekolojik veya çevresel risk değerlendirmesi (Ecological or environmental risk assessment-ERA) ekosistemler ve bunların bileşenleri üzerinde kirleticiler ve diğer antropojenik faaliyetlerin muhtemel veya gerçek yan etkilerini bilimsel metodoloji'yi kullanarak kesinlik derecesinde değerlendirme prosedürü olarak tanımlanmaktadır (Depledge ve Fossi 1994). Çevre bilimcileri insanlara zararlı olmayan fakat doğal kaynaklar üzerinde zararlı etkileri olabilen kimyasalları keşfettiklerinden bu yana ERA giderek daha fazla önemli hale gelmiştir (Bascietto ve ark. 1990).

Risk değerlendirmesi, kirlilikten etkilenmenin olasılığını ve büyüklüğünü değerlendiren bilimsel işlemi (risk analizi) ile alternatif risklerin belirlenmesi ve kabul edilebilir risklerin belirlenmesi işlemi (risk yönetimi) iyi bir şekilde ayırt eder (Oost ve ark 2003).

Toplam risk değerlendirme işlemi tehlikenin tanımlanması (Hazard identification), etkilenmenin değerlendirilmesi (Effect assessment), maruz kalmanın değerlendirilmesi (Exposure assessment), riskin karakterizasyonu (Risk characterization), riskin sınıflandırılması (Risk classification), risk-fayda analizi (Risk-benefit analysis), risk

azaltımı (Risk reduction) ve izleme (Monitoring) olmak üzere sekiz basamaklıdır (Van Leeuwen ve Hermens 1995).

1.3. Çevresel Kirlenmeyi İzleme Metotları

Ekosistemlerin çevresel kalite sınıflandırmasını yapmak üzere biyolojik organizmalar için kirlenici risklerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere aşağıda verilen beş farklı çevresel izleme metodu (Environmental Monitoring) kullanılabilmektedir (Oost ve ark 2003):

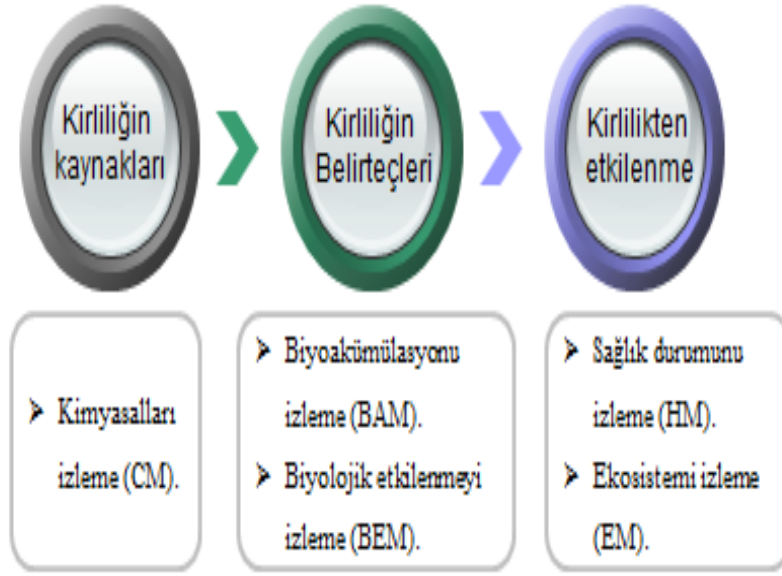
Kimyasalları izleme (Chemical monitoring-CM): Abiyotik kısımlarda kimyasal seviyelerinin ölçümü ile kirlilik değerlendirilmesi.

Biyoakümülasyonu izleme (Bioaccumulation monitoring-BAM): Biota'da kirlilik seviyesini ölçerek ya da kritik bölgenin kritik doz seviyesi belirlenerek kirliliğin değerlendirilmesi. (Bioaccumulation)

Biyolojik etkilenmeyi izleme (Biological effect monitoring-BEM): Geri dönüşümlü olan erken olumsuz değişimler belirlenerek (Biyobelirteçler-Biomarkers) maruz kalınan etkilenmenin değerlendirilmesi.

Sağlık durumunu izleme (Health monitoring-HM): Organizmalardaki geri dönüşümsüz hastalık ya da doku hasarlarının belirlenerek etkilenmenin değerlendirilmesi. (Biyobelirteç organizmalar-Bioindicators)

Ekosistemi izleme (Ecosystem monitoring-EM): Tür kompozisyonu, yoğunluğu ve dağılımı gibi keşifler yapılarak ekosistemin tamamının değerlendirilmesi.



Şekil 1.3. Çevresel kirliliğin izlenmesinde kullanılan metotlar (Oost ve ark 2003)

Sonuç olarak sulu ortamlarda meydana gelen kirlenme yukarıda ifade edilen beş çevresel izleme metotlarından üç tanesi biyokimyasal analizlerde kullanılmakta ve çalışılmaktadır. Bunlar BAM, BEM ve HM'dir (Şekil 1.3.). Bu analizlerde sırasıyla biyoakümülyasyon, biyobelirteçler ve biyobelirteç türler çalışılmaktadır. Bunun yanısıra çevresel kirliliğin daha iyi bir şekilde izlenmesi için kimyasalları izleme (CM) ve ekosistemi izleme (EM)'de önemlidir (Oost ve ark 2003).

1.4. Biyoakümülyasyona Bağlı Belirteçler

Biyoakümülyasyon genellikle 'bir kimyasalın canlı bir organizma tarafından yaşadığı ortamdan beslenme ile alması ve vücudunda birikmesi' şeklinde tanımlanmaktadır (FOCS 2013). Biyoakümülyasyon aynı zamanda 'bir kimyasalın zamanla bir organizmanın vücudunda toksik seviyelere ulaşması' şeklinde de tanımlanmaktadır (Ezemonye ve Enuneku 2012).

Biyoakümülyasyon, bir başka açıdan bakıldığında canlıların vitaminler, faydalı iz elementler, yağlar, ve amino asitleri depolayarak yaşamsal faaliyetlerinin devamı için gerekli temel bir işlemdir. Biyoakümülyasyon toksik maddenin cinsi, ulaşılan derişim, organizmada yayılım oranı, metabolize edilme oranı ve vücuttan atılma oranına bağılı olarak zararlı etkiler gösterebilir (FOCS 2013).

Çevreye kirlilik oluşturan maddelerin emisyon biçimleri; toprak, su, hava, sediment ve biota gibi çevresel ve fizikokimyasal unsurlar bu maddelerin dağılım ve konsantrasyonlarını belirlemektedir (ECETOC 1993). Oost ve ark (2003) çevresel kirlilik oluşturan maddelerin toprak, su, hava, sediment ve biota gibi çevresel unsurlarda dağılımını ifade eden fizikokimyasal parametreleri sınıflandırarak biyoakümülyasyona bağılı belirteçler (bioaccumulation markers) şeklinde tanımlamıştır.

- a) **Biyoakümülyasyon:** Bir kimyasal maddenin konsantrasyonunun biota’da zamana bağılı değişimini ifade eder.
- b) **Biyokonsantrasyon:** Biyokonsantrasyon faktörü (BCF-bioconcentration factor) kimyasal maddenin organizmadaki konsantrasyonu ile sudaki konsantrasyonu arasındaki oranı ifade eder.
- c) **Biyo-artış:** Biyo-artış faktörü (BMF-Biomagnification factor) bir gıdadan bir kimyasalın gıdanın alınmasından ve bağırsaklardan atılmasına kadar geçen süreçte emilim oranını ifade eder.
- d) **Biyoyararlanım:** Biyoyararlanım (Bioavailability) kimyasal maddenin çoğunluğunun bulunduğu toprak/sediment ve sudan bir canlının hayatı boyunca sindirim sistemi hariç diğer dokularına alabileceğı oranı ifade eder.
- e) **Biyo-dönüşüm:** Biyo-dönüşüm (Biotransformation) işlemi vücuttaki kimyasal maddenin orijinal hali ile değil de genellikle karaciğer tarafından hidrofilik hale dönüştürülerek atılması işlemini ifade eder. Biyodönüşüm işlemi bir kimyasal

maddenin aktifliğini, aktiflik süresini ve vücutta yarılanma süresini belirlemede önemlidir.

f) Biyoakümülyasyon modelleri: Kimyasal maddelerin hücrelere aktif taşınma özelliği veya hücre membranından diffüzyon özelliklerinin farklı oluşu, organizmaların metabolizma hızındaki farklılıklar ve metabolitlerin biyoakümülyasyon özelliklerinin farklılığı, organların veya dokuların akümülyasyon özelliklerinin spesifik oluşu vb. sebeplerden dolayı farklı kimyasal maddelere ve farklı canlı türlerine özel fizikokimyasal denklemler ile ifade edilen birçok farklı biyoakümülyasyon modeli bilim adamları tarafından önerilmiş ya da geliştirilmiştir.

g) SPMD'ler ile biyoakümülyasyon değerlendirme: SPMD'ler kapiler polimer bir tüp içinde yağla kaplı (genellikle triolein) ince film şeklinde tanımlanabilir. SPMD'ler içinde sadece çözünebilir ya da biyoyararlılık gösteren organik kirleticiler polimerik film tabakasından (genellikle polietilen) diffüzyon yolu ile geçebilmektedir (EPA 2000). Apolar yani hidrofobik kirletici içeren su, sediment, toprak ya da hava ortamından numune alınmasında kullanılmaktadır. SPMD'ler ile yapılan çalışmalar ERA çalışmalarında farklı yaklaşımlara imkan sağlamaktadır (Oost ve ark 2003).

1.5. Biyobelirteçler

Kirletici faktörlerin biyolojik etkilerinin kirliliğin kendisine göre daha önemli oluşu 1970'li yılların başında dile getirilmeye başlanmıştır (Addison 1996). Bu düşünce sonucunda 'biyobelirteç' (biomarker) terimi ortaya çıkmıştır. Biyolojik sistemlerde değişikliklere neden olan ksenobiyotiklere karşı hücre, doku veya organlarda oluşan hücresel, biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik değişiklikleri kapsayan biyolojik yanıtlar biyobelirteç olarak adlandırılabilir (Bekmezci 2010).

Geri dönüşümlü olumsuz değişimlerin erken tespit edilerek sulu ortamlarda kirliliğin güvenli bir şekilde çalışılması BEM için çoğu zaman önemlidir (Oost ve ark 2003). Biyobelirteçler, toksik maddelerin miktarına bağlı olarak vücut sıvısında, hücrelerde

veya dokularda meydana gelen biyokimyasal değişimlerin ölçümleridir (NRC 1987). Suda yaşayan canlılarda moleküler ve hücreyel biyobelirteçler çevresel kirliliklerin canlılarda geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açmadan önce erken uyarı amaçlı olarak son zamanlarda yaygın olarak gitgide artan bir şekilde kullanılmaktadır (Huggett ve ark. 1992). Biyobelirteç terimi sub-organizmal değişimler için sınırlandırıldığından organizmal ve daha yüksek düzeylerdeki yanıtlardan daha önce gerçekleşerek erken uyarı sağlamaktadır (Bekmezci 2010).

NRC (1987) ve WHO (1993)'e göre biyobelirteçler üç sınıfa ayrılmaktadır;

- a. Maruz kalınan kirliliğin etkilerinin organizmadaki bir molekül ya da hedef hücrede yapılan ksenobiyotik ile ilişkili bir ürünün ölçümleri ile tespit edilmesi.
- b. Bir hastalık ya da sağlık bozukluğu ile ilişkili olduğu bilinen organizmadaki doku ya da vücut sıvısında ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik ve diğer değişimlerin ölçülmesi.
- c. Belirli bir ksenobiyotik maddeye maruz kalan bir organizmanın genetik faktörlerini ve reseptörlerini de kapsayan değişimler ile verdiği tepkinin gösterilerek duyarlılığının ölçülmesi.

Bir biyobelirtecin güçlü ya da zayıf olduğunu değerlendirmek için önemli olduğu düşünülen altı kriter, Oost ve ark (2003) tarafından değerlendirilmiştir. Bu kriterler aşağıda verilmiştir.

- ✓ Ucuz ve uygulaması kolay olmalı.
- ✓ Erken uyarı parametresi olarak kullanılması için maruz kalınan kirliliğe duyarlı olmalı.
- ✓ Doğal değişkenlik ile kirliliğe bağlı değişkenliği ayırt edebilmek için biyobelirteç'in temel verisinin iyi açıklanmış olması gerekir.
- ✓ Kirlletici faktörün biyobelirtecin yanıtına olan etkisinin ispatlanması gerekir.
- ✓ Biyobelirtecin yanıtı ile maruz kalınan kirlilik arasındaki ilişkinin mekanizmasının iyi bir şekilde saptanmış olması gerekir.

- ✓ Biyobelirtecın yanıtının organizmaya uzun dönemde etkisi vb. toksik etkilerinin iyi bir şekilde saptanmış olması gerekir.

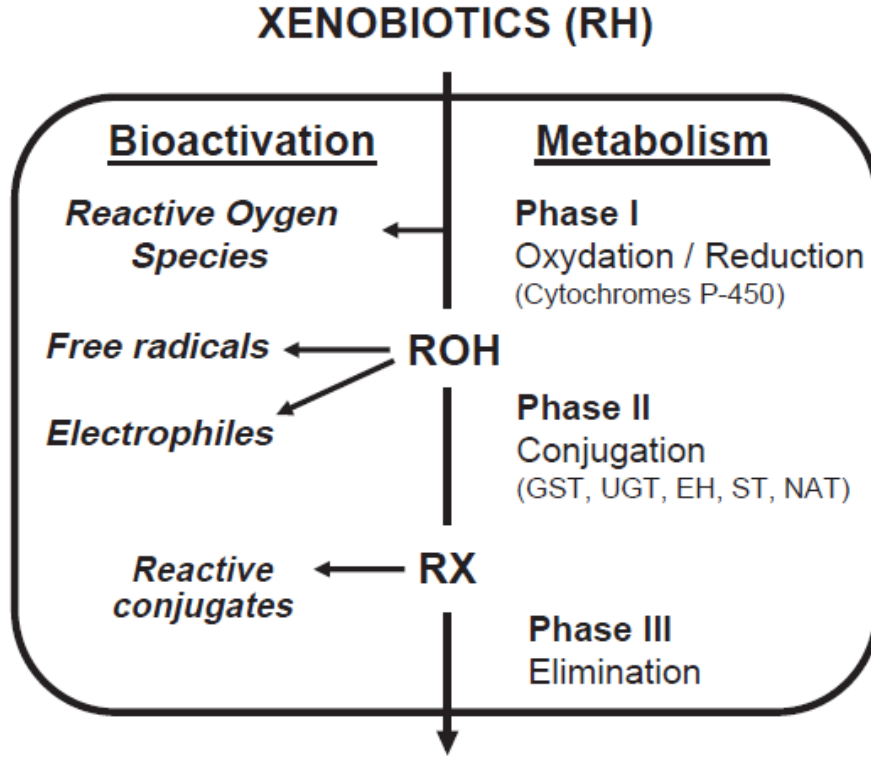
Biyodönüşüm işlemi vücuttaki kimyasal ksenobiyotik maddelerin orijinal hali ile değil de genellikle karaciğer tarafından salgılanan enzimler tarafından katalize edilerek hidrofilik hale dönüştürülerek yani suda çözünür hale getirilerek daha kolay bir şekilde atılması işlemini ifade eder (Vermeulen 1996, Lech ve Vodcnik 1985).

Biyodönüşüm genellikle enzimatik bir reaksiyon ile gerçekleşen bir metabolik işlem sonucu kimyasal bileşiklerin dönüşümünü ifade eder. Burada kimyasal bileşikler şeklinde ifade edilen maddeler vücuttaki metabolik olaylar sonucunda açığa çıkıyor ise endojen bileşikler, ya da dışarıdan vücuda giriyor ise ekzojen bileşikler şeklinde adlandırılır. Vücuda yabancı olan ekzojen bileşikler “ksenobiyotikler” şeklinde adlandırılır. Biyodönüşüm vücudun herhangi bir hücresinde gerçekleşebilir ama daha çok karaciğerde gerçekleşir. Bunun nedeni karaciğerin büyük bir organ olmasının yanı sıra biyodönüşüm enzimlerinin karaciğer hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunmasıdır (Donohue 2014).

Biyodeğişim enzimleri karaciğer hepatositlerinin granülsüz endoplazmik retikulum ve sitozolü içinde bulunmakta; mitokondri, çekirdek ve lizozom membranlarının içinde ise daha az miktarda bulunmaktadır. Karaciğerden sonra biyodönüşüm enzimleri en fazla böbrek ve akciğerde karaciğerin % 10-30 oranında bulunur. Deri, burun mukozası ve bağırsak mukozasında da biyodönüşüm enzimleri az miktarda bulunmaktadır (Donohue 2014).

Hepatik biyodönüşüm yüksek enerjiye dayalı sürekli olarak devam eden bir enzimatik işlemdir. Hepatik biyodönüşümde gerekli çok yüksek enerji hücresel enerjidir ve bu yüksek enerji ihtiyacı çok fazla çeşitlilikte enzim çeşitliliği gerektirmektedir (Donohue 2014). Bu enzimler Faz-I, Faz-II ve Faz-III enzimleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Burada bahsi geçen Faz-III enzimleri biyodönüşüm işlemini değil sadece biyodönüşüm sonucu oluşan atıkların enzime dayalı hücre dışına atılmasını katalize etmektedir. Sonuç olarak

biyodönüşüm enzimleri Faz-I ve Faz-II enzimleri şeklinde sınıflandırılabilir (Castell ve ark 2005).



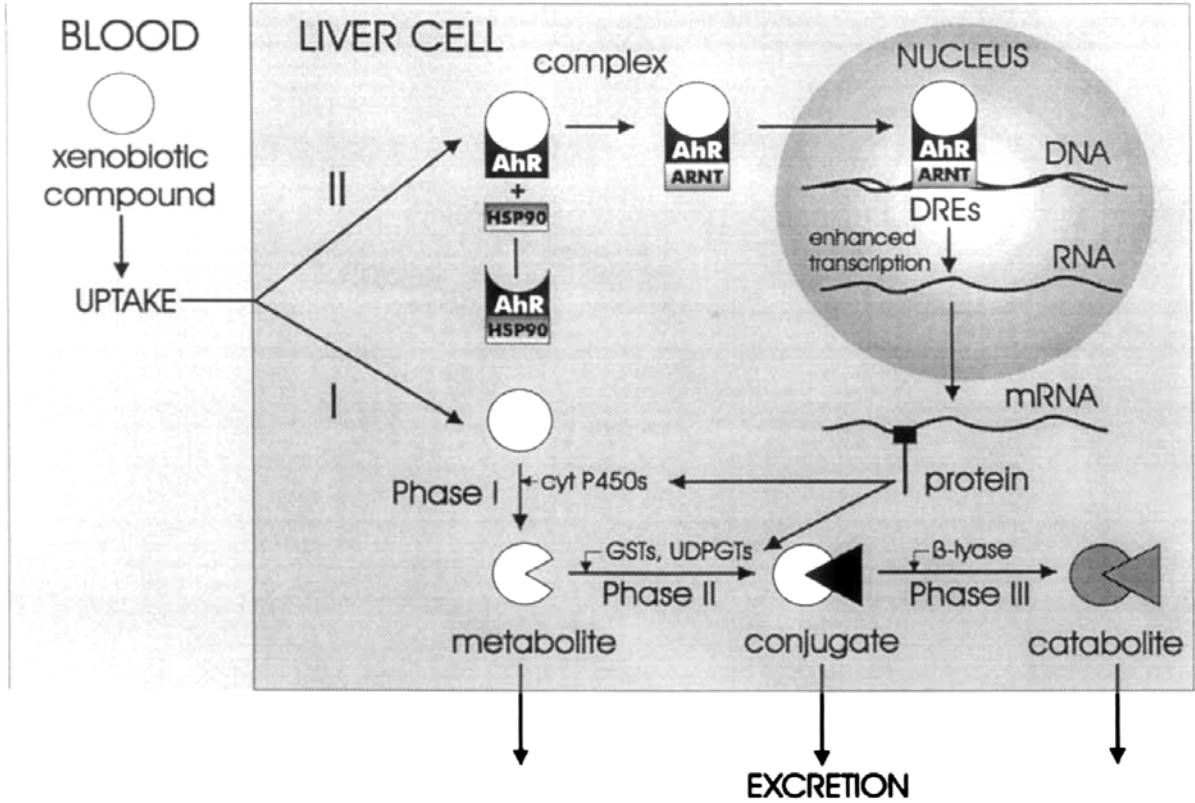
Şekil 1.5. Ksenobiyotiklerin biyodönüşüm metabolizması. Faz-I kısmen hidrofil fakat daha reaktif metabolit oluştururken; Faz-II suda daha çok çözünen ama daha az reaktif metabolit oluşturur. GST: Glutasyon-S-Transferaz; UGT: UDP-Glucuroniltransferaz; EH: Epoksit hidrolaz; ST: Sülfotransferaz; NAT: N-Asetiltransferaz (Castell ve ark 2005).

1.6. Balıklarda Biyobelirteçler

Oost ve ark. (2003) balıklarda ERA prosesinde kullanılabilecek biyobelirteçleri aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır.

a) Biyodönüşüm enzimleri: Balıklarda maruz kalınan ksenobiyotiğe bağlı olarak biyodönüşüm enzimleri uyarılmakta ya da inhibe edilmektedir (Bucheli ve Fent 1995).

Burada uyarmaktan kastedilen enzimin miktarının artması ya da aktive olması ya da her ikisidir. Biyodönüşüm enzimlerinin büyük çoğunluğu Faz-I ve Faz-II enzimleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ksenobiyotiklerin biyodönüşümü Faz-I,II ve III olmak üzere üç farklı aşamada incelenir. Ksenobiyotik Faz-I'de oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz ile Faz-2'de konjuge olabilecek hale gelir. Faz-III ile de ksenobiyotik katabolize olur (Commandeur ve ark 1995).



Şekil 1.6. Karaciğer hücresinde ksenobiyotik bileşiklerin biyodönüşümünün basitleştirilmiş gösterimi. I nolu yol toksik etkinin ya da detoksifikasyonun olası mekanizması, II. nolu yol ise enzim uyarılmasının olası mekanizması. AhR, Aril hidrokarbon reseptörü; HSP90, 90 kDa ısı şok proteini; ARNT, Aril Hidrokarbon reseptörü nükleer yerdeğiştirici; DREs, Dioksine duyarlı elementler; cyt P450s, sitokrom p450 izoenzimleri; GSTs, glutatyon S-transferazlar; UDPGTs, UDP glukuronil transferazlar (Oost ve ark 2003).

b) Oksidatif stres parametreleri: Bazı kirletici faktörlerin toksik etkisi hücrelerde enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA'nın zarar görmesi ve apoptozis gibi sonuçlar doğuran oksidatif strese sebep olmaktadır. Antioksidan savunma sistemi

glutasyon, β -karoten, vitamin A,C,E ve bir dizi antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan bileşikler içermekte ve radikal bileşikler (ROS) uzaklaştırmaktadır. Antioksidan enzim ve antioksidan bileşiklerin konsantrasyonunun ölçümü suda yaşayan canlılarda potansiyel kirlenmenin bir biyobelirteci olabilmektedir (Boyuneğmez 2002).

c) Biyodönüşüm ürünleri: Vücut sıvısındaki metabolitler veya bu metabolitler ile hücredeki DNA, RNA, proteinler gibi makromoleküller arasında oluşan kovalent katılma ürünleri gibi biyodönüşüm ürünlerinin miktarındaki artış bir başka biyobelirteç çeşididir (Melancon ve ark 1992). PAH'nin Faz-I enzimleri tarafından katalize edilmesiyle oluşan fenoller, dihidrodioller, kuinonlar ve epoksitler biyodönüşüm ürünleridir (Lech ve Vodick 1985).

d) Stres proteinleri, metalotiyoneinler (MT) ve multi ksenobiyotik direnci (MXR): Hücre stres gibi zararlı koşullara karşı hücrenin korunması ve tamiri ile ilgili bir dizi uyarılabilir stres proteinini (ısı-şok proteinleri de denir-HSP/heat-shock proteins) bol miktarda ihtiva eder (Sanders 1993). Ağır metaller ve esansiyel metaller tarafından uyarılabilen metalotiyoneinler ve multi ksenobiyotik direnci mekanizmasındaki birçok kimyasal tarafından inhibe edilebilen ya da uyarılabilen P-glikoproteinleri bu grupta yer alır (Stegeman ve ark 1992; Bard 2000).

e) Hematolojik parametreler: Transaminler gibi belirli enzimlerin kana sızması bu organlarda hücrel membranın bozulduğunun belirtisi olabilir. Aynı zamanda kandaki hematokrit, hemoglobin, protein ve glikoz seviyeleri belirli çeşit kirlenmelere karşı daha duyarlı olabilir (Moss ve ark 1986).

f) İmmünolojik parametreler: Balıklarda beyaz kan hücresi (lökosit) ve lenfosit sayısındaki değişim, lizozomal aktivite veya vücut sıvısındaki akut faz protein seviyesi gibi spesifik olmayan savunma faktörleri, lökosit üreten organların ağırlığı ve morfolojisi vb. kirlilikten etkilenebilir (Weeks ve ark 1992).

g) Üreme ve endokrin parametreleri: Pestisitler balıklarda testosteron, steroidogenesis, gonadotropin hormonları üzerinde etkili olabilmektedir. Bazen bu hormonların

salgılanmasını azaltarak üremeyi engellemekte bazen de salgılanmasını tetikleyerek üreme dönemini değiştirebilir (Oğuzhan ve Atamanalp 2008).

h) Nöromusküler parametreler: Nöral fonksiyonlar ile ilgili çalışmalarda kolinesteraz (CHE) enzimleri incelenmektedir. Bunlar asetilkolin'e yüksek derecede ilgisi olan (ACHE) ve bütirilkolin'e karşı ilgisi olan (BCHE) olmak üzere iki farklı kolinesteraz enzim (CHE) çeşidi bilinmektedir. Balık beyinleri ACHE içermekte fakat BCHE içermemektedir. Kas dokusu ise hem ACHE hem de BCHE içermektedir (Walker ve Thompson 1991). Duyu ve nöromusküler sistemin fonksiyonlarında hayati öneme sahip olan ACHE sinir uçlarında asetilkolin'in deaktivasyonunda, sürekli sinir ateşinin önlenmesinde gereklidir (Murphy 1986).

i) Genotoksik parametreler: Organizmanın genotoksik kimyasallara maruz kalması ile oluşan genetik hasar sonucunda, DNA'da yapısal değişimler, DNA'da hasar oluşmasına bağlı mutant gen ürünleri ve kanser gibi hastalıklar meydana gelmektedir (Shugart ve ark 1992).

j) Fizyolojik ve Morfolojik Parametreler: Zararlı etkilenmeler histopatolojik olarak, balık dokularında lezyonların tespiti, histopatolojik değişimler ve tümör oluşumunun izlenmesi ile gerçekleştirilebilir (Oost ve ark 2003).

1.7. Faz-I Enzimleri

Faz-I enzimatik reaksiyonları hidroliz, indirgenme, hidrasyon (kompleks bir moleküle suyun katılması), hidroksilasyon (-OH grubunun karbon atomlarına bağlanması), dehalojenasyon, dealkilasyon ve oksidasyonu içerirler. Bu reaksiyonlar daha çok oksidasyon ile hidroksil (-OH), amin (-NH₂), sülfidril (-SH), aldehit (-COH) veya karboksil (-COOH) gruplarını açığa çıkararak ya da oluşturarak toksik bileşiği hem Faz-II reaksiyonları esnasındaki konjugasyona hazır hale getirir hem de toksik bileşiğin

hidrofilik özelliğinde artışa sebep olurlar (Parkinson 2001; Kleinschmidt ve Delaney 2011).

Çoğu ksenobiyotiklerin Faz-I reaksiyonları sitokrom p450, sitokrom b5, NADPH sitokrom p450 redüktaz vb. karma-fonksiyonlu oksidaz (MFO-mixed-function oxidase) sistemi olarak da bilinen mikrozomal monooksijenaz (MO) enzimleri tarafından katalize edilmektedir. Fakat balıklarda Faz-I'e dayalı oksidatif biyodönüşümlerin çoğu sitokrom p450'ye bağımlı monooksijenaz'lar tarafından katalize edilmektedir. Sitokrom p450 proteinleri daha çok karaciğer endoplazmik retikulumu membranına bağlı olan ve sürekli genişleyen büyük bir hem-protein ailesidir (Stegeman ve ark 1992; Bucheli ve Fent 1995).

Organik kirliliğe maruz kalmış farklı balık türlerinde yapılan çalışmalarda total sitokrom p450 seviyesinde artış görülmüştür. Özellikle PAH, PCB ve PCDF kirliliği total sitokrom p450 seviyesinde önemli bir artışa sebep olurken PCDD kirliliği 5 kata varan çok yüksek bir artışa sebep olmuştur. Sadece organotin (kalay bağlı hidrokarbonlar) bileşiklerine maruz kalmış yayın balığı (bullhead), yılan balığı (eel) ve alabalık (rainbow trout)'larda total sitokrom p450 seviyelerinde önemli oranda düşüş görülmüştür (Oost ve ark 2003).

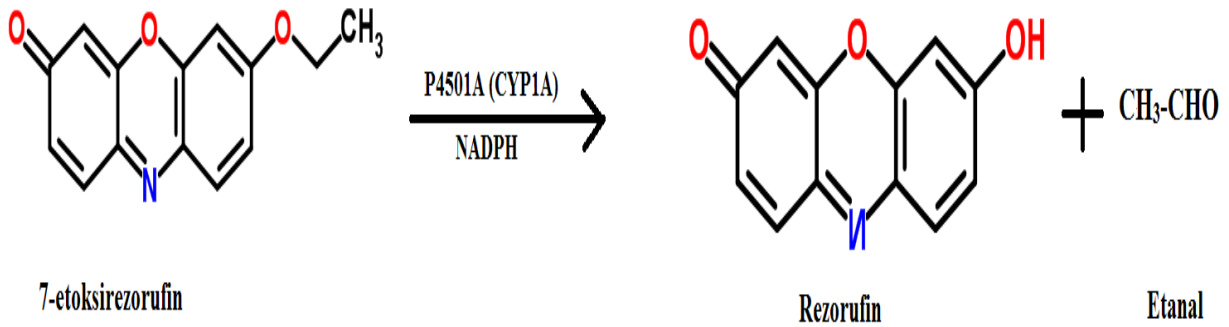
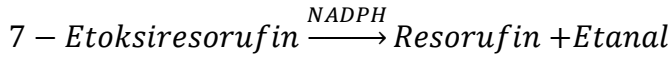
İzoenzimler eğer benzerlikleri % 40'dan daha az ise farklı bir sınıfta sınıflandırılmakta, benzerlikleri % 40-75 arasında ise alt-sınıflarda sınıflandırılmaktadır (Bock ve ark 1990). Izoenzim olan p4501A1 (CYP1A1) ve p4501A2 (CYP1A2) enzimleri 'CYP1A' alt-sınıfında yer almaktadırlar (Stegeman 1989). Organik madde kirliliğine maruz kalmış balık türleri ile ilgili yapılan bir çok çalışma hepatik p4501A1 seviyesinde artış olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmalar PAH, PCB, PCDD ve PCDF bileşiklerinin balıklarda p4501A1 miktarında bazen 5 kata varan oranlarda artış olduğunu göstermiştir (Oost ve ark 2003).

Bütün balık türlerinde p4501A1 protein değerleri PAH ve HAH kirliliğine karşı ERA proseslerinde uygulanabilir, çok duyarlı bir biyobelirteç olarak görünmekte ve hızlı metabolize olan maddelere direk maruz kalan solungaç ve bağırsak gibi dokularda tercihen öncelikli olarak analizi yapılmalıdır (Levine ve Oris 1999).

Kirliliğe maruz kalmış canlılarda p4501A1 aktivitesi ile ilgili olarak ilk önerilen biyobelirteç aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) aktivitesidir. (Payne 1976) Etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi sitokrom p450 sisteminin kirlenmelere karşı indüktif yanıtını belirlemede en duyarlı biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır (Goksöyr ve Förlin 1992).

1.7.1. Etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi

Kirliliğe maruz kalmış organizmalarda P4501A (CYP1A) aktivitesi EROD aktivite ölçümü çevresel izleme programlarında ve alan çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Eggens ve ark 1992). Sitokrom P4501A (CYP1A) aktivitesi 7-etoksirezorufin'in NADPH varlığında dealkilasyonu sonucu rezorufin'e dönüşüm hızı ile florometrik olarak ölçülmektedir (Burke ve Mayer 1974).



Şekil 1.7.1 Etoksirezorufin'in NADPH varlığında dealkilasyonu sonucu rezorufin'e dönüşümü.

Balıklerde, karaciğer sitokrom P4501A1 ve buna bağımlı EROD aktivitesinin PAH, PCB ve dioksinlerle indüklenmesi bu tip organik kirleticilerin varlığının belirlenmesinde

erken uyarı sinyali görevi yaparak, “en duyarlı biyobelirteç” olarak kullanılabileceği iddia edilmektedir (Boyuneğmez 2002).

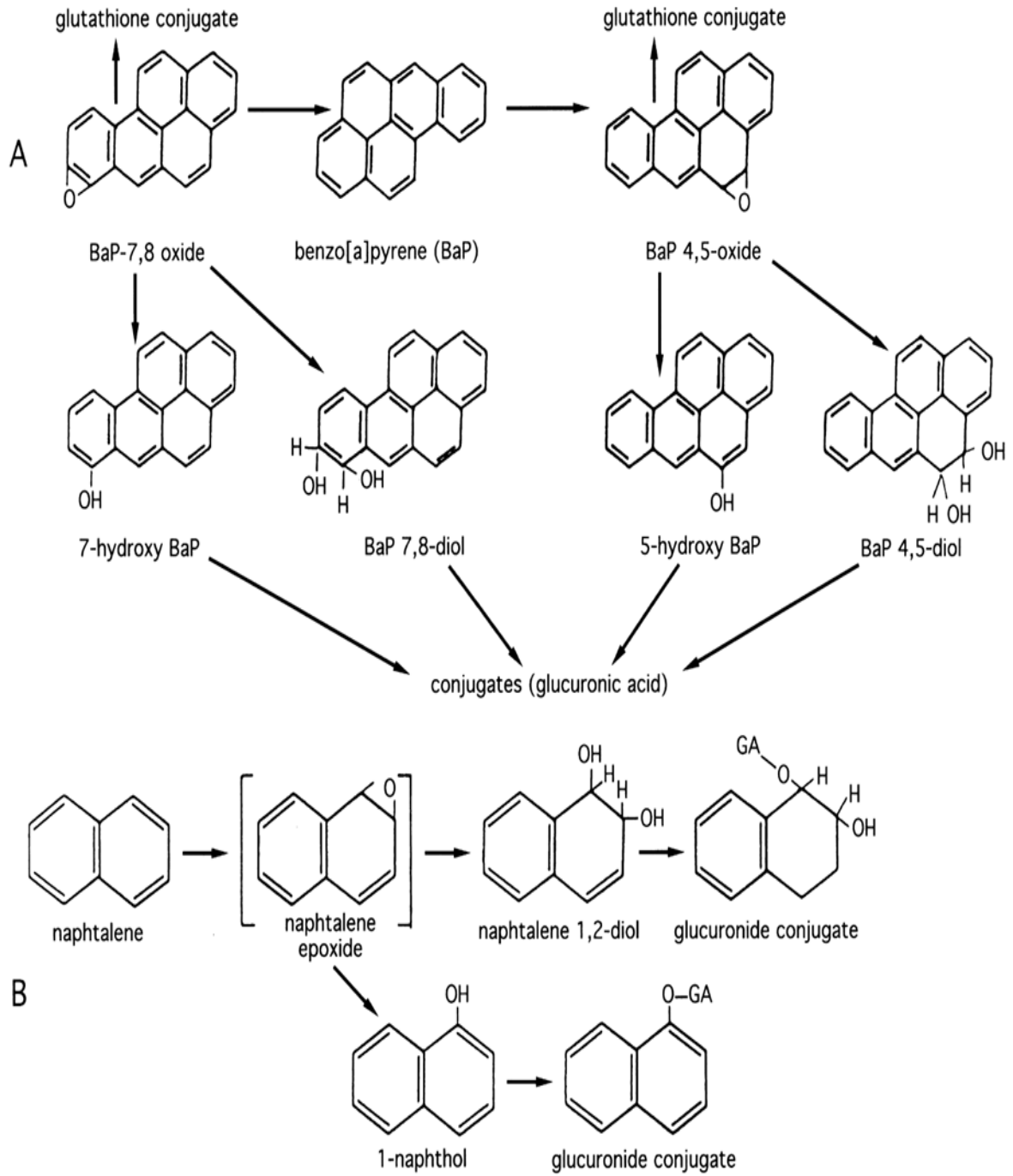
Genellikle P4501A (CYP1A) protein seviyesi ile EROD aktivitesi arasında iyi bir korelasyon görülmektedir. Çok sayıda alan çalışması göstermiştir ki çevresel kirlenmeye maruz kalmış balık türlerinde hepatik P4501A (CYP1A) protein seviyesinde güçlü bir artış meydana gelmektedir (Oost ve ark 2003).

1.8. Faz-II Enzimleri (Konjugasyon enzimleri)

Balıklarda Faz-II reaksiyonları ksenobiyotiklerin ve Faz-I metabolitlerinin suda çözünebilen, hidrofilik, daha az toksik konjuge bileşiklerini üretmek ve atılımını sağlamak üzere daha polar olan glukuronik asit, sülfat, glutatyon, şeker ve amino asit grupları gibi polar endojenlere katılma reaksiyonları şeklinde kovalent bağlanmalarını kapsamaktadır (Tuvikene 1995; Lech ve Vodcnik 1985). Bunu yapabilmek için Faz-II bir başka enzim çeşidi olan transferaz enzimleri üzerinden yürür. Transferaz enzimlerinin görevi belirli kimyasal grupların bir bileşikten diğerine transferini katalize etmektir. Hepatik biyotransformasyonda, transferaz enzimleri glukuronik asit, sülfat, glutatyon, şeker veya amino asit gibi kofaktörleri maruz kalınan ksenobiyotiğin Faz I ürününün fonksiyonel grubuna transfer eder ya da bağlar. Bu işlem konjugasyon şeklinde adlandırılır (Donohue 2014). Faz II enzimleri konjugasyon enzimleri olarak da adlandırılır (Tuvikene 1995).

Bazı ksenobiyotikler konjugatif Faz-II enzim sistemleri tarafından direkt metabolize olmaları için gerekli $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$ gibi işlevsel gruplara sahip iken, bazıları Faz-I enzimlerinin ön işlemini içeren bir sisteme entegre olarak metabolize edilmektedir (Oost ve ark 2003).

Elektrofilik bileşikler ve elektrofilik metabolitler çoğunlukla glutatyon (GSH) ile konjugasyon ürünleri oluştururken, nükleofilik bileşikler glukuronik asit (GA) ile konjugasyon ürünleri oluşturmaktadır. PAH metabolitleri için sülfatasyon, glukunorikasyon ile düşük konsantrasyonlarda beraber yürümektedir (George 1994).



Şekil 1.8. A-Benzo(a)pyrene'in; B-Naftalin'in transformasyon mekanizması (Tuvikene 1995).

Balıklarda en çok çalışılan iki önemli biyobelirteç glutatyon-S-transferaz (GST) ve üridin-5-difosfat-glukuronoziltransferaz (UDP-GT) enzimleridir. Her iki enzimde hepatik ve bazı ekstrahepatik dokularda önemli seviyelerde bulunur. Balıkların bağırsak ve

solungaçlar gibi ekstrahepatik dokularında yüksek UDP-GT aktivitesi bulunmuştur. GSH ksenobiyotiklerin metabolizmasında bazı elektrofilik bileşikler için konjugasyon substratı olarak gereklidir. Sitoplazmada bulunan GST varlığında GSH ile konjugasyon daha kolay gerçekleşir (Tuvikene 1995).

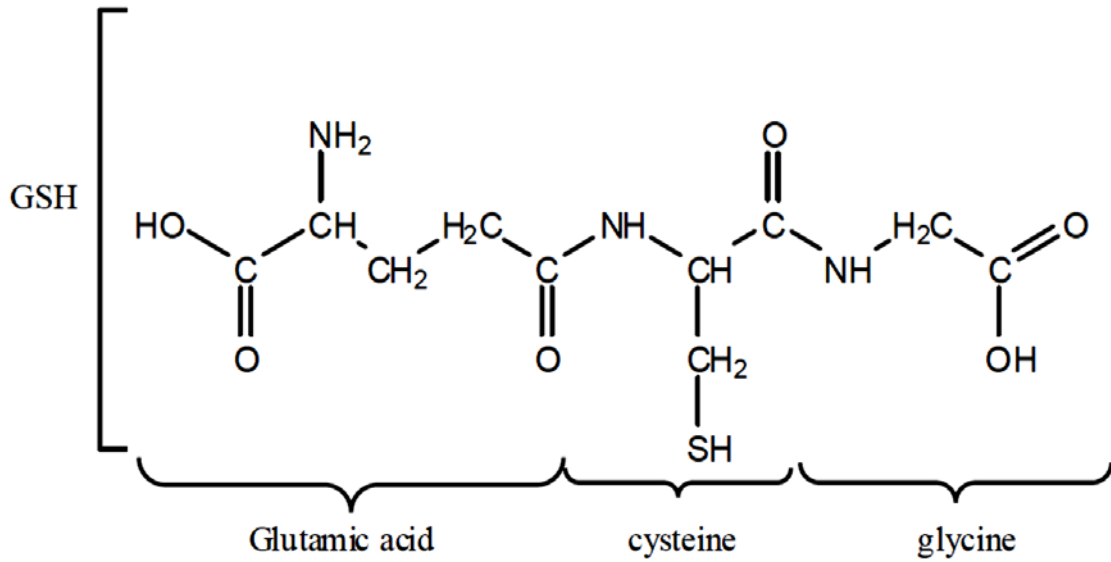
Bazı kirletici faktörlerin toksik etkisi hücrelerde enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA'nın zarar görmesi ve apoptozis gibi sonuçlar doğuran oksidatif stress'e sebep olmaktadır. Antioksidan savunma sistemi glutatyon, β -karoten, vitamin A,C,E ve bir dizi antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan bileşikler içermekte ve radikal bileşikler (ROS) uzaklaştırmaktadır. Antioksidan enzim ve antioksidan bileşiklerin konsantrasyonunun ölçümü suda yaşayan canlılarda potansiyel kirlenmenin bir biyobelirteci olabilmektedir (Boyuneğmez 2002).

1.8.1. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH ve GSSG)

Antioksidan GSH (γ -L-glutamyl-L-sisteinilglisin), ve ilişkili enzimleri hücrenin redoks dengesi için gerekli olan temel sisteme katkıda bulunurlar. GSH bir tripeptittir ve γ -glutamik asit (γ -glu), sistein (cys) ve glisin (gly)'den oluşur. GSH metabolizmasının bileşenleri ve fonksiyonları omurgalılar arasında benzer olmasına rağmen bazı dokularda ve türlerde spesifik farklılıklar gösterebilmektedir (Leggatt 1997; Çınar 2010).

Bir hücrede GSH üç temel fonksiyona sahiptir. Birinci olarak GSH, H_2O_2 ve lipid hidroperoksitleri GPx enzimleri ile indirgeyen önemli bir antioksidandır. Bu işlemde GSH yükseltgenir ve GSSG'ye (oxidized glutathione) dönüşür. Sağlıklı bir hücrede genellikle GSH'nin GSSG'ye oranı 10/1'den büyüktür. GSH'nin antioksidan kapasitesi, GSSG konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutan glutatyon redüktaz'ın (GR) GSSG'yi indirgeme kabiliyetine dayanır. Yüksek GSSG seviyesi (total GSH'nin %10-50'si) oksidatif stress göstergesi olarak kabul edilmektedir. GSH'nin ikinci hücre fonksiyonu ise glutatyon-S-transferaz enzimlerinin (GST) kofaktörü olarak görev almasıdır. GST enzimleri GSH'ı eksojen ksenobiyotiklerle veya endojen metabolitlerle konjuge hale getirerek toksik

maddelerin hücreden atılımını sağlar. GSH'nın hücrede üçüncü ve son işlevi ise proteinlerin –SH (sülfidril ya da tiyol) gruplarının indirgenmiş halde kalmasını sağlayarak protein yapısını korurlar ve enzim fonksiyonlarını devamını sağlarlar (Leggatt 1997; Çınar 2010; Stegeman ve ark 1992).



Şekil 1.8.1. Glutatyonun (GSH) kimyasal yapısı (Bae ve Mehra 1997).

Alabalıklarda (rainbow trout) GSH miktarının fazla olduğu dokularda PCB kirlenmesine bağlı EROD indüksiyonunun daha da şiddetlendiği, GSH miktarının az olduğu dokularda ise EROD indüksiyonunun daha az arttığı görülmüştür (Otto ve ark 1996). Ah reseptörü tarafından uyarılan CYP1A gen ekspresyonu ve katalitik aktivitesini dokudaki tiyol (-SH) durumunun ayarladığı ile ilgili güçlü bulgular bulunmuş, GSH seviyesi ile sitokrom p450 sistemi arasında bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (Oost ve ark 2003).

1.8.2. Glutatyon-S-Transferazlar (GST)

Glutatyon-S-transferazlar, elektrofilik bileşiklerin veya Faz-I metabolitlerinin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen, çoklu gene sahip, çok fonksiyonlu, suda çözünabilir, sitozolik, dimerik, Faz-II reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerden oluşan bir süper ailedir. Hücre içi taşıma, lökotrien ve prostaglandinlerin biyosentezi gibi temel görevlerinden farklı olarak oksidatif hasar ile DNA ve lipidlerin peroksidatif ürünlerine karşı savunmada kritik bir rolü vardır. Çözünabilir GST'ler bağlandıkları substrata çeşidi, immünolojik çapraz reaktivite ve protein dizilim datalarına göre a, m, p ve q olmak üzere dört gruba ayrılmışlardır (George 1994).

Yapılarında spesifik olmayan bir substrat bağlama bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenziminin bulunmasından dolayı karsinogenik bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçlar ve diğer birçok farklı bileşiğin konjugasyonunu katalizleyebilmektedirler (Cnubben ve ark 2001).

Total GST aktivitesini belirlemek üzere yapılan çalışmaların çoğu, GST'nin q sınıfı enzimleri dışında bütün izoformları ile konjuge olabilen, CDNB'yi (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) suni bir substrat olarak kullanmaktadırlar (Van der Aar ve ark 1996).

Bazı çalışmalarda PAH, PCB, OCP ve PCDD kirlenmesine maruz kalmış balıklarda GST aktivisinde artış görülmesine rağmen yapılan çoğu çalışmada önemli bir değişim gözlenmemiştir. PCDD, pestisit veya PAH kirlenmesine maruz kalmış gökkuşağı alabalığı, levrek, çipura ve güneş balığında GST aktivitesinde önemli miktarda azalma görülmüştür. Sonuç olarak kimyasal kirlenmeye maruz kalmış balıklarda GST aktivitesinde indüklenme farklı sonuçlar vermektedir (Oost ve ark 2003).

1.9. ACHE Aktivite İnhibisyonu (Nöromusküler Analiz)

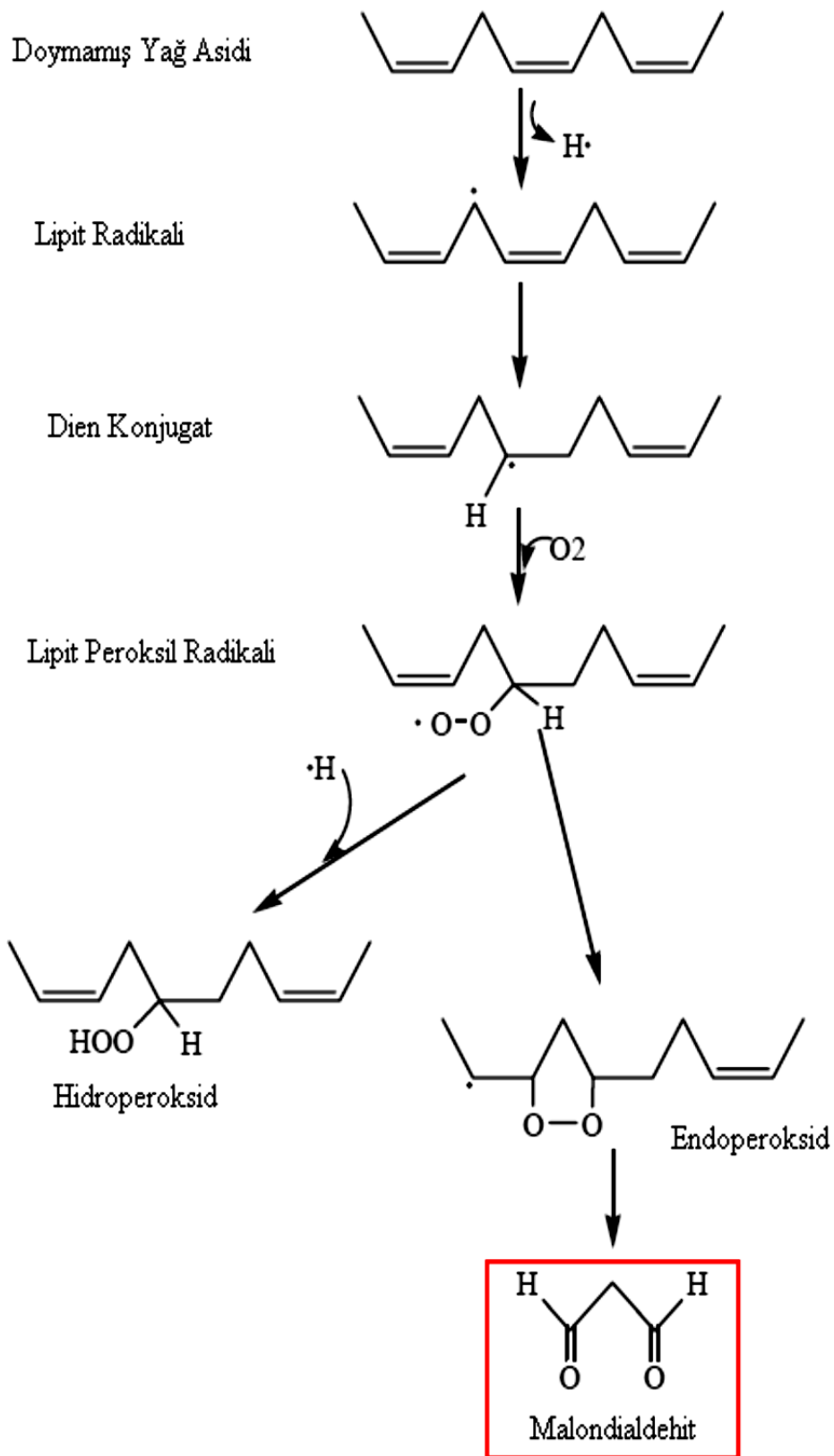
Nöral fonksiyonlar ile ilgili çalışmalarda kolinesteraz (CHE) enzimleri incelenmektedir. Bunlar asetilkolin'e yüksek derecede ilgisi olan (ACHE) ve bütirilkolin'e

karşı ilgisi olan (BCHE) iki farklı kolinesteraz enzim (CHE) çeşidi bilinmektedir. Balık beyinleri ACHE içermekte fakat BCHE içermemektedir. Kas dokusu ise hem ACHE hem de BCHE içermektedir (Walker ve Thompson, 1991). Duyu ve nöromusküler sistemin fonksiyonlarında hayati öneme sahip olan ACHE sinir uçlarında asetilkolin'in deaktivasyonunda, sürekli sinir ateşinin önlenmesinde gereklidir (Murphy 1986).

Balıklarda ve çift kabuklu yumuşakçalarda asetil kolinesteraz (ACHE) inhibisyonu tarımsal alanlarda pestisit kullanımı ile oluşan organofosfat ve karbamat bileşiklerine maruz kalan bu türlerde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Kolinerjik iletimde ACHE'nin rolü, sinirsel bağlantı noktalarında ACh'nin hidrolizi ile asetilkolinin (ACh) konsantrasyonunu azaltarak sinirsel iletimi regüle etmektir. Organofosfat ve karbamat esterleri ACHE'i inaktive ettiğinde sinirsel bağlantı noktalarında ACh konsantrasyonunun kirliliğe maruz kalmamış organizmalara göre yüksek olduğu görülmüştür (Kopecka ve ark 2004).

1.10. Lipid Peroksidasyonu ve MDA analizi

Radikallerin etkilerine karşı hassas olan poliansature yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Hücre membranında lipid serbest radikali ve lipid peroksit radikallerinin oluşumu hücre hasarının önemli bir göstergesidir (Delibaş ve Özcanakaya 1995). Lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar (Akpoyraz ve Durak 1995).



Şekil 1.10. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu (Kısaçam 2010).

Lipid peroksidasyonu başlama evresi, türeme evresi ve sonlanma evresi olmak üzere üç basamakta meydana gelir. Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal ($L^{\cdot}$) oluşur (başlangıç evresi). Oluşan radikal, moleküller oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini ($LOO^{\cdot}$) oluşturur (türeme evresi) ve lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak, çift bağların yeniden düzenlenmesinden sonra moleküler oksijen eklenerek lipid hidroperoksit ya da endoperoksit denilen radikal olmayan son ürünün oluşumu (sonlanma evresi) ile lipid peroksidasyonu sonlanır. Son aşamada oluşan lipid radikalleri yeni lipid hidroperoksit oluşumuna sebep olur ve olay zincirleme bir reaksiyon şeklinde kendini katalize eder. Orjinal yağ asidinde en az üç çift bağ varsa son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur (Fuji 1991; Akpoyraz ve Durak 1995).

1.11. Biyobelirteç türler

Biyobelirteç türler, özellikleriyle veya popülasyonlarıyla habitatlarındaki çevresel şartlar ile ilgili bilgi veren organizmalar şeklinde tanımlanmaktadır (Oost ve ark. 2003). Biyobelirteç türler organizmaların çeşitli stres koşullarına karşı gösterdikleri belirgin parametre değişiklikleri olan biyobelirteçleri, yüksek değerlerde dışa vuran belirleyici organizmalardır. Balıklar su kirliliğini belirlemede biyoindikatör türler olarak tercih edilmektedir (Fabacher ve Little 2000).

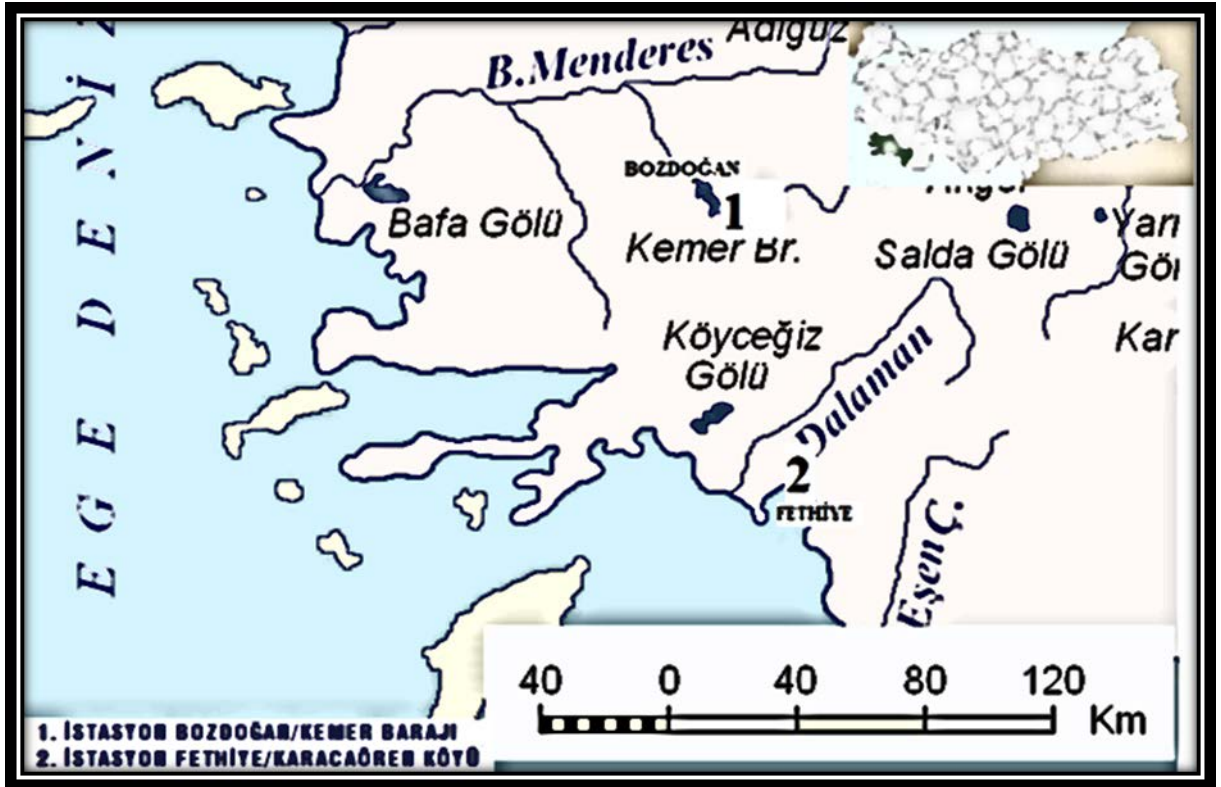
Balıklar kirliliğe maruz kaldıklarında oksidatif strese karşı memelilerle benzer toksikolojik ve adaptif yanıtlar vermektedirler (Kelly ve ark 1998). Ayrıca balıklar besin olarak tüketilmekte su kirliliğinin insanlara ulaşmasına yol açmaktadırlar. Bu yüzden balıklar biyobelirteç tür olarak kirlilik araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fabacher ve Little 2000).

Yapılan çalışmada beton havuzlarda ve baraj göletinde ağ kafeslerde yapılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kültür balıkçılığında fiziksel ve kimyasal su parametrelerinin, yetişme ortamlarının ve mevsimsel değişikliğin balıkların kas ve karaciğer dokularında GSH metabolizması, GST aktivitesi, lipid peroksidasyonu (MDA), EROD aktivitesi ve nörotoksisite biyobelirteci olan ACHE aktivitesi üzerine etkileri incelendi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Balık numunelerinin alınması

Numuneler Ocak 2012 ve Haziran 2012 olmak üzere iki farklı dönemde iki farklı istasyondan alındı. Birinci istasyon olarak Bozdoğan Akçay nehri üzerindeki baraj kültür balık çiftliği ve ikinci istasyon olarak ise Fethiye de bulunan kültür balık çiftliği seçildi. Balık ağırlıkları ortalama 300-400 g arasında olmasına dikkat edilerek iki farklı dönemde her istasyon ve dönem için 25'şer balık olmak üzere toplam 100 alabalık aynı gün içinde kas ve karaciğer dokularından numune alınmak üzere 0-4°C sıcaklığındaki buz banyosu içinde laboratuvara taşındı. Analizler yapılncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuya yerleştirildi.



Şekil 2.1. Gökkuşuğu alabalığı numunelerinin alındığı balık çiftlikleri.

2.2. Su numunelerinin alınması

Her istasyon ve dönem için yaklaşık 1,5 litre su numunesi, daha önce saf su ile yıkanmış pet şişelere, pet şişeler ağzı açık ve baş aşağı tutularak suya sokuldu ve şişe yüzeyden yaklaşık 50 cm derinlikte ters çevrilmek suretiyle, toplam dört adet su numunesi alınarak, 0-4°C sıcaklığındaki buz banyosu içinde laboratuvara taşındı ve ivedi bir şekilde analizi yapıldı.

2.3. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan aşağıdaki cihazlar kullanıldı;

1. -80°C'lik derin dondurucu (Nuaire),
2. -20°C'lik derin dondurucu (Bosch, Türkiye),
3. Santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye),
4. Homojenizatör (Yellow Line Ost Basic, Almanya),
5. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Avusturalya),
6. Vorteks (Velp,İtalya),
7. Manyetik karıştırıcı (Velp, İtalya),
8. Etüv (Memmert, Almanya),
9. Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
10. Otomatik pipetler (Isolab 2-20µl, Isoterm 20-200 µl, Brand 5-50µl, Isoterm 100-1000 µl), pH metre (pH 211, Hanna, Amerika)

Ayrıca Adnan Menderes Üniversitesi Merkez laboratuvarında bulunan aşağıdaki cihazlar kullanıldı;

11. Fluorometre (Fluoroskan Ascent FL Thermo lab systems)
12. Spektrofotometre (Multiskan Spectrum model no:1500 Thermo lab systems)
13. -86°C derin dondurucu (Nuaire Model No: 6617 W35)
14. Hassas terazi (Scaltec d=0,0001g, e=0,001g Model Sbc31)

15. Ultra santrifüj (Beeckman Coulter Optima –L-100XP)
16. Santrifüj (Eppendorf 5415R)

2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

K_2HPO_4 (Di potasyum monohidrojen fosfat)

KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat)

KCl (Potasyum klorür)

EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit)

DTT (Dithiothreitol)

Metanol

DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride)

$NaHCO_3$ (Sodyum bikarbonat)

Asetil Tiyokolin İyodür

GSH (Redükte glutatyon)

Metafosforik asit

NaCl (Sodyum klorür)

Na_2HPO_4 (Disodyum monohidrojen fosfat)

$C_6H_5Na_3O_7$ (Sodyum Sitrat)

% 30'luk HCl

TBA (Tiyobarbitürik asit)

TCA (Tri kloro asetik asit)

% 87 gliserol

BSA (Bovine Serum Albümin)

NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat)

DMSO

Etoksirezorufin

Rezorufin

2.5. Kullanılan Çözeltiler

2.5.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözelti

1,741g K_2HPO_4 ve 1,360 g KH_2PO_4 , 11,2g KCl 500 ml suda çözüldü. Bu çözeltiye 0,372 g EDTA, 0,154 g DTT, 0,0174 g PMSF eklendi, K_2HPO_4 ile pH 7.4'e ayarlandı. Çözelti 1000 ml'ye tamamlandı. (Fernandes ve ark. 2008)

PMSF suda çok az çözünür. Eklemeden önce az miktar etanol ya da metanol de çözülebilir.

2.5.2. ACHE tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

pH 8 0,1M tampon çözeltisi; 1,741g K_2HPO_4 ve 1,360 g KH_2PO_4 , 1000 ml suda çözüldü. Tampon kullanılacağı zaman K_2HPO_4 ile pH 8'e ayarlandı.

pH 7 0,1M tampon çözeltisi; 1,741g K_2HPO_4 ve 1,360 g KH_2PO_4 , 1000 ml suda çözüldü. Tampon kullanılacağı zaman katı K_2HPO_4 ile pH 7'ye ayarlandı.

0,01M DTNB çözeltisi; 39,6 mg DTNB 10 ml pH 7 (0,1M) fosfat tamponu içinde çözüldü. 15 mg sodyum bikarbonat eklendi.

0,075M asetil tiyokolin iyodür çözeltisi; 2,167g asetil tiyokolin iyodür 100 ml su içinde çözüldü (Ellman ve ark. 1961).

2.5.3. Glutasyon S Transferaz (GST) Aktivite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

0,1M pH 6,5 Potasyum Fosfat Tamponu; 1,741g K_2HPO_4 ve 1,360 g KH_2PO_4 , 1000 ml suda çözüldü. Tampon kullanılacağı zaman KH_2PO_4 ile pH 6,5'e ayarlandı. (Habig ve ark. 1974)

30 mM CDNB Çözeltisi; 1.550 g CDNB 250 ml etanolde hazırlandı.

26 mM GSH çözeltisi; 0,8 g GSH 100 ml suda çözülerek hazırlandı.

2.5.4. Glutasyon (GSH) Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Presipitasyon çözeltisi; Bir balonjoje içine 16,7 g Metafosforik asit, 2 g EDTA, 300 g NaCl ekledikten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Solusyonu; 0.3 M Na_2HPO_4 hazırlandı.

1 mM DTNB çözeltisi (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid); 39,64 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat içinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı (Beutler ve ark. 1963).

2.5.5. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Stok çözelti: 2,07 ml % 30'luk HCl, 0,37g TBA, 15 g TCA'dan alındı balon joje'ye eklendi ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Ohkawa ve ark 1979).

2.5.6. Mikrozomal Fraksiyon Hazırlamada kullanılan çözeltinin hazırlanması

1,741g K_2HPO_4 ve 1,360g KH_2PO_4 , 11,2 g KCl 500 ml suda çözüldü. Bu çözeltiye 0,372 g EDTA, 0,154 g DTT, 0,0174 g PMSF, 230 ml % 87 gliserol eklendi. K_2HPO_4 ile pH 7.4'e ayarlandı. Çözelti 1000 ml'ye tamamlandı (Fernandes ve ark 2008).

2.5.7. 7-etoksiresorufin O-deetilaz (EROD) aktivitesi tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

0,4 M pH 7,8 fosfat tamponu çözeltisi; 1.741 g K_2HPO_4 ve 1.360 g KH_2PO_4 bir miktar distile su içerisinde çözüldü K_2HPO_4 ile pH 7,8'e ayarlandı ve 250 ml'ye tamamlandı.

1 M NaCl çözeltisi; 5,85 g NaCl bir miktar suda çözülür ve üzeri 100 ml ye tamamlandı.

12 mg/ml Albümin Bovine Serum (BSA) çözeltisi; 0,6 g BSA suda çözülerek üzeri 50 ml'ye tamamlandı.

10 mM NADPH çözeltisi; 8,33 mg NADPH 1 ml tampon çözeltisinde hazırlandı. +4 °C'de günlük saklanır. Işıktan uzak tutularak -20 de 1 ay saklanabilir. (Krüner ve Westernhagen 1999).

10 µM Etoksirezorufin çözeltisi; 1 mg Etoksirezorufin 83 ml DMSO'da çözülerek 50µM çözelti elde edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta 12 hafta saklanabilir. Ölçüm yapılacağında 1 ml üzerine 4 ml tampon eklendi ve 10 µM çözelti elde edildi.

Bazı kaynaklarda DMSO yerine metanol'de çözücü olarak kullanılmaktadır fakat Krüner ve Westernhagen (1999) çözücü olarak DMSO kullanıldığında metanol'e göre ortalama % 34 daha fazla değer okunduğunu belirtmiştir.

Standart Rezorufin çözeltisinin hazırlanması; 1 mg rezorufin 50 ml DMSO içinde çözüldü. Bu stok çözelti kullanılarak dokudaki EROD aktivitesine göre uygun seyreltilmiş rezorufin çözeltisi hazırlandı ve iç standart olarak kullanıldı.

2.6. Kullanılan yöntemler

2.6.1. Sitozolik fraksiyon hazırlama

Karaciğer ve kas dokularının yaş ağırlıkları saptandı, bistüri ile daha küçük parçalara ayrılıp bir miktar distile su ile yıkandı. Homojenizasyon tüpünde işgal ettikleri miktarın beş katı (3 ml) 0,15M KCl, 1mM dithiothreitol (DTT), 0,1mM PMSF ve 1mM EDTA içeren 0.1M fosfat tamponu (pH 7,4) ile yüksek devirde 10 dakika +4°C de buz banyosunda homojenize edildi. Homojenatlar bekletilmeden 12000×g de 20 dakika +4°C de santrifüj edilerek elde edilen süpernatant'ın aynı gün içinde Total protein, GSH, GST, MDA ve ACHE analizleri yapıldı (Fernandes ve ark. 2008).

2.6.2. Mikrozomal fraksiyon hazırlama

Karaciğer ve kas dokularının yaş ağırlıkları saptandı, bistüri ile daha küçük parçalara ayrılıp bir miktar % 1.15 KCl çözeltisi ile yıkandı. Homojenizasyon tüpünde işgal ettikleri miktarın beş katı (3 ml) 0,15M KCl, 1mM dithiothreitol (DTT), 0,1mM PMSF ve 1mM EDTA içeren 0.1M fosfat tamponu (pH 7,4) ile yüksek devirde 10 dakika +4°C de buz banyosunda homojenize edildi.

Elde edilen homojenat 12.000×g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 100.000×g'de (27.200 rpm) tekrar santrifüj edildi ve elde edilen pelet 1,741g K₂HPO₄ ve 1,360g KH₂PO₄, 11,2 g KCl, 0,372 g EDTA, 0,154 g DTT, 0,0174 g PMSF, 230 ml % 87 gliserol içeren pH 7,4'e ayarlanmış 1000 ml'lik stok çözeltiden uygun miktar ile (1g dokuya 1ml) tekrar süspanse edilerek analize hazır hale getirildi (Fernandes ve ark 2008).

2.6.3. Karaciğer ve Kas dokularında total protein tayini

Total protein tayini için biüret metoduna dayalı DDS (XSYS018) ticari kiti kullanılarak 546 nm’de fotometrik ölçüm yapıldı.

Çizelge 2.6.3. Total protein tayininde kör, numune ve standartın hazırlanması.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Protein	-	20	20
Distile su	20	-	-
Reaktif	1000	1000	1000

Kör, numune ve standart yukarıdaki tablodaki gibi hazırlanıp vortekslelendikten sonra 5 dakika inkübe edildi. Hazırlanan numuneler ve standart köre karşı 546 nm’de okuma yapıldı. Numunelerdeki total protein miktarı okunan standart absorbansına göre hesaplandı. Dokularda yapılan analizler total protein sonuçlarına uyarlandı.

2.6.4. Dokuda MDA Analizi

Yöntem hazırlanan sitozolik fraksiyonlarda MDA analizi TBA (tiyobarbitürik asit) ile MDA’nın asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Sitozolik fraksiyonda MDA analizi için vidalı kapaklı cam tüpler içine 300 µl numune ilave edildikten sonra 600 µl stok solüsyon eklendi. Tüpler, 20 dakika kaynatıldıktan sonra buzlu suda soğutuldu, 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. 535 nm’de havaya karşı absorbanslar okutuldu (Ohkawa ve ark 1979).

Hesaplama:

$$MDA \text{ aktivitesi } (nmol \cdot mg \text{ doku}^{-1}) = \frac{A_{535} \times V_T \times 10^6}{1,56 \times 10^5 \times \text{ışık yolu} \times V_{numune} \times [doku]}$$

$$A_{535} = \text{Absorbans}$$

$$V_T = \text{Toplam hacim} = 900 \mu\text{L}$$

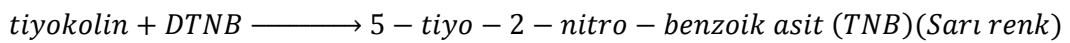
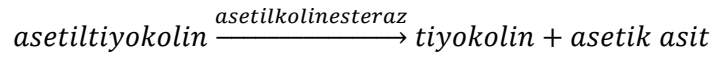
$$V_{numune} = \text{Numune hacmi} = 300 \mu\text{L}$$

$$[doku] = \text{doku derişimi } \left(\frac{mg}{ml} \right)$$

$$\text{Işık yolu} = 1 \text{ cm}$$

2.6.5. Dokuda Asetil Kolinesteraz Tayini (ACHE)

Asetil kolinesteraz tayini asetil tiyokolin iyodür'ün (ACTC) tiyokolin ve asetata parçalanması esasına dayanır. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile DTNB'nin tepkimesi sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm'de ölçülür (Ellman ve ark. 1961).



0,4 ml homojenat (0,02 g doku/ml tampon), 2.6 ml fosfat tamponu (pH=8, 0,1 M) ve 0,1 ml DTNB (0,01 M) küvete konarak 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 20 µL asetil tiyokolin iyodür (ACTC) eklenerek reaksiyon başlatıldı 5 dakika boyunca 412 nm'de absorbans değişimi kaydedildi.

Hesaplama: ACHE aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$ACHE \text{ aktivitesi } (nmol \cdot dak^{-1} \cdot mg \text{ protein}^{-1}) = \frac{\Delta A_{412} \times V_T \times 10^6}{1,36 \times 10^4 \times \Delta t \times \text{ışık yolu} \times V_{numune} \times [protein]}$$

$\Delta A_{412} = \text{Absorbans değişimi}$

$\Delta t = \text{Geçen zaman}$

$V_t = \text{Toplam hacim} = 3120 \mu\text{L}$

$V_{\text{numune}} = \text{Numune hacmi} = 400 \mu\text{L}$

$[\text{protein}] = \text{Total protein derişimi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$

$\text{Işık yolu} = 1 \text{ cm}$

2.6.6. Dokuda Glutasyon (GSH) Analizi

Dokuda glutasyon analizinde Ellman reaktifi 5-5'- ditiyobis-2-nitro-benzoik asit (DTNB) kullanılmıştır. Analiz için kr ve numune tüpleri hazırlandı. Numune tüpüne 200 μL rnek konulduktan sonra 1.8 ml saf su ve 3 ml presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Kr tüpe ise 0.4 ml saf su ve 0.6 ml presipitasyon solüsyonu konuldu. Hazırlanan karışımlara süzme işlemi uygulandıktan sonra szlen kısımlardan 1 ml süpernatant alındı ve üzerine 4 ml fosfat solusyonu ve 0.5 ml DTNB (5-5'- dithiobis (2-nitrobenzoik asit) eklendikten sonra 412 nm' de okundu ve sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ doku olarak hesaplandı (Beutler ve ark 1963).

Sonuçlar GSH için molar absorpsiyon katsayısı olan (ekstinksiyon katsayısı) $1,36 \cdot 10^4$ mol/L kullanılarak nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

$$\text{GSH miktarı (nmol.mg protein}^{-1}) = \frac{A_{412} \times V_T \times 10^6}{1,36 \times 10^4 \times \text{ışık yolu} \times V_{\text{numune}} \times [\text{protein}]}$$

$\Delta A_{412} = \text{Absorbans değişimi}$

$V_t = \text{Toplam hacim}$

$V_{\text{numune}} = \text{Numune hacmi}$

$[\text{protein}] = \text{Total protein derişimi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$

$\text{Işık yolu} = 1 \text{ cm}$

2.6.7. Dokuda GST analizi

Glutasyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin GSH'ın –SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. Dokuda GST aktivitesi, glutasyon ve 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanan metotla gerçekleştirildi (Habig ve ark 1974).

Çizelge 2.6.7. GST analizi için kör ve numune tüplerinin hazırlanışı.

	Kör tüpü (ml)	Numune tüpü (ml)
GSH (26 mM)	0,1	0,1
CDNB (30 mM)	0,1	0,1
K-Fosfat tamponu 0,1M (pH=6,5)	2,2	2,2
Süpernatant	-	0,6

Yukarıda verildiği şekilde hazırlanan karışımların 340 nm'de absorbansları beş dakika boyunca izlendi. Absorbans farkı alınarak aşağıdaki formül ile spesifik aktivite nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

Hesaplama:

$$GST \text{ aktivitesi } (nmol . dak^{-1} . mg \text{ protein}^{-1}) = \frac{\Delta A_{340} \times V_T \times 10^6}{9,6 \times 10^3 \times \Delta t \times \text{ışık yolu} \times V_{numune} \times [protein]}$$

$$\Delta A_{412} = \text{Absorbans değişimi}$$

$$\Delta t = \text{Geçen zaman}$$

$$V_t = \text{Toplam hacim} = 3000 \mu L$$

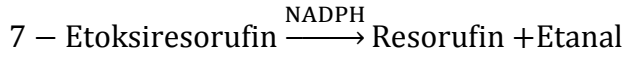
$$V_{numune} = \text{Numune hacmi} = 600 \mu L$$

$$[protein] = \text{Total protein derişimi } \left(\frac{mg}{ml} \right)$$

$$\text{Işık yolu} = 1 \text{ cm}$$

2.6.8. Dokuda EROD aktivitesinin analizi

Sitokrom P4501A (CYP1A) aktivitesi 7-etoksiresorufin'in NADPH varlığında dealkilasyonu sonucu rezorufin'e dönüşüm hızı ile ölçülmektedir (Burke ve Mayer 1974). Florometrik ölçüme dayalı metod daha sonra 1994'te Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilmiştir. EROD analizi optimize edilen bu metoda göre yapılmıştır.



Aşağıdaki tabloda verilen miktarlarda stok çözeltilerden eklenerek elde edilen karışım her biri 250 µL'lik bloklardan oluşan 96 numunelik küvete yerleştirildi ve florometre cihazında (Fluoroskan Ascent FL Thermo lab systems) 535 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon dalga boylarında en son substrat yani etoksiresorufin eklenerek 2 dakika boyunca floresanstaki değişim kaydedildi. En son iç standart olarak 25 µL rezorufin (9,38 nM) eklendi ve floresanstaki artış kaydedilerek enzim aktivitesi pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ birimi dikkate alınarak hesap edildi.

Çizelge 2.6.8. EROD analizi için hazırlanan çözeltilerin 96'lık küvete ilave edilen hacimleri ve son derişimleri.

Stok çözelti	İlk konsantrasyon	Eklenen Hacim(µL)	Son konsantrasyon
pH=7,8 KPi tamponu	400 mM	62,5	100 mM
NaCl	1M	25	0,1 M
BSA	12 mg.ml ⁻¹	25	1,2 mg.ml ⁻¹
Doku Mikrozomal Proteini	-	25	12,5-25 µg aralığında mikrozomal protein içermeli
NADPH	10 mM	25	1 mM
Etoksiresorufin	10 µM	37,5	1,5 µM
Destile su	-	50	-
Toplam		250	
İç standart	938 nM	10	36,07 nM

Hesaplama:

$$\text{EROD aktivitesi (pmol} \cdot \text{dak}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}) = \frac{\Delta F_s \times R \times V_T}{\Delta t \times F_R \times V_{\text{numune}} \times [\text{protein}]}$$

ΔF_s = Floresans değışimi

Δt = Geçen zaman= 3 dak.

V_T = Karışımın toplam hacmi=250 μL =0,25 ml

V_{numune} =Numune hacmi= 25 μL =0,025 ml

R = İlave edilen resorufin son derişimi=36,07 nM

F_R = Resorufin ilavesi ile oluşan floresans artışı

$[\text{protein}]$ = Total protein derişimi ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)

Işık yolu=1 cm

2.6.9. Su Numunelerinin Analizi

Çizelge 2.6.9. Su kalitesi parametrelerinin analizinde kullanılan metotlar.

Yapılan Analiz	Hesaplama Birimi	Test Yöntemi
Bulanıklık	NTU	SM 2130:B
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	mg O ₂ /L	SM 5220:B
Toplam Fosfor	mg/L	SM 4500:4500-P:B,C
Çözünmüş oksijen	mg O ₂ /L	EN 25814 (1992)
İletkenlik	$\mu\text{S/cm}$	SM 2510:B
NH ₃ -N (mg/L)	mg/L	SM 4500-NH ₃ :B,C/F
Sülfat	mg/L	SM 4110:B (IC)
Nitrat	mg/L	SM 4110:B (IC)
Nitrit	mg/L	SM 4110:B (IC)

1,5 litrelik pet şişelerde Ocak ve Temmuz aylarında alınan su numuneleri ivedi bir şekilde buz banyosu içinde ağzı sıkıca kapalı olarak; iletkenlik, çözünmüş oksijen, bulanıklık, toplam fosfor, nitrat, nitrit, amonyak, sulfat, fosfat ve kimyasal oksijen ihtiyacı değerleri gibi su kalite parametrelerinin analizi yapılmak üzere Çevre Analiz (İstanbul) laboratuvarına gönderilmiş ve hizmet alımı şeklinde analizi yaptırılmıştır. pH ve sıcaklık su numuneleri alındıktan hemen sonra ölçülmüştür. Su kalitesi parametrelerinde kullanılan metotlar Çizelge 2.6.9.'da verilmiştir.

2.5.10. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Versiyon Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Çalışma gruplarına ait veriler ortalama $\pm$ standart hata (Ortalama $\pm$ S x) şeklinde gösterildi. İstatiksel yöntem olarak gruplar arası karşılaştırmada One-Way ANOVA testi uygulandı. Duncan testi ile önemler tespit edilerek istatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Çizelge 3.1. Numune Alınan İstasyonlara ait Suların Fiziksel ve Kimyasal Parametreleri.

Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	Kemer Barajı Ocak Dönemi	Kemer Barajı Temmuz Dönemi	Fethiye Ocak Dönemi	Fethiye Temmuz Dönemi
Sıcaklık (Celcius)	10	18	13	17
pH	8,1	8,7	8,0	8,6
Bulanıklık (NTU)	2,5±0,03	0,31±0,01	0,57±0,02	0,2±0,01
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) mg (O ₂ /L)	17±0,8	35±1,2	10±0,6	<10
Toplam Fosfor (mg/L)	≤0,2	≤0,2	≤0,2	≤0,2
Çözülmüş oksijen mg (O ₂ /L)	10,49±0,1	10,28±0,1	10,2±0,1	10,2±0,1
İletkenlik (µS/cm)	499±5	50±6	589±4	383±3
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0,03±0,01	0,20±0,02	0,03±0,01	0,21±0,02
Sülfat (mg/L)	33,8±3,1	26,6±2,3	3,6±0,4	5,4±0,9
Nitrat (mg/L)	1,6±0,3	2,1±0,4	1,1±0,2	1,6±0,2
Nitrit (mg/L)	≤0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,05

3.2. Su Numunelerinin Kalitelerinin Değerlendirilmesi.

YSKYY (2012)'ye göre Kıtaçi Yüzeysel Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleri Çizelge 3.2a.'da verilmiştir.

YSKYY (2012)'ne göre kalite sınıflarına göre suların kullanım maksatları aşağıdaki gibidir;

Sınıf I - Yüksek kaliteli su;

- ✓ İçme suyu olma potansiyeli yüksek olan yüzeysel sular,
- ✓ Yüzme gibi vücut teması gerektirenler dahil rekreasyonel maksatlar için kullanılabilir su,
- ✓ Alabalık üretimi için kullanılabilir nitelikte su,
- ✓ Hayvan üretimi ve çiftlik ihtiyacı için kullanılabilir nitelikte su,

Sınıf II - Az kirlenmiş su;

- ✓ İçme suyu olma potansiyeli olan yüzeysel sular,
- ✓ Rekreasyonel maksatlar için kullanılabilir nitelikte su,
- ✓ Alabalık dışında balık üretimi için kullanılabilir nitelikte su,
- ✓ Mer'i mevzuat ile tespit edilmiş olan sulama suyu kalite kriterlerini sağlamak şartıyla sulama suyu,

Sınıf III - Kirlenmiş su;

- ✓ Gıda, tekstil gibi nitelikli su gerektiren tesisler hariç olmak üzere, uygun bir arıtmadan sonra su ürünleri yetiştiriciliği için kullanılabilir nitelikte su ve sanayi suyu,

Sınıf IV - Çok kirlenmiş su;

- ✓ Sınıf III için verilen kalite parametrelerinden daha düşük kalitede olan ve üst kalite sınıfına ancak iyileştirilerek ulaşabilecek yüzeysel sular.

Çizelge 3.2a. Kıta içi Yüzeysel Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleri
(YSKYY 2012).

Su Kalite Parametreleri	Su Kalite Sınıfları			
	I	II	III	IV
Genel Şartlar				
Sıcaklık (°C)	≤ 25	≤ 25	≤ 30	> 30
pH	6,5-8,5	6,5-8,5	6,0-9,0	6,0-9,0 dışında
İletkenlik (µS/cm)	< 400	400-1000	1001-3000	> 3000
(A) Oksijenlendirme Parametreleri				
Çözünmüş oksijen (mg O ₂ /L)	> 8	6-8	3-6	< 3
Oksijen doygunluğu (%)	90	70-90	40-70	< 40
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) (mg/L)	< 25	25-50	50-70	> 70
Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ ₅) (mg/L)	< 4	4-8	8-20	> 20
B) Nutrient (Besin Elementleri) Parametreleri				
Amonyum azotu (mg NH ₄ ⁺ - N/L)	< 0,2	0,2-1	1-2	> 2
Nitrit azotu (mg NO ₂ ⁻ -N/L)	< 0,002	0,002-0,01	0,01-0,05	> 0,05
Nitrat azotu (mg NO ₃ ⁻ -N/L)	< 5	5-10	10-20	> 20
Toplam kjeldahl-azotu (mg/L)	0.5	1.5	5	> 5
Toplam fosfor (mg P/L)	< 0,03	0,03-0,16	0,16-0,65	> 0,65

YSKYY (2012)'ye birinci sınıf sular için en yüksek sülfat iyonu konsantrasyonu 200 mg/L'dir. Yapılan çalışmada numune alınan istasyonlarda sülfat iyonu miktarları 3,6-33,8 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. En düşük değer 3,6 mg/L ile Fethiye

Karacaören köyü beton havuzlarında Ocak döneminde ölçülmüştür. En yüksek sülfat değerleri ise 33,8 mg/L ile Kemer barajı Ocak döneminde ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre her iki istasyonda sülfat iyonu konsantrasyonu açısından birinci sınıftır.

YSKYY (2012)'ye göre birinci sınıf sular için en yüksek nitrat konsantrasyonu değeri 5 mg/L'dir. Yapılan çalışmada numune alınan istasyonlarda nitrat iyonu miktarları 1,1-2,1 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. En düşük değer 1,1 mg/L ile Fethiye Karacaören köyü beton havuzlarında Ocak döneminde ölçülmüştür. En yüksek nitrat değerleri ise 2,1 mg/L ile Kemer barajı Temmuz döneminde ölçülmüştür.

YSKYY (2012)'ye göre ikinci sınıf sular için en yüksek nitrit iyonu konsantrasyonu 0,05 mg/L'dir. Numune alınan istasyonlarda nitrit iyonu miktarları tüm istasyonlarda $\leq 0,05$ mg/L değerinden küçük bulunmuştur.

Çizelge 3.2b. Belirli NTU (Units of Nephelometric) veya JTU (Jackson Turbidity Units) aralıklarda bulanıklık değerlerinin balıklara etkileri (Rowe ve ark 2003).

Etkilenme	Organizma	Bulanıklık değer aralığı	Referans
Kan şekerinde artış	Juvenile coho	Bütün değerlerde doğrusal artış	Sevizi and Martens 1992
Artan öksürme	Juvenile coho	3 - 30 NTU (24 saat)	Sevizi and Martens 1992
Davranış değişikliği	Juvenile coho	10-60 NTU	Berg 1982; Berg and Northcote 1985
Davranış değişikliği	Çipura ve yeşil güneş balığı	14-16 JTU	Heimstra et al. 1969
Beslenme oranında azalma	Juvenile coho	10-60 NTU	Berg 1982; Berg and Northcote 1985
Beslenme oranında azalma	Kahverengi alabalık	7.5 NTU	Bachman 1984
Gelişimde azalma	Juvenile coho ve Steelhead cinsi gökkuşağı alabalığı	25 NTU	Sigler et al. 1984

Bulanıklık 0,2-2,5 NTU değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek değer 2,5 NTU ile kemer barajında Ocak döneminde ölçülmüştür. Bazı bulanıklık değerlerinde farklı cins

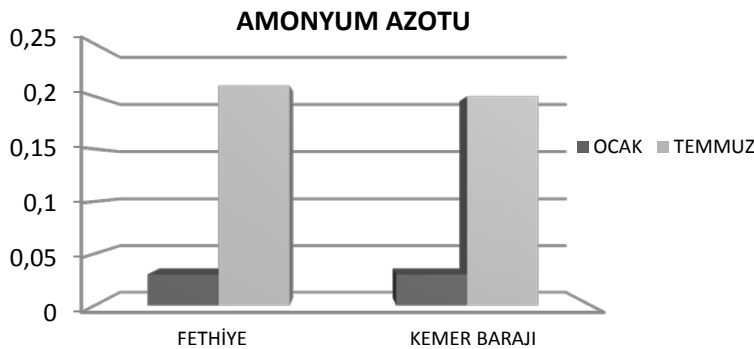
balıklarda meydana gelen bazı komplikasyonlar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Çizelge 3.2b.'deki değerlere bakıldığında her iki istasyon içinde bulunan değerlerin çok düşük olduğu söylenebilir.

Amerika balıkçılık işletmeleri çıkış suyu toplam fosfor limit değerini 0,17 mg/L olarak belirtmiştir (Schwartz ve Boyd 1994). Kanada'da farklı eyaletler salmonid işletmeleri çıkış suyu toplam fosfor çıkış suyu limit değerlerini 0,02-0,1 mg/L olarak belirlemiştir (Stechey ve Linqvist 2006). Yapılan çalışmada numune alınan istasyonlarda toplam fosfor değerleri 0,2 mg/L'den küçük değerler bulunmuştur.

KOI değeri en yüksek Temmuz döneminde Kemer barajında $35 \pm 1,2$ mg O₂/L ölçülmüştür. YSKYY (2012)'ye göre birinci sınıf sulara KOİ değerleri 25 O₂/L'den küçük olmalıdır. Dolayısıyla sadece Kemer barajı Temmuz döneminde ikinci sınıf su özelliği göstermiştir. Bunun dışında alınan tüm su numuneleri birinci sınıf su özelliği göstermiştir.

Çözülmüş oksijen miktarı her iki istasyonda da Ocak ve Temmuz döneminde yakın seviyelerde seyretmiş ve YSKYY (2012)'ye göre 1. Sınıf su özelliği göstermiştir. İletkenlik değerleri ise her iki istasyonda Ocak döneminde ikinci sınıf su özelliği göstermiştir.

Amonyum azotu her iki istasyonda Temmuz döneminde 0,2 mg/L veya üzerinde bulunmuş ve YSKYY (2012)'ye göre ikinci kalite su özelliği göstermişlerdir.



Şekil 3.2. Fethiye ve Kemer barajındaki sularda Ocak ve Temmuz dönemlerinde amonyak seviyeleri grafiği (mg/L).

3.3. MDA Analiz Sonuçları

Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan balık numunelerinin dokularındaki lipid peroksidasyonu malondialdehit (MDA) düzeyi ölçülerek belirlendi. Fethiye ve Kemer barajında yaşayan balıkların kas dokuları ile Kemer barajından alınan balıkların karaciğer doku örneklerinin MDA düzeyleri Temmuz döneminde Ocak ayına göre daha düşük ($p<0.05$); buna karşılık Fethiye'deki balık çiftliklerinden elde edilen örneklerin karaciğer dokusunda ise aynı dönemde daha yüksek ($p<0.05$) bulundu (Çizelge 3.3a.).

Çizelge 3.3a. Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama MDA düzeyleri (nmol.mg doku⁻¹).

MDA ANALİZİ (Ortalama± S x)								
Doku çeşidi	Fethiye				Kemer Barajı			
	n	Ocak	n	Temmuz	n	Ocak	n	Temmuz
Karaciğer	27	9,03±1,3 ^{bc}	25	16,4±3,1 ^a	27	11,5±1,9 ^{ab}	25	3,8±0,8 ^c
Kas	25	19,5±3,3 ^a	29	7,3±1,1 ^b	25	12,7±1,5 ^b	24	6,8±1,4 ^b
P<0,05 istatistiksel açıdan anlamlı								
a, b, c; aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir.								

Tüm dokuların MDA seviyeleri mevsimlere göre değerlendirildiğinde kas dokusunda Temmuz döneminde istatistiki açıdan önemli bir azalma saptanırken ($p\leq 0,05$), karaciğer dokusunda bir değişim görülmedi (Çizelge 3.3b.).

Fethiye ve Kemer Barajında alınan örneklerin doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, Kemer barajındaki balıkların karaciğer dokusunun MDA miktarlarının

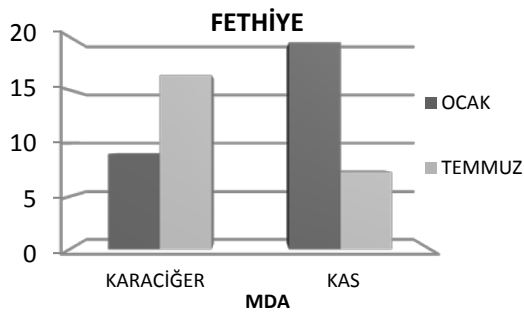
daha düşük olduğu ($p \leq 0,05$), kas doku düzeyleri arasında bir fark olmadığı ($p \geq 0,05$) görüldü (Çizelge 3.3c.).

Çizelge 3.3b. Mevsimlere göre ortalama MDA seviyeleri (nmol.mg doku⁻¹).

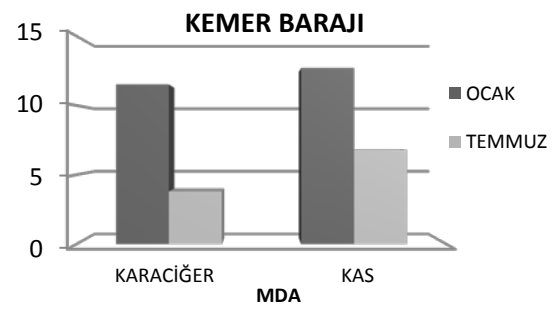
MDA ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Ocak Dönemi	n	Temmuz Dönemi	p
Karaciğer	54	10,29±1,1	49	9,99±1,8	0,887
Kas	50	16,14±1,8	53	7,1±0,9	0,000

Çizelge 3.3c. İstasyonlara göre ortalama MDA seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.mg doku⁻¹)

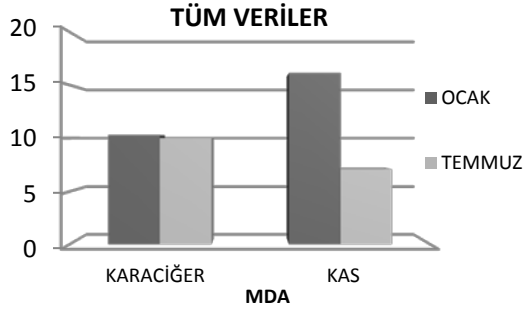
MDA ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Fethiye	n	Kemer Barajı	p
Karaciğer	52	12,61±1,7	52	7,85±1,1	0,025
Kas	54	12,9±1,8	49	9,8±1,1	0,164



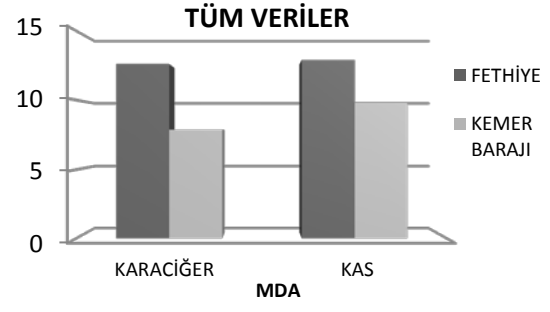
Şekil 3.3a. Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama MDA seviyelerinin değişim grafiği (nmol.mg doku⁻¹).



Şekil 3.3b. Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama MDA seviyelerinin değişim grafiği (nmol.mg doku⁻¹).



Şekil 3.3c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama MDA seviyelerinin mevsimlere göre değişim grafiği (nmol.mg doku⁻¹).



Şekil 3.3d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama MDA seviyelerinin istasyonlara göre değişim grafiği (nmol.mg doku⁻¹).

3.4. ACHE Analizi Sonuçları

Fethiye ve Kemer Barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan numunelerde yapılan asetilkolinesteraz (ACHE) aktivite sonuçları Çizelge 3.3a.'da verildi. ACHE ortalama düzeylerinin Temmuz döneminde hem karaciğer hem de kas dokusunda daha düşük olduğu belirlendi. Ancak Kemer Barajından elde edilen örneklerin ACHE düzeylerindeki düşüş istatistiki açıdan önem taşımamaktadır ($p>0.05$) (Çizelge 3.4.1.). Tüm Ocak ve Temmuz dönemi bulguları değerlendirildiğinde ACHE aktivitelerinin Temmuz döneminde daha düşük olduğu görüldü ($p=0,005$) (Çizelge 3.4b).

Numune elde edilen istasyonlar karşılaştırıldığında ise Fethiye'den alınan örneklerin karaciğer dokusundaki ACHE düzeyleri ($p\leq 0,001$); Kemer barajından elde edilen örneklerin ise kas doku ACHE değerlerinin daha düşük ($p>0,001$) olduğu analiz edildi (Çizelge 3.4c.). Kas dokusundaki bu düşüş istatistik olarak bir önem taşımamaktadır.

Çizelge 3.4a. Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama ACHE aktiviteleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

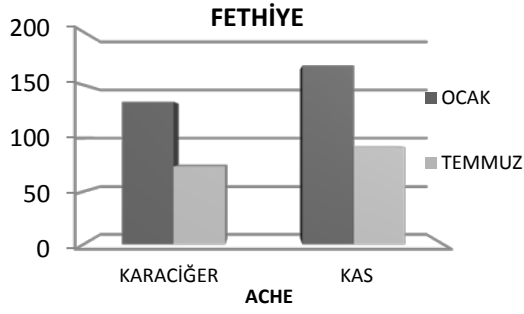
ACHE ANALİZİ (Ortalama± S x)								
Doku çeşidi	Fethiye				Kemer Barajı			
	n	Ocak	n	Temmuz	n	Ocak	n	Temmuz
Karaciğer	25	134,19±13 ^b	25	73,8±6,1 ^c	22	194,9±17 ^a	20	165±22,7 ^{ab}
Kas	29	168,3±10,6 ^a	29	92,1±7,2 ^b	28	120,6±10,9 ^b	25	96,8±10,4 ^b
P<0,05 istatistiksel açıdan anlamlı a, b, c; aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir.								

Çizelge 3.4b. Mevsimlere göre ortalama ACHE aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

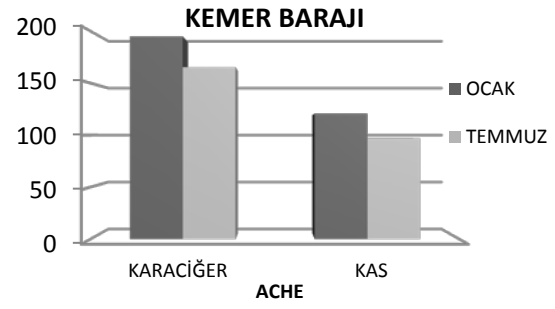
ACHE ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Ocak Dönemi	n	Temmuz Dönemi	p
Karaciğer	47	162,61±11,3	45	114,36±12,5	0,005
Kas	57	144,8±8,2	54	94,3±6,1	0,000

Çizelge 3.4c. İstasyonlara göre ortalama ACHE aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

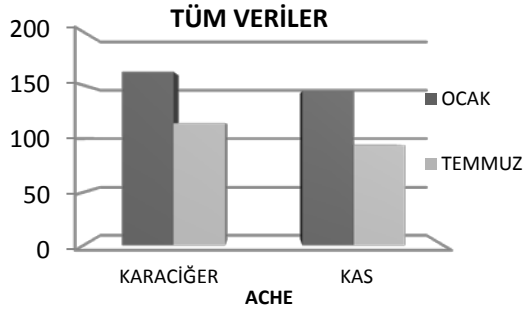
ACHE ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Fethiye	n	Kemer Barajı	p
Karaciğer	50	104±8,3	42	180±14	0,000
Kas dokusu	58	130,2±8,1	53	109,4±7,7	0,067



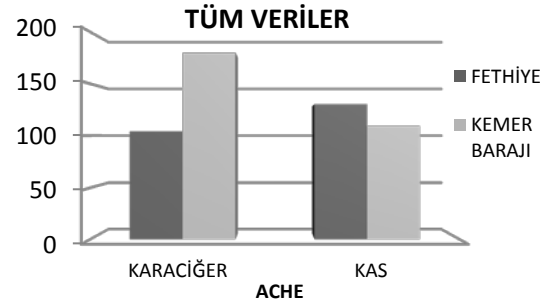
Şekil 3.4a. Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama AChE aktivitesinin değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.4b. Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama AChE aktivitesinin değişimi (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.4c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama AChE aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.4d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama AChE aktivitesinin istasyonlara göre değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

3.5. Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi sonuçları

Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan numunelerde Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesi değerlendirildiğinde; Temmuz dönemi karaciğer GST ortalama değerlerinin hem Kemer barajı hem de Fethiye de Ocak ayına daha düşük olmasının istatistiki açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0.05$). Kas dokularında ise Kemer barajında Temmuz döneminde Ocak dönemine göre daha yüksek ($p \leq 0.05$) bulundu (Çizelge 3.5a.).

Tüm veriler Ocak ve Temmuz dönemine göre değerlendirildiğinde karaciğer dokusu ortalama GST aktivitelerinin Temmuz döneminde daha düşük ($p \leq 0.05$) olduğu; kas

dokusunda ise önemli bir fark olmadığı tespit edildi (Çizelge 3.5b.). Fethiye ve Kemer Barajı istasyonlarından sağlanan örneklerin karaciğer ve kas dokularının GST düzeyleri karşılaştırıldığında Fethiye'deki balıkların karaciğer dokusu GST aktivitelerinin daha yüksek ($p \leq 0,05$) olduğu saptandı (Çizelge 3.5c.).

Çizelge 3.5a. Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama GST aktiviteleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

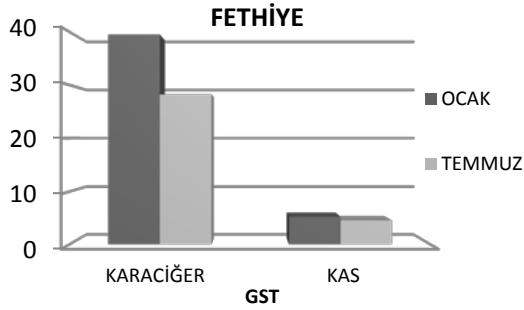
GST ANALİZİ (Ortalama± S x)								
Doku çeşidi	Fethiye				Kemer Barajı			
	n	Ocak	n	Temmuz	n	Ocak	n	Temmuz
Karaciğer	28	39,5±2,4 ^a	29	28,2±3,8 ^b	29	17,7±1,8 ^c	25	8,3±1,2 ^d
Kas	28	5,2±0,3 ^b	29	4,5±0,1 ^b	27	4,6±0,3 ^b	20	6,97±0,8 ^a
P<0,05 istatistiksel açıdan anlamlı a, b, c; aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir.								

Çizelge 3.5b. Mevsimlere göre ortalama GST aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

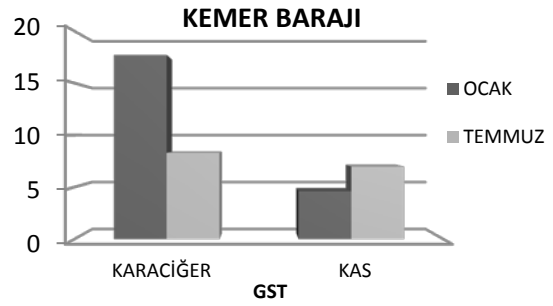
GST ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Ocak Dönemi	n	Temmuz Dönemi	p
Karaciğer	57	28,4±2,08	55	18,69±2,4	0,003
Kas	55	4,95±0,2	49	5,5±0,4	0,216

Çizelge 3.5c. İstasyonlara göre ortalama GST aktiviteleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹)

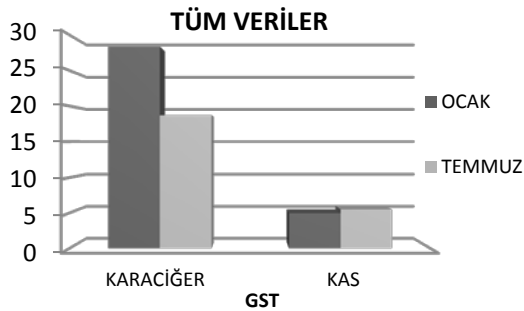
GST ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Fethiye	n	Kemer Barajı	p
Karaciğer	57	33,73±2,3	54	13,3±1,2	0,000
Kas dokusu	57	4,87±0,1	47	5,6±0,4	0,096



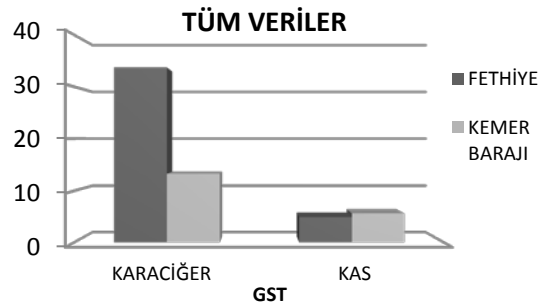
Şekil 3.5a. Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GST aktivitesinin değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.5b. Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GST aktivitesinin değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.5c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GST aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.5d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GST aktivitesinin mevsimlere göre değişim grafiği (nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

3.6. Glutasyon (GSH) analizi sonuçları

Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan numunelerde glutasyon (GSH) analizi sonuçları Çizelge 3.6a'da görülmektedir. Fethiye istasyonunda Temmuz dönemi karaciğer dokusu ortalama GSH düzeylerinde Ocak ayına göre istatistiki açıdan önemli bir azalma Kemer Barajından elde edilen örneklerde ise kas dokusunda benzer bir azalma olduğu görüldü ($P \leq 0,05$).

Tüm verilerin Ocak ve Temmuz dönemlerinin istatistiki değerlendirmesinde hem karaciğer dokusu hem de kas dokusu ortalama GSH seviyesi Temmuz döneminde Ocak ayına göre azalmıştır. Bu azalma istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,001$) (Çizelge 3.6b.). İstasyonların ortalama GSH düzeyleri değerlendirildiğinde Kemer Barajında elde edilen örneklerin kas ve karaciğer dokularının GSH miktarları Fethiye'den elde edilen örneklerin kas GSH miktarlarına göre daha yüksek bulundu ($p \leq 0,05$) (Çizelge 3.6c.).

Çizelge 3.6a. Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama GSH düzeyleri.
(nmol.mg protein⁻¹)

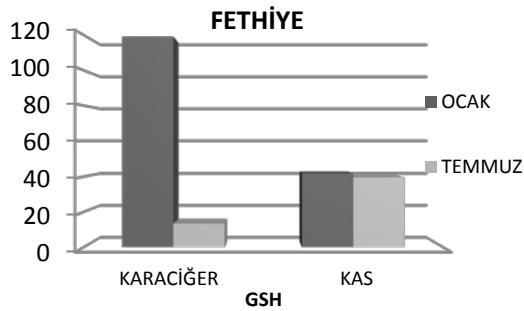
GSH ANALİZİ (Ortalama± S x)								
Doku çeşidi	Fethiye				Kemer Barajı			
	n	Ocak	n	Temmuz	n	Ocak	n	Temmuz
Karaciğer	28	119±11,5 ^a	29	13,4±1,7 ^c	29	100±12,5 ^{ab}	25	74,3±7,3 ^b
Kas	28	41,9±2,4 ^b	28	39,6±3,5 ^b	26	160,5±22,7 ^a	26	10,7±2,2 ^b
P<0,05 istatistiksel açıdan anlamlı. a, b, c; aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir.								

Çizelge 3.6b. Mevsimlere göre ortalama GSH seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.
(nmol.mg protein⁻¹)

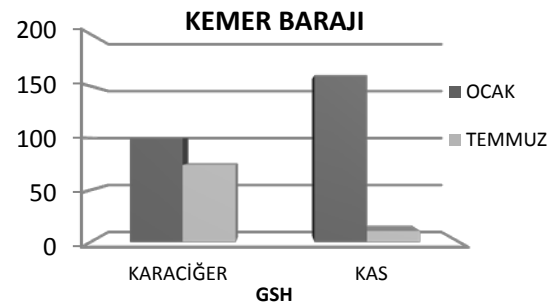
GSH ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Ocak Dönemi	n	Temmuz Dönemi	p
Karaciğer	57	109,98±8,5	54	39,82±5,2	0,000
Kas	54	99,03±13	54	25,7±2,8	0,000

Çizelge 3.6c. İstasyonlara göre ortalama GSH seviyeleri ve önemlilik düzeyleri.

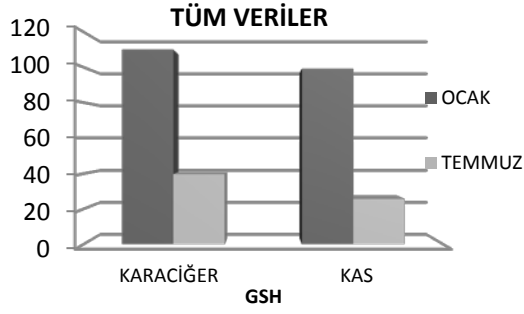
GSH ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Fethiye	n	Kemer Barajı	p
Karaciğer	57	65,6±9,1	54	88,48±7,6	0,059
Kas dokusu	56	40,76±2,1	52	85,67±15	0.003



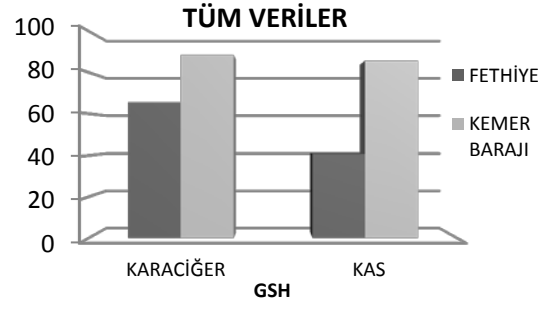
Şekil 3.6a. Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GSH seviyelerinin değişim grafiği (nmol.mg protein⁻¹).



Şekil 3.6b. Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama GSH seviyelerinin değişim grafiği (nmol.mg protein⁻¹).



Şekil 3.6c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GSH seviyelerinin mevsimlere göre değişim grafiği (nmol.mg protein⁻¹)



Şekil 3.6d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama GSH seviyelerinin istasyonlara göre değişim grafiği (nmol.mg protein⁻¹).

3.7. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) analizi sonuçları

Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan numunelerde Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) analizi sonuçlarına (Çizelge 3.7a.) göre Kemer barajında karaciğer dokusunda Temmuz döneminde Ocak dönemine göre istatistiki açıdan önemli bir artış; Fethiye’de ise tersine düşüş olduğu görüldü ($p \leq 0,05$).

Tüm verilerin Ocak ve Temmuz dönemleri istatistiki olarak değerlendirildiğinde hem karaciğer dokusu hem de kas dokusu ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi düzeylerinde istatistiki açıdan önemli bir değişim görülmedi ($p \geq 0,05$) (Çizelge 3.7b.).

Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesinin istasyonlara göre istatistiki değerlendirmesinde Fethiye’de kas dokusunda istatistiki açıdan önemli bir artış görülmüştür ($p \leq 0,05$) (Çizelge 3.7c.).

Çizelge 3.7a. Fethiye ve Kemer Barajında mevsime göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi düzeyleri (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

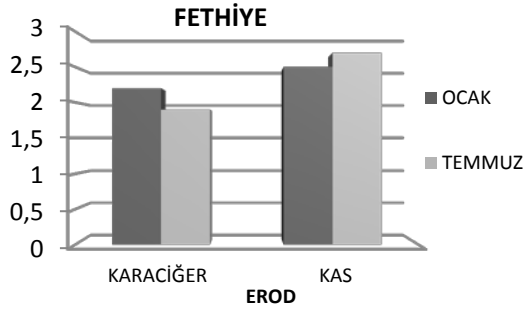
EROD ANALİZİ (Ortalama± S x)								
Doku çeşidi	Fethiye				Kemer Barajı			
	n	Ocak	n	Temmuz	n	Ocak	n	Temmuz
Karaciğer	29	2,2±0,1 ^a	30	1,9±0,06 ^b	26	1,38±0,07 ^c	26	2,5±0,1 ^a
Kas	27	2,5±0,1 ^{ab}	30	2,7±0,1 ^a	29	2,29±0,1 ^b	24	2,45±0,1 ^{ab}
P<0,05 istatistiksel açıdan anlamlı. a, b, c; aynı satırda farklı harf taşıyan grup ortalamaları arası fark önemlidir.								

Çizelge 3.7b. Mevsimlere göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi ve önemlilik düzeyleri (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

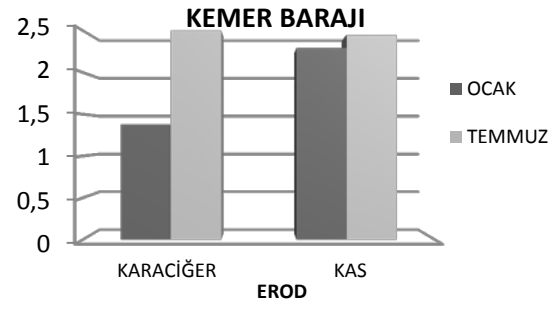
EROD ANALİZİ (Ortalama± S x)					
Doku çeşidi	n	Ocak Dönemi	n	Temmuz Dönemi	p
Karaciğer	55	1,79±0,08	56	2,24±2	0,235
Kas	56	2,41±0,08	54	2,62±0,08	0,090

Çizelge 3.7c. İstasyonlara göre ortalama Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi ve önemlilik düzeyleri (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

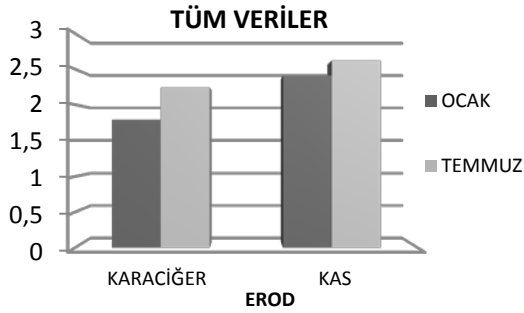
EROD ANALİZİ (Ortalama± S x)					
	n	Fethiye	n	Kemer Barajı	p
Karaciğer	59	2,02±0,96	52	1,98±0,1	0,733
Kas dokusu	57	2,65±0,08	53	2,36±0,08	0,022



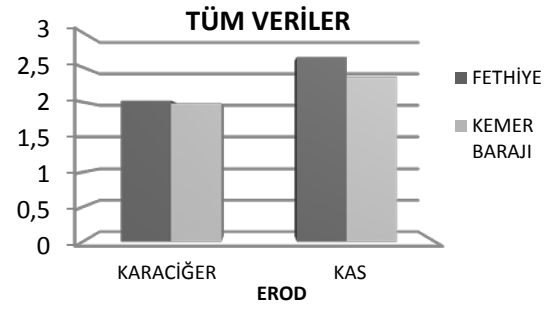
Şekil 3.7a. Fethiye’de karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama EROD aktivite değerlerinin değişimi grafiği (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.7b. Kemer barajında karaciğer ve kas dokusunda mevsimlere göre ortalama EROD aktivite değerlerinin değişimi grafiği (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.7c. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama EROD aktivite değerlerinin mevsimlere göre değişimi grafiği (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).



Şekil 3.7d. Karaciğer ve kas dokusunda ortalama EROD aktivite değerlerinin istasyonlara göre değişimi grafiği (pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹).

Çizelge 3.7.4. Tüm istatistiksel analizlerin özet tablosu.

	ACHE	EROD	GSH	GST	MDA
Kemer Barajı	=	=	--	+	=
Ocak→Temmuz (KAS)	↓ %19,7	↑ %7	↓ %93,3	↑ %51,5	↓ %46,5
Fethiye	-	=	=	=	-
Ocak→Temmuz (KAS)	↓ %45,2	↑ %8	↓ %5,5	↓ %13,4	↓ %62,5
Tüm veriler	-	=	-	=	-
Ocak→Temmuz (KAS)	↓ %35	↑ %8,7	↓ %74	↑ %11	↓ %56
Tüm veriler	=	-	+	=	=
Fethiye→Kemer barajı (KAS)	↓ %16	↓ %11	↑ %110	↑ %15	↓ %24
Kemer barajı	=	+	=	-	-
Ocak→Temmuz (KARACIĞER)	↓ %15,3	↑ %81,1	↓ %25,7	↓ %53,1	↓ %67
Fethiye	-	-	--	-	+
Ocak→Temmuz (KARACIĞER)	↓ %45	↓ %13,6	↓ %88,7	↓ %28,6	↑ %81,6
Tüm veriler	-	=	-	-	=
Ocak→Temmuz (KARACIĞER)	↓ %30	↑ %25	↓ %63,8	↓ %34,2	↓ %3
Tüm veriler	+	=	=	-	-
Fethiye→Kemer barajı (KARACIĞER)	↑ %73	↓ %2	↑ %34,8	↓ %60,5	↓ %37,7
=	İstatistiksel olarak fark anlamsız.		p>0,05		
-	İstatistiksel olarak anlamlı azalma.		p≤0,05		
--	İstatistiksel olarak anlamlı 4/5'den fazla azalma.		p≤0,05		
+	İstatistiksel olarak anlamlı artış.		p≤0,05		

4. TARTIŞMA

Risk değerlendirmesi insan faaliyetlerinden ve doğal afetlerden kaynaklanan değişimlerin ve olasılıkların değerlendirilmesi şeklinde tanımlanabilir (Suter 1993). Çevre bilimcileri zararlı kimyasalları keşfettiklerinden bu yana ERA (Çevresel risk değerlendirmesi) prosesleri daha da önem kazanmıştır (Bascietto ve ark 1990). Kirliliğin hücresele ve biyomoleküler seviyede ölçümleri her geçen gün daha da gelişme göstermektedir. Bu gelişmeler ekolojik risk değerlendirmelerinde (ERA) potansiyel kullanım alanlarının gelişimi ile de yardımcı olarak desteklemektedir (Bartell 2006). ERA proseslerinde hızlı sonuç veren ve erken uyarı sağlayan biyobelirteçler son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bucheli ve Fent 1995). Biyobelirteçler, toksik maddelerin miktarına bağlı olarak vücut sıvısında, hücrelerde veya dokularda meydana gelen biyokimyasal değişimlerin ölçümleridir (NRC 1987).

Oost ve ark. (2003) balıklarda ERA prosesinde kullanılabilecek biyobelirteçleri biyodönüşüm enzimleri, oksidatif stres parametreleri, biyodönüşüm ürünleri, stres proteinleri, metalotiyoneinler (MT) ve multi ksenobiyotik direnç (MXR), hematolojik parametreler, immünolojik parametreler, üreme ve endokrin parametreleri, nöromusküler parametreler, genotoksik parametreler, fizyolojik parametreler ve morfolojik parametreler şeklinde sınıflandırmıştır. Balıklarda maruz kalınan ksenobiyotiğe bağlı olarak biyodönüşüm enzimleri uyarılmakta ya da inhibe edilmektedir (Bucheli ve Fent 1995). Burada uyarmaktan kastedilen enzimin miktarının artması ya da aktive olması ya da her ikisidir. Biyodönüşüm enzimlerinin büyük çoğunluğu Faz-I ve Faz-II enzimleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ksenobiyotiklerin biyodönüşümü Faz-I,II ve III olmak üzere üç farklı aşamada incelenir. Ksenobiyotik Faz-I’de oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz ile Faz-II’de konjuge olabilecek hale gelir. Faz-III ile de ksenobiyotik katabolize olur (Commandeur ve ark 1995). Yapılan alışmada Bozdoğan sınırları içinde yer alan Kemer barajında ve Fethiye’de beton havuzlarda yapılan kültür balıkçılığında üretilen Gökkuşağı alabalığı numunelerinde Faz-I enzimi EROD aktivitesi, Faz-II enzimleri GST aktivitesi ve redükte GSH miktarı, oksidatif stres parametresi olarak lipid peroksidasyonu ürünü olan

MDA miktarı ve son olarak nöromusküler parametre olan ACHE inhibisyonu olmak üzere toplam beş biyobelirteç ile kirlilik seviyesi değerlendirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada su kalitesi fiziksel ve kimyasal parametreleri, üretim şartları ve mevsimsel değişiklikten kaynaklanan biyolojik etkilene biyomoleküler seviyede beş farklı biyobelirteç ile birlikte değerlendirilmiştir.

Ege bölgesinde Bakır Çayı, Soma Linyitleri ve Zeytinyağı Üretim Tesislerinin faaliyetleri neticesi kirlenmeyle karşı karşıyadır. Gediz Havzası'nda yer alan Gediz nehri, Büyük ve Küçük Menderes nehirleri de belirli oranlarda kirlenmeyle karşı karşıyadır (Akın ve Akın 2007). Büyük Menderes nehrinin su kalitesini değerlendirmek için yapılan bir çalışma da fiziksel (debi, sıcaklık, pH), kimyasal (çözünmüş oksijen, iyonize olmamış amonyak, nitrit, nitrat, alkalinite, toplam sertlik, sülfat), organik (toplam organik madde, BOİ, KOİ), inorganik (kalsiyum, magnezyum, sodyum, bor) ve bakteriyolojik (toplam koliform) parametreler incelenmiş ve çalışma sonucunda Büyük Menderes nehrinde su kalitesinin özellikle Nazilli ve Sarayköy yörelerinde düşük olduğu görülmüştür (Küçük 2007). Yapılan çalışmada Kemer Barajı'nda ve Fethiye'de Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde kullanılan suyun fiziksel parametreleri araştırıldı ve her iki istasyonda da kullanılan suyun fiziksel parametrelerinin genellikle birinci sınıf su kriterlerine uyduğu görülmüştür. Kemer barajı Temmuz döneminde KOİ değeri (35mg O₂/L), her iki istasyonda da Ocak döneminde iletkenlik değerleri (Kemer, 499±5 µS/cm; Fethiye, 589±4 µS/cm) ve Temmuz döneminde her iki istasyonda amonyum azotu değerleri (Kemer: 0,20mg/L; Fethiye 0,21mg/L) ikinci sınıf su özelliği göstermiştir (Çizelge 3.1.). Bu üç parametre dışında tüm parametreler YSKYY (2012)'ye göre alabalık yetiştiriciliğine uygundur ve birinci sınıf su özelliği göstermiştir (Çizelge 3.2a.).

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği için yapılan çalışmalar en uygun sıcaklığın 5°C-20°C arası olduğunu göstermiştir (Molony 2001). Yapılan çalışmada numune alınan Kemer Barajı ve Fethiye Karacaören köyü beton havuz sıcaklıkları bu aralıkta yer almaktadır. En düşük sıcaklık Kemer Barajında 10°C, en yüksek sıcaklık ise yine Kemer Barajında 18°C olarak ölçülmüştür.

Gökkuşığı alabalığı için ideal pH değeri 5 ve üzeridir (EPA 2008). pH 9 ve yukarısı özellikle yumurta ve yavru balıklar için öldürücüdür (Edwards 1978). Yapılan

ölçümlerde numune alınan sularda pH değerleri 8,0-8,7 arasında bulunmuştur. Bu değerler gökkuşağı alabalığı için yüksektir fakat tolere edilebilir sınırlar içindedir.

Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) indirgenebilir maddeler tarafından yükseltgenen toksik organik ve inorganik bileşikler tarafından oluşturulan oksijen ihtiyacını ölçmektedir (Sawyer ve ark 1994). Yaz aylarına doğru balık atıkları ve yem atıkları KOİ değerlerini artırmaktadır (Sınanmış Atasoy ve Şeneş 2004). Su kirliliği kontrol yönetmeliğine göre KOİ değeri 25 mg (O₂/L)'ye kadar olan sular birinci sınıf, KOİ değeri 50 mg (O₂/L)'ye kadar olan sular ikinci sınıf su kaynağı olarak kabul edilmiştir (Doğan ve Saylak 2000). Yapılan çalışmada numune alınan istasyonlarda KOİ 0-35 mg (O₂/L) değerleri arasında bulunmuştur. Sadece Kemer Barajı Temmuz döneminde KOİ değeri 35 mg (O₂/L) ile ikinci sınıf su özelliği göstermiştir.

Alabalık 8 mg/l'nin üzerinde, çizgili levrek 5 mg/l'nin üzerinde, sıcak su balıkları ise 2 mg/l'nin üzerinde çözünmüş oksijene (DO) ihtiyaç duyarlar (Georgia Environmental Protection Division 2001). Yapılan çalışmada numune alınan istasyonlarda çözünmüş oksijen değerleri 10,2-10,49 mg (O₂/L) arasında bulunmuştur. Bu değerler alabalık yetiştiriciliği için gerekli minimum değerden (≥ 5 mg O₂/L) oldukça yüksektir (Molony 2001; Roberts ve Shepherd 1997).

Elektriksel iletkenlik, iyonların derişimine, hareketliliklerine, değerliğine ve sıcaklığa bağlıdır (Durhasan 2006). YSKYY (2012)'ye göre birinci sınıf sularda iletkenlik değerleri 400 μ S/cm'den küçük olmalıdır. Durhasan (2006) yapmış olduğu çalışmada Baraj gölünde elektriksel iletkenlik değerlerini 365-470 μ S/cm arasında, Özdemir ve ark (2007) Bereket Hidroelektrik Santrali Baraj Gölünde elektriksel iletkenlik değerlerini 502-837 μ S/cm arasında bulmuştur. Yapılan çalışmada elektriksel iletkenlik değerleri 50-589 μ S/cm arasında bulunmuştur. Her iki istasyonda da Ocak ayı iletkenlik değerleri ikinci sınıf, Temmuz ayı su değerleri birinci sınıf su kriterlerine uymaktadır (Çizelge 3.2a.)

Bulanıklık balıklarda tüm değerler için kan şekerinde doğrusal artışa ve 3 NTU üzerinde artan öksürmeye sebep olmaktadır (Rowe ve ark 2003). Yapılan çalışmada bulanıklık 0,2-2,5 NTU değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek değer 2,5 NTU ile Kemer barajında Ocak döneminde ölçüldü ve bulanıklık ile doğru orantılı olarak Kemer barajında Ocak döneminde kas dokusunda GSH aktivitesinde dokuz kata varan artış ve

karaciğer dokusunda da yine Ocak döneminde MDA ve GST aktivite seviyelerinde anlamlı artış meydana gelmiştir. Tüm verilerin mevsimlere göre istatistiki değerlendirmesinde hem karaciğer dokusu hem de kas dokusu ortalama GSH seviyesi Ocak ayında Temmuz ayına göre önemli bir artış göstermiştir ($p \leq 0,01$). Yani Ocak ayında GSH seviyesini artıran istatistiksel olarak anlamlı bir kirlilik meydana gelmiştir (Ocak: 2,5 NTU; Temmuz 0,31 NTU, Çizelge 3.1.).

Maruz kalınan kirlilik değerlendirmelerinde ve birçok organik kirliliğin zararlı etkilerinin belirlenmesinde, P4501A (CYP1A) ve mRNA protein seviyesi, P4501A (CYP1A) indüksiyonu ve EROD katalitik aktivitesi erken uyarı göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar EROD aktivitesi ölçümlerinin sadece kimyasal kirliliği belirlemede değil, aynı zamanda biyolojik organizmanın etkilenme seviyesinin belirlenmesinde de öncelikli olarak belirleyici olduğunu göstermiştir (Whyte ve ark 2000; Payne ve ark 1987; Arınç ve ark 2000).

Çok sayıda alan çalışması göstermiştir ki çevresel kirlenmeye maruz kalmış balık türlerinde hepatik P4501A (CYP1A) protein seviyesinde güçlü bir artış meydana gelmektedir. Sadece organotin (kalay bağlı hidrokarbonlar) bileşiklerine maruz kalmış yayın balığı (bullhead), yılan balığı (eel) ve alabalıklarda (rainbow trout) EROD aktivite seviyelerinde önemli oranda düşüş görülmüştür (Oost ve ark 2003). Yapılan 137 laboratuvar çalışmasında % 88 oranında EROD aktivitesinde artış görülmüş, aynı şekilde yapılan 127 alan çalışmasında ise % 88 oranında artış görülmüştür. Yapılan bu çalışmalardan 69'unda yani % 37 oranında Kontrol'ün 5 katına varan oranlarda güçlü artışlar görülmüştür (Oost ve ark 2003). Bazı kimyasallar EROD aktivitesini inhibe etse de bu durum EROD'un biyobelirteç olarak kullanılmasında sorun oluşturmamaktadır (Whyte ve ark 2000).

Gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) iki farklı probiyotik ile (*Bacillus subtilis* ve *Bacilis cereus toyo*) dokuz haftalık diyet uygulanmış ve etkileri probiyotik uygulanmayan diyet balıklarla kıyaslanarak bazı biyobelirteçler ile incelenmiştir. *Bacillus subtilis* uygulanmış karaciğer dokularında EROD aktivitesinde artışın istatistiksel bakımdan önemli olduğu ($p \leq 0,01$), GST aktivitesinde her hangi bir fark olmadığı görülmüştür. *Bacilis cereus toyo* uygulanmış kas dokularında ACHE aktivitesinde artışın

istatistiksel bakımdan önemli olduğu ($p \leq 0,05$), beyin dokusunda ise önemli bir artış olmadığı tespit edilmiştir (Kopecka-Pilarczyk 2013).

İzmir körfezinde 2002 yılında yapılan bir çalışmada dip ve yüzey-dip balık çeşitlerini temsil eden kefal, dil ve isparoz balıklarında EROD aktiviteleri ve buna bağlı olarak körfez kirliliği araştırılmıştır. Körfezin iç ve orta kısımlarında diğer kısımlara göre PAH, PCB ve dioksin seviyelerinin daha yüksek olduğu buna bağlı olarak da kirlilik seviyeleri ile EROD aktivitesi ve CYP1A protein miktarı arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur (Boyuneğmez 2002).

Meksikada şeker endüstrisi kirliliğine maruz kalan Ameca nehrinde Ameca splendens ve Goodea atripinnis balık türlerinde biyobelirteç olarak GGTP, ACHE ve EROD enzimlerinin aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu analiz edilmiştir. Bu balık türlerinde oksidatif stres, lipid peroksidasyon seviyeleri ile gösterilirken; nörotoksik etkiler ACHE aktivitesi ile, detoksifikasyon mekanizmaları ise belirgin bir şekilde gamma-glutamil-transpeptidaz (GGTP) ve EROD ile göstermişlerdir. Erkek balıkların dişilere göre kirlilikten daha çok etkilendiği ve A. Splendens'in, G. Atripinnis'den çevresel şartlara karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür (Tejeda-Vera ve ark 2007).

Çek Cumhuriyetinde Orlice, Chrudimka, Cidlina, Jizera, Vltava, Ohře, Bílina ve Blanice ırmaklarında Leuciscus cephalus L. türü balıklarda cytochrome P450 ve ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) biyobelirteçleri kullanılarak yapılan çalışmada ırmaklar arasında cytochrome P450 bakımından önemli bir fark bulunmamış fakat ırmaklardan alınan balık numunelerinde EROD enzimi bakımından önemli farklar bulunmuştur. PCB, HCB, HCH, OCS, DDT pestisitlerinin kimyasal analizlerinin yapıldığı çalışmada, EROD aktivitesi ile OCS ve PCB pestisitleri arasında ($P < 0.05$) önemli korelasyon bulunmuştur (Havelková ve ark 2007).

Havelkova ve ark (2008) Çek Cumhuriyetinin 12 büyük nehrinin ağızlarına yakın bölgelerde çevresel kirlenme değerlendirilmesinde (ERA) biyokimyasal belirteç olarak CYP450 miktarı ve EROD aktivitesi, belirteç tür olarak da kefal (Leuciscus cephalus L.) kullanılmıştır. CYP450 miktarı ve EROD aktivitesi en yüksek Labe ırmağında yaşayan balıkların karaciğer dokusunda bulunmuştur ($0.32 \pm 0.10 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ protein}$ ve

1061.38±545.51 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹). Sonuçlardan yola çıkarak Labe ve Stratka ırmaklarında kirliliğin olduğu ileri sürülmüştür.

Hoeger ve ark (2004) yapmış oldukları çalışmada 27 gün boyunca %10, %30, %70 oranında belediye atık suyu karışmış su karışımına maruz kalan Gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) hepatik MFO aktivitesini EROD aktivitesi ile ölçmüş ve %10 ve %30 atık suya maruz kalan balıklarda EROD aktivitesinde artış, %70 atık suya maruz kalan balıklarda EROD aktivitesinde inhibisyon tespit etmiştir. Hepatik EROD değerlerini ise 4-12 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ arasında ölçmüştür.

Beliaeff ve Burgeot (1997) yapmış oldukları çalışmada beş farklı balık türünde (üzgün balığı, Pisibalgı, comber, mullet, dil balığı) 82 istasyonda ortalama EROD seviyelerini ölçmüş ve iki farklı ortalama değer arasındaki farkı, belirli güvenilirlik seviyesinde belirlerken, gerekli optimum numune sayısını belirlemeye çalışmışlardır. Üzgün balığı 48 farklı istasyonda çalışılmış, en düşük EROD aktivitesi 8,16±1,06 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹, en yüksek EROD aktivitesi 113,76±2,05 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulunmuş; Pisibalgı 13 farklı istasyonda çalışılmış, en düşük EROD aktivitesi 5,26±1,1 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹, en yüksek EROD aktivitesi 84,72±2,94 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulunmuş; Comber balığı beş farklı istasyonda çalışılmış, en düşük EROD aktivitesi 0,058±1,1 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹, en yüksek EROD aktivitesi 9,66±1,27 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulunmuş; Mullet balığı dokuz farklı istasyonda çalışılmış, en düşük EROD aktivitesi 6,62±1,08 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹, en yüksek EROD aktivitesi 59,02±1,2 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulunmuş; Sole balığı yedi farklı istasyonda çalışılmış, en düşük EROD aktivitesi 20,85±1,14 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹, en yüksek EROD aktivitesi 63,1±1,4 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulunmuştur. Beliaeff ve Burgeot (1997) çalışma sonucunda genel olarak on civarında numunenin alınmasına önem verilmesine rağmen (ICES 1996) bunun önemli olmadığını daha az numune ile de çalışılabileceğini savunmuşlardır.

Koponen ve ark (2003) yapmış oldukları çalışmada güney Finlandiya'da PCB kirliliğine maruz kalmış gölde yetişen Çipura (*Abramis brama*) ve Kocacağız (*Aspius Aspius*) balıklarının kaslarında kimyasal madde birikimi ve hepatik hücrelerde biyotransformasyon monooksijenaz enzim olan EROD aktivitesi araştırılmış, en yüksek EROD aktivitesi çipura'da (*Abramis brama*) ilkbaharda (333±69 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ n=8) ; en düşük EROD aktivitesi ise kocacağız'da (*Aspius Aspius*) sonbaharda (0,8±0

pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ n=3) ölçülmüştür. Bu araştırmadaki değerler ve diğer araştırmalara bakıldığında balıklarda karaciğer EROD değerleri 0,1-2000 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ arasında değişebilmektedir (Ait-Aïssa ve ark (2003); Havelkova ve ark (2008); Hoeger ve ark (2004); Beliaeff ve Burgeot (1997))

Yirmibir gün kadmiyum (Cd, 1.5 µg/L), çinko (Zn, 150 µg/L) ile 3,3',4,4'-tetraklorobifenil (PCB77, 1 mg/kg) ve 17-β-estradiol (E2, 0.5 mg/kg) organik kimyasallarını içeren Cd-Zn karışımına maruz kalan gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) hepatik dokularda meydana gelen biyokimyasal değişimler (EROD ve tGSH) değerlendirilmiştir. Cd, Zn, ve Cd/Zn karışımına maruz kalmış dokularda EROD aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli artışlar görülmüştür [Kontrol; 3,9±2, Cd; 7,7±3,7 (p≤0,05), Zn; 9,4±3,8 (p≤0,01), Cd/Zn; 10,6±5 (p≤0,01) pmol.min⁻¹.mg protein⁻¹]. Benzer şekilde Cd ve Cd/Zn karışımına maruz kalmış dokularda tGSH miktarında [Kontrol; 16,2±4,1, Cd; 27,3±5,8 (p≤0,01), Cd/Zn; 23,3±3,8 (p≤0,01) nmol.mg protein⁻¹] önemli artışlar saptanmıştır. Çinko'ya maruz kalmış balıkların karaciğer dokusunda ise önemli bir değişim görülmemiştir (Ait-Aïssa ve ark 2003).

Yapılan çalışmalar EROD aktivitesi ölçümlerinin sadece kimyasal kirliliği belirlemede değil, aynı zamanda biyolojik organizmanın etkilenme seviyesinin belirlenmesinde de öncelikli olarak belirleyici olduğunu göstermiştir (Whyte ve ark 2000; Payne ve ark 1987; Arınç ve ark 2000). Ait-Aïssa ve ark (2003) yapmış oldukları çalışmada Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) balıklarını 21 gün boyunca Cd ve Zn metalleri ile beraber organik kimyasallar 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77, 1 mg/kg) ve 17-β-estradiol (E2, 0.5 mg/kg) kirliliğine maruz bırakmışlar ve en yüksek hepatik EROD aktivitesini 264,4±44 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ bulmuşlardır (Kontrol; 8,6±4,2 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; n=6-10). Bu sonuçta bize göstermektedirki P4501A (CYP1A)'ya dayalı EROD aktivitesi organik kirliliğe karşı oldukça duyarlıdır. Ayrıca, Ait-Aïssa ve ark'nın (2003) yapmış oldukları çalışmadaki organik kirlilik sonucu elde etmiş oldukları değerler yapılan çalışmada bulunan değerler ile kıyaslandığında Kemer barajı ve Fethiye'de balık çiftliklerinde kullanılan suların organik kirlenmeye maruz kalmadıklarını ya da çok düşük seviyelerde maruz kaldıkları şeklinde değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) en yüksek EROD aktivitesi Fethiye'de Temmuz döneminde kas dokusunda ölçüldü (2,7±0,1 pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; n=30). En düşük EROD aktivitesi ise Kemer barajında Ocak döneminde karaciğer

dokusunda ölçüldü ($1,38 \pm 0,07$ pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; n=26). Çalışmadaki en yüksek değer olan $2,7 \pm 0,1$ pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹ ile Ait-Aïssa ve ark'nın (2003) yapmış olduğu çalışmadaki en yüksek değeri ($10,6 \pm 5$ pmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹) kıyasladığımızda Fethiye veya Kemer barajındaki alabalıkların maruz kalmış olduğu kirliliğin çok düşük boyutlarda olduğunu değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada tüm verilerin mevsimlere göre istatistiki değerlendirmesinde hem karaciğer dokusu hem de kas dokusu ortalama EROD aktivitesi düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p > 0,05$). Tüm verilerin istasyonlara göre istatistiki değerlendirmesinde ortalama EROD aktivitesi seviyelerinde Fethiye'de kas dokusunda Kemer barajına göre istatistiki açıdan önemli bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Bu sonuçlara göre Fethiye'deki beton havuzlar Kemer barajına göre daha fazla kirliliğe maruz kalmıştır.

Organofosfat ve karbamat esterleri tarafından ACHE inaktive edildiğinde sinirsel bağlantı noktalarında ACh konsantrasyonu kirliliğe maruz kalmamış organizmalara göre yüksek kalmaya devam eder (Kopecka ve ark 2004). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki organofosfat (OP) ve karbamat pestisitlerine duyarlı olan ve eskiden beri bilinen asetilkolinesteraz (ACHE) biyobelirteci sadece düşük seviyede kirlenmelerde yanıt vermektedir (Payne ve ark 1996).

Büyük Menderes nehrinin bir kolu olan Çürüksu çayı üzerinde farklı istasyonlardan alınan *Limnodrilus profundicola* türü Oligoket'ler üzerinde yapılan bir çalışma sitozolik kolinesteraz (ChE) karakterizasyonu, asetiltiyokolin (ATC), propiyoniltiyokolin (PTC) ve butiriltiyokolin (BTC) substratları kullanılarak gerçekleştirilmiş; ChE aktivitesi üzerine organofosfat, karbamat ile piretroid insektisitlerin etkisi incelenmiş ve insektisitlerin enzim aktivitelerini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca farklı istasyonlardan toplanan *L. profundicola* bireylerinde ACHE aktiviteleri ölçülmüş ve önemli farklılıklar bulunmuştur. Bununla birlikte Sitokrom P4501A1 (CYP1A1) indüksiyonunu anlamak için EROD aktivitesi, 7-etoksi rezorufin substratı kullanılarak ölçülmüş ve sonuç olarak kirli ve temiz sularda yasayabilen kozmopolit bir tür olan *L. profundicola*'nın geniş çeşitlilikteki çevresel koşullara adaptasyonu ile kirlilik ve ekotoksikoloji çalışmalarında biyobelirteç organizma olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Özdemir 2006).

Gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) iki farklı probiyotik ile (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* toyo) dokuz haftalık diyet uygulanarak probiyotiklerin etkileri

probiyotik uygulanmayan diyet balıklarla kıyaslanarak bazı biyobelirteçler ile incelenmiş ve kas dokusunda iki farklı probiyotik için ACHE aktivitesi $143,06 \pm 25,98 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$, $180,01 \pm 21,66 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ değerleri elde edilmiştir (kontrol: $131,81 \pm 29,70 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$).

Polonya açıklarında Gulf of Gdańsk bölgesinden (4 istasyon) ve Litvanya açıklarında Klaipėda bölgesinden (3 istasyon), 2001 (haziran ve ekim) ve 2002 (nisan ve ekim) yıllarında toplanan mavi midyelerin solungaçlarında ve pisi balığı kas dokularında ACHE aktivitesi tayini yapılmış, mavi midye solungaçlarında $15\text{--}38 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ arası ve pisibalığı kas dokusunda $94\text{--}315 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ arası değerler bulunmuştur. Çalışma periyodunda Kasım 2001’de Litvanya açıklarında bir petrol tankeri kazası meydana gelmiş ve bu bölgede yapılan ACHE aktivitesi ölçümlerinin zamanla azaldığı fakat temizleme çalışmalarından sonra artma eğilimi gösterdiği görülmüştür. Mavi midye solungaçlarında en düşük değerler lağım karışımından dolayı kirli olarak kabul edilen Mechelinki GG1 istasyonunda bulunmuş ($15\text{--}20 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$), en yüksek değerler ise çevresel bakımdan temiz bir bölge olan Sopot (GG3) istasyonunda bulunmuştur ($38 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$). ACHE aktivitesi Gulf of Gdańsk bölgesinde $105\text{--}187 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$, Klaipėda bölgesinde ise $65\text{--}380 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ aralığında bulunmuştur. Klaipėda bölgesinde düşük ACHE seviyelerinin sebebi düşük su sıcaklığı veya yüksek kirlilik seviyesine bağlanmıştır (Kopecka ve ark 2004).

Meksika’da bulunan Ignacio Ramirez barajı çevresinde zararlıların kontrolü için tarımsal alanlarda çok yaygın bir şekilde malatyon (malathion-MA) kullanılmaktadır. Kirliliğin bu barajda yaşayan yavru gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*), kirliliğe maruz kalma süresine göre etkisini araştırmak amacıyla lipid peroksidasyon seviyesi (MDA) ve asetilkolinesteraz aktivitesi (ACHE) araştırılmıştır. MDA seviyesinde kontrol grubuna göre (MA kirliliğine maruz kalma süresinin artışına bağlı olarak) %78.91, %85.97, %91.95, %92.28, %94.3 ($P < 0.05$) oranlarında artma ve ACHE aktivitesinde kontrol grubuna göre % 93,80 ($P < 0.05$) oranında azalmaya sebep olduğu görülmüştür (Martinez-Tabche ve ark 2002).

Yapılan çalışmada Fethiye’de karaciğer dokusunda ($104 \pm 8,3 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; $n=50$), Kemer barajına göre ($180 \pm 14 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; $n=42$) anlamlı azalma meydana gelmiştir ($p \leq 0,001$). Bu sonuçlara göre Fethiye kirlilikten daha fazla

etkilenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada tüm ACHE aktivitesi verilerinin mevsimsel ortalama değerleri, hem karaciğer dokusunda (Ocak: $162,61 \pm 11,3$ nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; Temmuz $114,36 \pm 12,5$ nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; p=0,005) hem de kas dokusunda (Ocak: $144,8 \pm 8,2$ nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; Temmuz: $94,3 \pm 6,1$ nmol.dak⁻¹.mg protein⁻¹; p=0,000) Temmuz ayında anlamlı azalma göstermiştir. Temmuz ayında anlamlı mevsimsel azalmanın amonyaktan kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Suyun sıcaklığı ve pH'sı arttıkça toksik NH₃ (iyonlaşmamış amonyum) miktarında 100 kata kadar artabilmektedir (pH 6,5'den 8,5'e artınca) (Durborow ve ark 1992). Amonyak seviyesinin 0,02 mg/L olması bile alabalıklar için toksiktir. (Stickney 1991; SKKY 1991) Amonyak seviyesi 0,0125 mg/L üzerinde toksik, 1,8 mg/L üzerinde ise öldürücüdür. (Sedgwick 1985) Yapılan çalışmada amonyum azotu miktarları 0,03-0,21 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. Temmuz değerlerinin Ocak değerlerinden çok daha yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek değer 0,21 mg/L ile Fethiye Karacaören köyü beton havuzunda Temmuz ayında görülmüştür. Yapılan çalışmada Fethiye'de beton havuzlarda yetiştirilen alabalıklarda hem kas hem de karaciğer dokusunda Temmuz döneminde istatistiki açıdan anlamlı bir ACHE inhibisyonu meydana gelmiştir (p≤0,05). Tüm verilerin mevsimlere göre istatistiki değerlendirilmesinde ortalama ACHE aktivite seviyelerinde Temmuz döneminde hem kas (% 34,87) hem de karaciğer (% 29,6) dokusunda istatistiki açıdan önemli azalma olduğu görüldü. Su analizi fiziksel değerlendirme parametrelerine bakıldığında Temmuz döneminde her iki istasyonda da amonyum azotu değerleri Ocak ayına oranla çok daha yüksektir. Dolayısıyla suyun amonyum azotu seviyesi ile ACHE inhibisyonu arasında bir ilişkinin olabileceği değerlendirilmiştir. Dolayısıyla hem Fethiyede ki hem de Kemer barajında ki ACHE inhibisyonunun büyük olasılıkla amonyak miktarındaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücrel GSH derişimi toksik bileşiklerin detoksifikasyonu, protein yetersizliği, oksidatif stres ve birçok patolojik durumda %15-20 oranında azaldığında hücrelerin toksik etkilere karşı savunması zayıflamakta hücre hasarı ve ölümüne yol açabilmektedir. Bununla birlikte adaptasyon mekanizmalarının etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere GSH miktarı artmaktadır (Bekmezci 2010). BKME, PAH, PCB ve HCB'ye maruz kalmış balıklarda GSH seviyesinde artış görülmüştür (Oost ve ark 2003).

Farklı balık türlerinde yapılan toplam 10 laboratuvar çalışması ile 17 alan çalışması Oost ve ark (2003) tarafından özetlenmiş ve laboratuvar çalışmalarının % 60'ında, alan çalışmalarının % 35'inde GSH seviyelerinde artış görülmüştür.

Aşağı Seyhan Ovası drenaj kanallarında seçilen beş istasyonda su kalitesi, dokuda metal birikimleri ve kirleticilerin *Clarias gariepinus*'da karaciğer, kas ve beyin dokularında GSH, oksidatif stres ve nörotoksisite oluşturma potansiyelleri ile biyometrik özelliklerine etkileri incelenmiş; Fe, Cu, Zn, Co, Cr ve Cd'un en fazla karaciğerde biriktiği, Pb'un beyin>karaciğer>kas olacak şekilde biriktiği görülmüştür. *C. gariepinus*'da karaciğer, kas ve beyin dokularında yapılan çalışmalarda tüm istasyonlarda balıkların kirliliğe karşı çeşitli adaptasyonlar geliştirdiği ve *C. gariepinus*'un kirliliğe karşı dayanıklı bir tür olduğunu görülmüştür (Bekmezci 2010).

Havelkova ve ark (2008) Çek Cumhuriyetinin 12 büyük nehrinin ağızlarına yakın bölgelerde çevresel kirlenme değerlendirilmesinde (ERA) biyokimyasal belirteç olarak karaciğer GSH miktarını kullanmış ve en yüksek GSH seviyesini Otavada (4.29 ± 2.10 nmol.mg⁻¹ protein), en düşük GSH seviyesini ise Berounkada (1.23 ± 0.73 nmol.mg⁻¹ protein) ölçmüşlerdir.

Mişe Yonar ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada formaldehitin Gökkuşluğu alabalığında bazı hematolojik ve antioksidan parametrelere etkisini araştırmış ve 4 gün boyunca 120 ppm formaldehit uyguladığı alabalıklarda en yüksek GSH seviyesini karaciğer dokusunda $120,05 \pm 22,01$ nmol.mg protein⁻¹ bulmuştur (Kontrol; $71,16 \pm 16,58$ nmol.mg protein⁻¹). Yapılan çalışmada en düşük ortalama GSH seviyesi Temmuz ayında Kemer barajında kas dokusunda ($10,7 \pm 2,2$ nmol.mg protein⁻¹), en yüksek GSH seviyesi ise Ocak ayında yine Kemer barajında kas dokusunda ($160,5 \pm 22,7$ nmol.mg protein⁻¹), bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmada en yüksek karaciğer GSH seviyesi Fethiye'de Ocak ayında $119 \pm 11,5$ nmol.mg protein⁻¹ ölçülmüştür. Bu sonuç Fethiye'nin Ocak ayında Temmuz ayına göre kirliliğe maruz kaldığını göstermektedir. Bu sonuca paralel olarak EROD ve GST aktivitelerinde de Fethiye'de Ocak ayında istatistiki açıdan anlamlı bir artış vardır. Kemer barajında Ocak ayında karaciğer dokusunda Temmuz ayına göre artış olmasına rağmen istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($P > 0,05$). Tüm verilerin istasyonlara göre istatistiki değerlendirmesi sonucunda Kemer barajında kas dokusunda Fethiye'ye göre önemli bir artış görülmüştür ($p < 0,01$). Bunun sebebi Ocak ayında

bulanıklık artışına bağlı olarak GSH seviyelerinde ölçülen çok yüksek değerlerdir. Fethiye de Ocak döneminde Temmuz dönemine göre EROD, GSH ve GST değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı artış meydana gelmiştir. Üç parametrede aynı anda artışın meydana gelmesi Fethiye’de Ocak ayında Temmuz ayına göre daha fazla kirliliğin meydana geldiğini göstermektedir.

Oksidatif stres parametreleri, bazı kirleticilerle toksik etkisi hücrelerde enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA’nın zarar görmesi ve apoptozis gibi sonuçlar doğuran oksidatif stress’e sebep olmaktadır (Boyuneğmez 2002). Serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve dokular üzerinde oluşturduğu hasarın şiddetinin derecesi malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi ile ölçülebilir. MDA, lipid peroksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir belirteci değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle doğru orantılı ilişki göstermektedir (Akkuş 1995).

Lipit peroksidasyonu antioksidan enzimler ile birlikte kirleticiler tarafından tetiklenmiş oksidatif stresin biyobelirteci olarak kullanılırken, Glutasyon (GSH) düzeyi ve GSH’a bağlı enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler ksenobiyotiklerin bazı türler üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Balıkların oksidatif strese karşı toksisiteye karşı mekanizmaları benzer olduğundan oksidatif stres çalışmalarında referans model olarak kullanılmaktadır (Bekmezci 2010).

Yapılan çalışmada Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan gökkuşağı alabalığı numunelerinde kas ve karaciğer dokularında oksidatif stres parametresi olan lipid peroksidasyonu belirteci malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Fethiye’de karaciğer dokusunda Temmuz ayında Ocak ayına göre istatistiki açıdan anlamlı artış görülürken, kas dokusunda Ocak ayında Temmuz ayına göre istatistiki açıdan anlamlı artış görüldü ($P \leq 0,05$). Karaciğer dokusunda Temmuz ayında GSH düzeyi çok düşük olduğundan ($13,4 \pm 1,7$ nmol.mg protein-1) MDA düzeyinde artış meydana geldiği düşünülmektedir. Kemer barajında ise karaciğer dokusunda Ocak ayında Temmuz ayına göre bulanıklık miktarında artışa paralel olarak MDA seviyesinde ve GST aktivitesinde önemli bir artış meydana gelmiş olabileceği değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

Keleştemur ve ark (2010) yapmış oldukları çalışmada Keban Alabalık Ltd. Şirketinden temin edilen yavru gökkuşağı alabalıklarını Keban Barajı Su Ürünleri Şube

Müdürlüğü Üretim Tesisine taşıma işleminin gökkuşağı alabalığı yavrularının kan, kas, karaciğer ve böbrek dokularında malondialdehit (MDA) oluşum düzeylerine etkisi araştırılmış, nakilden hemen sonra (t=0) ve 6 saat sonra (t=6) kan, kas, karaciğer ve böbrek dokularında MDA düzeylerinde artış tespit edilmiştir. 12 saat sonra (t=12) MDA düzeyleri kontrol grubuna yakın değerlere düşmüş; en yüksek değer kas dokusunda $6,26 \pm 0,37$ nmol.mg doku⁻¹ (kontrol: $2,46 \pm 0,33$ nmol.mg doku⁻¹) bulunmuştur. Araştırmacılar balığın yaşam ortamında fiziksel parametrelerdeki değişikliğin de balıklarda strese sebep olduğunu ileri sürmüştür. Yapılan çalışmada Kemer barajında Ocak ayında kas GSH, karaciğer MDA ve GST değerlerindeki değişikliğin bulanıklıktaki ani değişiklikten kaynaklandığını söylemek mümkündür. En yüksek MDA düzeyi kas dokusunda Ocak ayında Fethiye’de ($19,5 \pm 3,3$ nmol.mg doku⁻¹) bulunmuştur. Fethiye de üretilen balıkların kas dokularının oksidatif stresten en fazla Ocak ayında etkilendiği kanısına varılabilir. Keleştemur ve ark. (2010) karaciğer dokusunda en yüksek değeri $4,12 \pm 0,56$ nmol.mg doku⁻¹ (kontrol: $1,65 \pm 0,32$ nmol.mg doku⁻¹) bulmuştur. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise kas dokusunda en yüksek değer Temmuz ayında yine Fethiye’de ($16,4 \pm 3,1$ nmol.mg doku⁻¹) bulunmuştur. Bu değer oldukça yüksek bir değer olduğundan Fethiye’deki alabalıkların Temmuz ayında fazla miktarda oksidatif strese maruz kaldığı, kas dokusunun karaciğerden daha fazla etkilendiği şeklinde değerlendirilmiştir.

Tüm verilerin istasyonlara göre istatistiki değerlendirmesinde ortalama karaciğer dokusu MDA seviyelerinde Kemer barajında ($7,85 \pm 1,1$ nmol.mg doku⁻¹) Fethiye’ye göre ($12,61 \pm 1,7$ nmol.mg doku⁻¹) istatistiki açıdan önemli bir düşüş olduğu görüldü ($p < 0,05$). Aynı şekilde Kemer barajında kas dokusunda da MDA düzeyinde Fethiye’ye göre % 24 oranında düşüş görülmüştür ama bu düşüş istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$). MDA ile aynı şekilde karaciğer dokusunda Kemer barajında GST aktivitesinde istatistiki açıdan anlamlı azalma, ACHE aktivitesinde ise artış meydana gelmiş, kas dokusunda ise EROD aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Sonuç olarak Fethiye’deki beton havuzların, Kemer barajına göre daha fazla kirliliğe maruz kaldığı kanısına varılabilir.

Tüm verilerin mevsimlere göre istatistiki değerlendirmesinde ortalama MDA seviyelerinde Ocak döneminde Temmuz dönemine göre kas dokusundaki artışın istatistiki açıdan önemli olduğu görüldü ($p < 0,001$). Ocak döneminde MDA düzeylerinin daha yüksek olmasının Ocak ayında oksidatif strese sebebiyet veren sedimentasyona bağlı kirlenmeden

ve sıcaklıktaki düşüşten kaynaklanabileceği kanısına varılabilir. Benzer sonuçlar GSH ve GST analizleri için de geçerlidir. Karaciğer dokusunda hem GST indüksiyonunda hem de GSH miktarında Ocak ayında istatistiki açıdan önemli artış bulunmuştur ($p<0,01$). Kas dokusunda ise Ocak ayında sadece GSH miktarında MDA'ya paralel olarak istatistiki açıdan önemli bir artış görülmüştür.

GST enzimleri yapılarında spesifik olmayan bir substrat bağlama bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenziminin bulunmasından dolayı karsinogenik bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçlar ve diğer birçok farklı bileşiğin konjugasyonunu katalizleyebilmektedirler (Cnubben ve ark 2001). Karaciğer sitozolik proteinlerin %10'luk bir kısmını GST enzimleri temsil etmektedir (Leblanc 1994).

Slatinska ve ark. (2008) "Balıklarda sulu ortamlarda kirlenmenin biyokimyasal belirteçleri ve GST enzimi." konulu inceleme makalesinde zaman zaman laboratuvar sonuçları ile alan çalışmalarında elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlı sonuçlar vermediğini söylemişlerdir. Bu tutarsızlığın doğal ortamdaki balıkların maruz kalmış oldukları kimyasalların sürekli değişkenliğe uğramasından kaynaklandığını belirtmişler ve sulu ortamlarda en son yapılan çevresel kirlilik değerlendirmelerinde klasik kimyasal madde analizleri ile beraber birden çok biyokimyasal belirteç kombinasyonunun kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Bazı çalışmalarda PAH, PCB, OCP ve PCDD kirlenmesine maruz kalmış balıklarda GST aktivisinde artış görülmesine rağmen yapılan çoğu çalışmada önemli bir değişim gözlenmemiştir. PCDD, pestisit veya PAH kirlenmesine maruz kalmış gökkuşağı alabalığı, levrek, çipura ve güneş balığında GST aktivitesinde önemli miktarda azalma görülmüştür. Farklı balık türlerinde 43 laboratuvar çalışmasının sadece % 33 oranında GST aktivitesinde artış meydana gelmiştir. Sonuç olarak kimyasal kirlenmeye maruz kalmış balıklarda GST aktivitesinde indüklenme karışık sonuçlar vermektedir ERA proseslerinde biyobelirteç olarak kullanılması uygulanabilir değildir (Oost ve ark 2003).

Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) iki farklı probiyotik ile (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* toyo) dokuz haftalık diyet uygulanmış ve etkileri probiyotik uygulanmayan diyet balıklarıyla kıyaslanarak bazı biyobelirteçler ile incelenmiştir. Karaciğer dokularında GST aktivitesinde her iki probiyotik diyetinden kaynaklanan

istatistiksel bakımdan önemli bir artış görülmemiştir. En yüksek GST aktivitesi $115,80 \pm 15,75 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ bulunmuştur (kontrol: $107,7 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$) (Kopecka-Pilarczyk 2013).

Yetişkin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer tümörlerinde aflatoxin B₁'in Faz-I ve Faz-II enzimlerine etkisi biyokimyasal ve histokimyasal olarak incelenmiş, GST aktivitesinin arttığı (kontrol, $277,7 \pm 40,2 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; kanserli hücre, $384,2 \pm 28 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) fakat EROD aktivitesinin azaldığı (kontrol, $35 \pm 2 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protein}$; kanserli karaciğer hücresi, $9 \pm 4 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protein}$) görülmüştür. (Parker ve ark 1993)

Yapılan çalışmada Fethiye ve Kemer barajı istasyonlarından Ocak ve Temmuz dönemlerinde alınan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) numunelerinde kas ve karaciğer dokularında GST aktivitesi ölçüldü. Kemer barajında kas dokusunda Temmuz ayında Ocak ayına göre GST aktivitesinde istatistiki açıdan anlamlı artış, karaciğer dokusunda ise istatistiki açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Karaciğer dokusundaki anlamlı azalma GSH ile paralel bir azalmadır fakat kas dokusundaki anlamlı artış GSH ile ters orantılı bir artıştır. Temmuz ayında kemer barajında kas dokusunda GSH miktarı %93,3 oranında azalırken GST aktivitesi %51,5 oranında artmıştır. Fethiye'de yetiştirilen balıklarda da Temmuz ayında karaciğer dokusunda Ocak ayına göre GST aktivitesinde istatistiki açıdan anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($P < 0,05$). Aynı şekilde Temmuz ayında EROD aktivitesinde ve GSH miktarında da azalma meydana gelmiştir. Daha önce belirttiğimiz gibi bunun sebebi Fethiyede beton havuzlarda yetiştirilen alabalıklarda Temmuz ayında daha az kirlilik meydana gelmiş olmasıdır. Aynı dönemde GSH miktarında aşırı azalmadan dolayı lipid peroksidasyonu artmış ve MDA seviyesi yükselmiştir. Ayrıca Temmuz ayında iyonize olmayan NH₃ miktarında artışa bağlı olarak ACHE inhibisyonu meydana gelmiştir.

Çek Cumhuriyetinin 12 büyük nehrinin ağızlarına yakın bölgelerde çevresel kirlenme değerlendirilmesinde (ERA) belirteç tür olarak kefal (*Leuciscus cephalus* L.) kullanılmıştır. GST katalitik aktivitesi ve total GSH miktarı en yüksek Otava ırmağındaki balıklarda bulunmuştur. (GST; $35.39 \pm 13.35 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ protein}$ ve GSH; $4.29 \pm 2.10 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) (Havelkova ve ark 2008) Yapılan çalışmada en düşük GST aktivitesi Fethiye'de Temmuz ayında kas dokusunda ölçülmüştür ($4,5 \pm 0,1 \text{ nmol.dak}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$).

En yüksek GST aktivitesi değeri ise yine Fethiye’de Ocak döneminde karaciğer dokusunda ölçülmüştür. Karaciğer GST aktivitesi diğer çalışmalarla kıyaslandığında düşük seviyede olduğu ve kirliliğinde buna bağlı olarak düşük seviyede gerçekleştiği düşünülmektedir.

Tüm verilerin mevsimlere göre istatistiki değerlendirmesinde ortalama GST aktivitesinde karaciğer dokusunda Temmuz döneminde Ocak dönemine göre azalmanın istatistiki açıdan önemli olduğu görüldü. ($p<0,05$) Ocak döneminde GST aktivitesinin daha yüksek olması Ocak ayında kirlenmenin daha fazla olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar karaciğer GSH seviyesinde ve kas dokusu MDA seviyesinde de görülmektedir. Kas dokusunda GST aktivitesinde mevsimsel bir değişiklik meydana gelmemiştir.

Tüm verilerin istasyonlara göre istatistiki değerlendirmesinde ortalama karaciğer dokusu GST aktivitesinde Kemer barajında Fethiye’ye göre anlamlı bir düşüş olduğu görüldü ($p<0,05$). Aynı şekilde Kemer barajında karaciğer dokusunda da MDA düzeyinde Fethiye’ye göre istatistiki olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Karaciğer dokusunda Kemer barajında Fethiye’ye göre ACHE aktivitesinde artış meydana gelmiştir. İstasyonlara göre kirlilik değerlendirmesinde GST aktivitesi, ACHE aktivitesi ve MDA düzeyi sonuçlarına göre Fethiye’nin Kemer barajına göre daha fazla kirliliğe maruz kaldığı değerlendirilmiştir.

5. SONUÇ

Kemer barajında ve Fethiyedeki beton havuzlarda üretilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hem su kalitesi, kirlenme vb. üretim şartlarından hem de mevsimsel farklılıklardan kaynaklanabilecek kirlilikler beş farklı biyobelirteç ile değerlendirildi. Su kalitesi açısından bakıldığında her iki çiftlikte de kültür balıkçılığında kullanılan suyun genellikle birinci kalite su kriterlerine uyduğu ancak Kemer Barajı Temmuz döneminde KOİ değeri, her iki istasyonda da Ocak döneminde iletkenlik değerleri ve Temmuz döneminde her iki istasyonda amonyum azotu değerlerinin ikinci sınıf su özelliği gösterdiği görüldü. Bu üç parametre dışında tüm parametreler alabalık yetiştiriciliğine uygun olduğu görüldü.

Kas dokusunda GSH, MDA seviyesinde ve karaciğer dokusunda indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı ile GST aktivitesinde Temmuz ayında anlamlı bir azalma meydana geldiğinden Temmuz ayında kirliliğin Ocak ayına göre daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Kas dokusunda EROD seviyesinde ve karaciğer dokusunda GST aktivitesi ile MDA seviyesinde Kemer barajında Fethiye'ye göre anlamlı azalma meydana gelmiş, ACHE aktivitesinde ise anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara göre de Kemer barajında kirliliğin Fethiye'ye göre düşük seviyede olduğu belirlendi.

Yapmış olduğumuz çalışmada Kemer barajında bulanıklık miktarında Ocak ayında Temmuz ayına göre aşırı artış meydana gelmiş ve bulanıklıktaki artışa paralel olarak kas dokusunda GSH seviyesinde Ocak ayında Temmuz ayına göre dokuz kata varan artış meydana gelmiştir. Karaciğer dokusunda ise bulanıklık artışına paralel olarak MDA seviyesinde ve GST aktivitesinde anlamlı artış meydana gelmiştir. Yani bulanıklık balıklarda oksidatif strese sebep olmuştur.

Çalışmada karşılaştığımız bir diğer ilginç sonuç ise amonyum azotu miktarının artışına paralel olarak ACHE inhibisyonunun artmasıdır. Amonyum azotu artışına paralel

olarak tüm verilerin istatistiki değerlendirmesinde hem kas, hem de karaciğer dokusunda Temmuz ayında Ocak ayına göre ACHE aktivitesinde anlamlı azalma meydana gelmiştir.

Çalışmada karşılaştığımız bir diğer sonuç ise GST aktivitesinin Kemer barajında kas dokusunda mevsimsel değişim sonuçlarının diğer parametreler ile tutarsız olmasıdır. Diğer çalışmalarda olduğu gibi GST alan çalışmalarda tek başına tutarsız sonuçlar verebilmektedir. Bundan dolayı saha çalışmalarında farklı dönemlerde farklı kimyasal kirliliğe maruz kalınmış olması ihtimalinden dolayı biyobelirteç olarak bir parametre değil birçok biyobelirteç parametresi kirlilik değerlendirmelerinde kullanılmalıdır.

Bulmuş olduğumuz verileri ortalama değerlerini diğer çalışmalar ile karşılaştırdığımızda MDA seviyesi diğer çalışmalardan biraz yüksek olduğu görüldü. Bu da bulanıklığın ve amonyak seviyesinin balıklarda strese sebep olduğunu düşündürmektedir. EROD ve GST aktivitesinin ise düşük seviyelerde olması ise her iki istasyonda da önemli miktarda organik kirliliğin olmadığını göstermektedir. GSH seviyesi ve ACHE aktivitesi ise diğer çalışmalar ile yaklaşık aynı seviyelerde ölçülmüştür.

Kemer barajındaki balıkların kas dokusunda GST ve EROD aktivitesinde Temmuz dönemindeki anlamlı artış Kemer barajının kirliliğe Temmuz ayında Ocak ayına göre daha fazla maruz kaldığını göstermektedir. Fethiye'deki beton havuzlarda yetiştirilen havuzlarda ise kas dokusunda MDA seviyesinde, karaciğer dokusunda ise EROD ile GST aktivitesinde ve GSH miktarında Ocak ayında anlamlı artış meydana gelmesi Ocak ayında kirliliğe daha fazla maruz kalındığını göstermektedir.

ÖZET

Kültür Balıklarında Biyobelirteçler ile Kirliliğin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada Kemer Barajı ve Fethiye’de balık çiftliklerinde maruz kalınan kirliliğin değerlendirilmesi amacı ile gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer ve kas dokularında beş farklı biyobelirteç ölçümü yapılmıştır. Mevsimsel değişiklikleri değerlendirmek üzere Bozdoğan sınırlarında yer alan Kemer Barajındaki ağ kafeslerde ve Fethiye’deki beton kafeslerde balık çiftçiliği ile üretilen alabalıklardan Ocak ve Temmuz aylarında numuneler alınmış; Faz-I enzimi olarak EROD aktivitesi, Faz-II enzimleri GST aktivitesi ve GSH, oksidatif stres parametresi olarak lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı ve nöromusküler parametre olan ACHE inhibisyonu biyobelirteç olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda alabalık çiftliklerinden alınan su numunelerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri de ölçülmüş ve beş biyobelirteç ile beraber değerlendirilmiştir. Balıkların yetiştirildiği sudan alınan numunelerin kimyasal oksijen ihtiyacı, amonyum azotu ve iletkenlik değerleri dışında diğer değerlerin genellikle birinci sınıf su limit değerlerinin altında olduğu görülmüştür.

Tüm verilerin değerlendirilmesi sonucunda Fethiye’deki beton havuzlarda EROD indüksiyonu, GST aktivitesinde, MDA seviyesinde ve ACHE inhibisyonunda Kemer Barajına göre anlamlı artış tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Ayrıca tüm verilerin mevsimlere göre değerlendirilmesi sonucunda GSH, MDA seviyesinde ve GST aktivitesinde Ocak ayında anlamlı artış meydana geldiği görülmüştür ($p \leq 0,05$). İstasyonlar ayrı ayrı mevsimlere göre değerlendirildiğinde ise Kemer barajının Temmuz ayında; Fethiye’deki beton havuzların ise Ocak ayında daha fazla kirliliğe maruz kaldığı görülmüştür. Her iki istasyonda da Temmuz döneminde amonyum azotu artışına paralel olarak anlamlı ACHE inhibisyonunun gerçekleştiği tespit edildi ($p \leq 0,05$). Aynı şekilde Kemer barajında bulanıklık artışına paralel olarak oksidatif stres parametreleri GSH, MDA seviyesi ve GST aktivitesinde anlamlı artış tespit edildi ($p \leq 0,05$).

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı Alabalığı, GSH, GST, MDA, ACHE, EROD.

SUMMARY

Assessment of Pollution with Biomarkers in Fish Culture

In this study five different biomarkers were measured in liver and muscle tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to assess exposure level of trout farms to pollutants in Kemer Dam and Fethiye. Samples which produced by fish farming were collected in January and July from cages in Kemer Dam located in Bozdoğan limits and concrete cages in Fethiye, to assess seasonal variations. EROD induction as a Phase-I enzyme, GST activity and reduced GSH as Phase II enzymes, malondialdehyt (MDA) product of lipid peroxidation as an oxidative stress parameter and ACHE inhibition as a neuromuscular parameter were measured as biomarkers. Also physical and chemical properties of water samples collected from trout farms were measured and results assessed within these five biomarkers. Generally phsical and chemical properties of water samples were lower than first class water limit values instead of chemical oxygen demand, ammonium nitrogen and conductivity.

As a result of assessment of all datas, significant increases were detected in EROD induction, GST activity, MDA level and ACHE inhibition in concrete cages in Fethiye when compared with Kemer Dam ($p \leq 0,05$). Seasonal alteration assesment of all datas resulted as a significant increase in GSH, MDA level and GST activity. Also when all datas were analyzed according to seasonal alterations of two sites respectively, in case results adduced that Kemer Dam exposed to pollution on july more than January; concrete cages in Fethiye exposed to pollution on January more than July. A significant increase of ACHE inhibition on July according to increase of ammonium nitrogen level were detected in both two sites ($p \leq 0,05$). Otherwise according to significant increase of turbidity, a significant increase detected in oxidative stress parameters GSH, MDA level and GST activity in Kemer Dam ($p \leq 0,05$).

Keywords: Rainbow Trout, GSH, GST, MDA, ACHE, EROD.

KAYNAKLAR

Addison RF. The use of biological effects monitoring in studies of marine pollution. *Environmental Reviews* 1996;4:225-237.

Ait-Aïssa S, Ausseil O, Palluel O, Vindimian E, Garnier-Laplace J, Porcher JM. Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, pcb77 and 17- β -estradiol. *Biomarkers* 2003;8(6):491-508.

Akın M. Akın G. Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği. *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi* 2007;47(2):105-118.

Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Birinci Baskı. Mimoza Yayınları; 1995. p. 3-95.

Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *The Journal of the Faculty of Medicine* 1995;48:253-262.

Arınc E, Şen A, Bozcaarmutlu A. Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure and Applied Chemistry* 2000;72:985-994.

Arinc E, Şen A. In vivo effects of anesthetic benzocaine, on liver microsomal cytochrome p450 and mixed-function oxidase activities of gilthead seabream (*Srarus aurata*) *Comparative Biochemistry and Physiology* 1994;107(C):399-404.

Oğuzhan P, Atamanalp M. Su kirliliğinin balıklarda üreme üzerine etkileri. Erzincan Üniversitesi aquaclub su ürünleri araştırma ve geliştirme bilim kulübü Kemaliye 5.geleneksel su ürünleri bilimsel ve kültürel platformu (ulusal). 31 mayıs-1 haziran 2008, Erzincan, Kemaliye.

Bae W, Mehra RK. Metal-Binding characteristics of a phytochelatin analog (Glu-Cys) 2Gly. Elsevier Science; 1997. p.201-210.

Bard SM. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 2000;48:357-389.

Bartell SM. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk assessment, a brief review and evaluation. Environmental Bioindicators 2006;1:60-73.

Bascietto J, Hinckley D, Plafkin J, Slimak M. Ecotoxicity and ecological risk assessment; Regulatory applications at EPA. Environmental Science and Technology 1990;24:10-15.

Bayşu N, Bayşu N. Biyokimya. 2008.p.3-6.

Bekmezci HD. Aşağı Seyhan Ovası drenaj sistemlerindeki kirlilik etmenlerinin clarias gariepinus'da toksik etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye, 2010.

Beliaeff B, Burgeot T. Sampling design optimization for EROD measurements in fish. Marine Ecology Progress Series 1997; 153:239-246.

Beutler E, Dubon O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. Journal of Laboratory Clinical Medicine 1963;61:882-888.

Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS. Induction of drug metabolism enzymes by xenobiotics. Xenobiotica 1990; 20(11):1101-1111.

Boyuneğmez T. Biochemical monitoring of toxic and carcinogenic organic pollutants along the İzmir bay after the great canal project and possible health effects. A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the Middle East Technical University, Ankara, Turkey. 2002.

Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 1995;25:201-268.

Burke M, Mayer R. Ethoxyresorufin: direct fluometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene, *Drug Metabolism and Disposition* 1974;2:583-588.

Canlı M, Ay Ö, Kalay M. Levels of heavy metals (Cd, Pb, Cu, Cr and Ni) in tissue of cyprinus carpio, barbus capito and chondrostoma regium from the Seyhan river. *Turkish Journal of Zoology* 1998;22:149-157.

Castell JV, Donato MT, Gomez MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung, the in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2005;57:189-204.

Cicik B. Bakır ve çinko etkileşiminin sazan (cyprinus carpio)'ın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri. *Ekoloji Çevre Dergisi* 2003;12(48):32-36.

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden JV, Bladeren PJV. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2001;10:141-152.

Commandeur JNM, Stijntjes GJ, Vermeulen NPE. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacological Reviews* 1995;47:271-330.

Çınar K. Subkronik akrilamid toksisitesi oluşturulan ratlarda kayısının, karaciğer dokusu glutatyon S-transferaz-pi (Gst-P) gen ekspresyonuna, Gst, Gsh-Px, Gsh ve MDA düzeylerine etkisinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye. 2010.

Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1995;2(3):11-17.

Depledge MH, Fossi MC. The Role Of Biomarkers In Environmental Assessment (2). Ecotoxicology 1994;3:161-172.

Doğan M, Saylak M. Su Kimyası. Erciyes Üniversitesi Yayınları No:120; 2000.p.132-150.

Donohue MJ. The detoxification system Part II: Hepatic biotransformation, <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Mark+J++Donohue>. Erişim Tarihi: 16.06.2014

Durborow RM, Crosby D, Brunson MW. Ammonia in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center Publication No: 463. 1992.

Durhasan D. Baraj göllerinden su temininde derinliğin su kalitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova üniversitesi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, Türkiye. 2006.

ECETOC. Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals Technical Report, Brussels, Belgium, 1993. Nr. 51.

Edwards DJ. Salmon and Trout Culture in Norway. Fishing News Books Limited, Farnham, Surrey, England. 1978.

Eggens M, Galgani F, Klungsayr J, Everts J. Hepatic EROD activity in Dab Limanda limanda in the German Bight using an improved plate-reader method. Marine Ecology Progress 1992;91:71-75.

Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 1961;7:88-95.

Environmental Protection Agency. Office of air and radiation. Office of atmospheric programs, Clean Air Markets Division (6204J) 1200 Pennsylvania Ave., NW Washington, D.C. 20460, 2008, EPA 430-F-08-002.

Environmental Protection Agency. Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment status and needs. United States, Office of Water, 2000, EPA-823-R-00-001.

Environmental Protection Agency. Protecting water quality from agricultural runoff. 2005, EPA 841-F-05-001.

Ezemonye LIN, Enuneku A. Bioaccumulation and histopathological alterations in the flatbacked toad, Bufo maculatus exposed to sub-lethal concentrations of lead. New York Science Journal 2012;5(2):52-69.

Fabacher DL, Little EE. Diversity of fish, early observations and descriptions. Fish in Experimentation, In Ostrander, G.K. Editor, The Laboratory Fish, Academic Press, San Diego, 2000, p.1-9.

Fernandes D, Andreu-Sánchez O, Bebianno MJ, Porte C. Assessment of pollution along the Northern Iberian shelf by the combined use of chemical and biochemical markers in two representative fish species. Environmental Pollution 2008;155:327-335.

Focus on chlorine science. Bioaccumulation. FOCS, 2013;8:1-4.

Fuji T. Site specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by alphatocopherol of lipid peroxide dependent lipid peroxidation in charged micelles. Archives of Biochemistry and Biophysics 1991;28(1):120-126.

George SG. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins DC, Ostrander GK. (Eds). Aquatic Toxicology (molecular, biochemical and cellular perspectives). Lewis Publishers, CRC press; 1994. p. 37-85.

Georgia Environmental Protection Division. A guidebook for local governments for developing regional watershed protection plans. Water Resources Branch. Water Resources Management Program, 2001, p.67.

Goksøy A, Förlin L. The cytochrome P450 system in fish. Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring, Aquatic Toxicology 1992;22:287-312.

Güler Ç, Çobanoğlu Z. Su kirliliği. Sağlık Bakanlığı Çevre Sağlığı, Temel Kaynaklar Dizisi, 1994, p.29. Nr.12.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry 1974;249:7130-7139.

Havelkova M, Blahova J, Kroupova H, Randak T, Slatinska I, Leontovycova D, Grabic R, Pospisil R, Svobodova Z. Biomarkers of contaminant exposure in Chub (*Leuciscus cephalus* L.). Biomonitoring of major rivers in the Czech Republic. Sensors 2008;8:2589-2603.

Havelková M, Randak T, Žlábek V, Krijt J, Kroupová H, Pulkrabová J, Svobodová Z. Biochemical markers for assessing aquatic contamination, Sensors 2007;7:2599-2611.

Hoeger B, Heuvelb MR, Hitzfeldc BC, Dietricha DR. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 2004;70(4):345-355.

Huggett R, Kimerle R, Mehrle P, Bergman H. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress (Boca Raton, FL, Lewis). 1992.

International Council for the Exploration of the Sea. Report of the working group on biological effects of contaminants. 4-7 Mart 1996, ICES-CM/E:5.

ICON. Pollutants in Urban Waste Water and Sewage Sludge, I C Consultants Ltd London, European commission, 2001, p.9.

Keleştemur GT, Keleştemur Ü, Selçuk S. Nakil işleminin gökkuşuğu alabalığı, *oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) yavrularının malondialdehit düzeyine etkisi. Sakarya Üniversitesi (SAÜ), Fen Bilimleri Dergisi 2010;14(2):119-123.

Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abrama KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology established mammalian and emerging piscine model system. Environmental Health Perspective 1998;106(7):375-384.

Kısaçam S. Gastrit ve mide kanseri hastalarında kan malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeylerinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi. Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye. 2010.

Kleinschmidt KC, Delaney KA. Biochemical and metabolic principles. In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies. Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE. (Eds). Part B, Section 1, Chapter 12, 2011. p.170-183.

Kopecka J, Rybakowas A, Barsiene J, Pempkowiak J. AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (Southern Baltic). Oceanologia 2004;46(3):405-418.

Kopecka-Pilarczyk J. Effects of dietary probiotics upplementation on several biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Bioscience and Biotechnology 2013;2(3):189-193.

Koponen K, Huuskonen S, Ritola O, Venalainen R, Tarhanen J, Lindstrom-Seppa P. Muscle chemical content and hepatic biotransformation in bream (*Abramis Brama*) and Asp (*Aspius Aspius*) in a PCB-contaminated lake. *Boreal Environment Research* 2003;8:203-213.

Krüner G, Westernhagen HV. Sources of measurement error in assays of erod activity of fish for biological effects monitoring. *Helgoland Marine Research* 1999;53:250-256.

Küçük S. Büyük Menderes nehri su kalite ölçümlerinin su ürünleri açısından incelenmesi. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2007;4(1-2):7-13.

Leblanc GA. Hepatic vectorial transport of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 1994;90:101-120.

Lech JJ, Vodcnik MJ. Biotransformation. In: Rand GM, Petrocelli SR. (Eds). *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications*, Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA; 1985. p.526-557.

Leggatt RA. Glutathione in fish; transport, influence of temperature and growth rate and interactions with the stress response. *Fizyoloji doktora tezi*. University of British Columbia. 1997.

Levine SL, Oris JT. CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquatic Toxicology* 1999;46:279-287.

Martinez-Tabche L, Romero AC, Gómez-Oliván L, Martínez MG, Hernández EO, López EL. Effect of malathion in Ignacio Ramirez dam sediments on rainbow trout (*Onchorhynchus Mykiss*). *Journal of Environmental Hydrology* 2002;10(3):1-11.

Melancon MJ, Alscher R, Benson W, Kruzynski G, Lee RF, Sikka HC, Spies RB. Metabolic products as biomarkers. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle, PM, Jr Bergman HL. (Eds). Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992. p.87-124.

Mişe Yonar ř, Sağlam N, Yöntürk Y, Aytemur A, Koşar A. Formaldehit uygulanan gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus Mykiss*) bazı hematolojik ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Journal of FisheriesSciences.com 2014;8(4):317-323.

Molony B. Environmental requirements and tolerances of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and brown trout (*Salmo Trutta*) with special reference to western Australia: a review. Fisheries Research Report, WA Marine Research Laboratories, Western Australia, 2001, Nr, 130.

Moss DW, Henderson AR, Kochmar JF. Enzymes; principles of diagnostic enzymology and the aminotransferases. In: Tietz NW. (Ed). Textbook of Clinical Chemistry. Saunders, Philadelphia, PA; 1986. p. 663-678.

Murphy SD. Pesticides. In: Doull J, Klassen CD, Anders MO. (Eds). The Basic Science of Poisons, Macmillan, New York; 1986. p. 519-581.

National Research Council (NRC) Biological Markers in Environmental Health Research, Committee on Biological Markers of The National Research Council, Environment Health Perspect 1987;74:3-9.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Analytical Biochemistry 1979;95(2):351-358.

Oost RVD, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental riskassessment: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology 2003;13:57-149.

Otto DME, Buttner JK, Arquette DM, Moon TW. Impaired inducibility of xenobiotic and antioxidant responses in rainbow trout exposed to polychlorinated biphenyl contaminated sediments in the St. Lawrence river. *Chemosphere* 1996;33:2021-2032.

Özdemir A. *Limnodrilus Profundicola* (Verril 1871) kolinesteraz ve ethoxyresorufin-o-deethylase aktivitelerinin biyomarker olarak kullanımının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2006.

Özdemir D, Yılmaz F, Yorulmaz B. Dalaman çayı üzerindeki bereket hidroelektrik santrali baraj gölü suyunun bazı fiziko-kimyasal parametrelerinin ve balık faunasının araştırılması. *Ekoloji* 2007;16(62):30-36.

Parker LM, Laure'n DJ, Hammock BD, Winder B, Hinton DE. Biochemical and histochemical properties of hepatic tumors of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Carcinogenesis* 1993;14(2):211-217.

Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics, In: Klaassen CD. (Ed). *Toxicology, The basic of science and poisons*, Sixth Edition; 2001.p.132-224.

Payne JF. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. *Science* 1976;191:945-949.

Payne JF, Fancey LL, Rahimtula AD, Porter EL. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1987;86(C):233-245.

Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future, Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 1996;32:225-231.

Retief NR, Avenant-Oldewage A, Du Preez HH. A seasonal study on Asian Tapeworm as indicators of metal pollution in the largemouth yellowfish of the Vaal Dam, South Africa. Department of Zoology, University of Johannesburg, P.O. Auckland Park, South Africa, 2006.

Roberts RJ, Shepherd JC. Handbook of Trout & Salmon diseases. Fishing News Books, ISBN: 0-85238-244-8. 1997.

Rowe M, Essig D, Jessup B. Guide to selection of sediment targets for use in Idaho TMDLs. Idaho Department of Environmental Quality, 2003, p.7.

Sanders BM. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Critical Reviews in Toxicology 1993;23:49-75.

Sawyer CN, Mc Carty PL, Parkin GF, (1994) Chemistry for Environmental Engineering, 4th Edition, McGraw- Hill Int. Editions.

Schwartz MF, Boyd CE. Channel catfish pond effluents. The Progressive Fish-Culturist 1994;56:273-281.

Sedgwick SD. Trout farming handbook. Fishing New Books Ltd, Surrey, England. 1985.

Shugart LR, Bickham J, Jackim G, McMahon G, Ridley W, Stein J, Steinert S. DNA alterations. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Jr Bergman HL. (Eds). Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA; 1992. p.155-210.

Sınanmış Atasoy AD, Şeneş S. Atatürk baraj gölünde alabalık üretiminin oluşturduğu kirlilik yükünün araştırılması. Ekoloji 2004;13(53):1-9.

Slatinska I, Smutna M, Havelkova M, Svobodova Z. Review article: biochemical markers of aquatic pollution in fish – Glutathione-S-Transferase. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. The Czech Republic, *Folia Veterinaria* 2008;52:129-134.

Stechey D, Linquist J. Environmental regulation of freshwater aquaculture in Canada. In: Gilbert E, Stechey D, Struthers M. (Eds). *Proceedings of the Canadian Freshwater Aquaculture Symposium*, Quebec; 2006. p. 31-38.

Stegeman JJ. Cytochrome p450 forms in fish; catalytic, immunological and sequence similarities, *Xenobiotica* 1989;19(10):1093-1110.

Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Forlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Jr Bergman HL. (Ed). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992, p.235-335.

Stickney RR. Culture of salmonid fishes. CRC Press, Inc, Florida, 1991, p. 50-51.

Suter GW. Ecological risk assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 1993, p.538.

Tan A. Atık sularda bazı kirlilik parametrelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye. 2006.

Tejeda-Vera R, López-López E, Sedeño-Díaz JE. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameioba River. Mexico, *Environment International* 2007; 33(4):521-531.

Tuvikene A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici* 1995;32:295-309.

Tülek S. Kızılırmak nehri su kalitesi belirlenmesi ve ötrofikasyona bağlı risk değerlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Samsun, Türkiye. 2006.

Van der Aar EM, Buikema D, Commandeur JNM, te Koppele JM, van Ommen B, van Bladeren PJ, Vermeulen NPE. Enzyme kinetics and substrate selectivities of rat glutathione s-transferase isoenzymes towards a series of new 2-substituted 1- chloro-4-nitrobenzenes. *Xenobiotica* 1996;26:143-155.

Van Leeuwen CJ, Hermens JLM. Risk Assessment of Chemicals: an Introduction, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands; 1995.

Vermeulen NPE. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides C. (Ed). *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, Chapter 2; 1996. p. 29-53.

Walker CH, Thompson HM. Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In: Mineau P. (Ed). *Cholinesterase- inhibiting Insecticides*. Chemicals in Agriculture. vol. 2. Elsevier, Amsterdam; 1991.p.1-17.

Weeks BA, Anderson DP, DuFour AP, Fairbrother A, Goven AJ, Lahvis GP, Peters G. Immunological biomarkers to assess environmental stress. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Jr Bergman HL. (Eds). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Chelsea, HO; 1992.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 2000;30:347-570.

World Health Organization (WHO). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria 155, Geneva. 1993.

Yang j, Chen H. Serum metabolic enzyme activities and hepatocyte ultrastructure of common carp after Gallium exposure. Zoological Studies 2003;42(3): 455-461.

Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği (YSKYY). Resmi Gazete Ankara, 30 Kasım 2012. Nr. 28483.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Gaziantep’te doğdu. İlkokulu Org. Kenan Evren İlköğretim Okulunda okudu. Ortokulu ve liseyi Gaziantep Anadolu Lisesinde tamamladı. Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesinden 1998 yılında mezun oldu ve aynı yıl Samsun’da Kimya Öğretmeni olarak göreve başladı. 2000 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesinde Analitik Kimya anabilim dalında Yüksek Lisans eğitime başladı ve 2003 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2009 yılında Aydın Adnan Menderes Üniversitesinde biyokimya anabilim dalında Doktora eğitime başladı. 2013 yılında evlendi. 2014 yılında bir kızı oldu. Halen Isparta’da Kimya Öğretmeni olarak çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda her zaman yardımlarını ve hoşgörülerini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Funda KIRAL'a, öğretim üyeleri Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ ve Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ferda AKAR'a, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kamil SEYREK ve Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hasan AKŞİT'e, tez aşamasında yardımlarından dolayı araştırma görevlileri Gamze TOSUN ve Gamze Servi EKREN'e, merkez laboratuvar görevlisi Necati GÜNAY'a, doktora öğrencileri Erengül BODUÇ, Turgut SEKERLER ve Mürüvvet URAL'a, şu an isimlerini hatırlayamadığım tezimde az ya da çok emeği geçen veteriner fakültesinden mezun öğrenci arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Son olarak tez aşamasındaki anlayışından, sabrından ve desteğinden dolayı eşime, bana moral kaynağı olan kızım Zeynep Saliha'ya ve gurbette geçen uzun yıllardan dolayı her zaman ihmal ettiğim anneme ve babama desteklerinden dolayı teşekkür ederim.