

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEOBROMİN VE TEOFİLİNİN BAZI FİTOPLANKTON
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

MELEK YILDIZ

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEOBROMİN VE TEOFİLİNİN BAZI FİTOPLANKTON
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

MELEK YILDIZ

Doç. Dr. Halim Aytekin ERGÜL

Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç. Dr. Arzu MORKOYUNLU YÜCE

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Doç. Dr. Burak ÖTERLER

Jüri Üyesi, Trakya Üniv.



Tezin Savunulduğu Tarih: 24.01.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kafein molekülünün bileşimindeki metabolitlerden olan teofilin ve teobromin'in, deniz ekosistemlerinde bulunan deniz ürünleri yetiştiriciliğinde de kullanılan, *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini esirgemeyerek her fırsatta yardımcı olan değerli danışman hocam Halim Aytekin Ergül'e teşekkürü borç bilirim. Çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Elif Ülker'e Teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Ocak– 2019

Melek YILDIZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
TABLolar DİZİNİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER.....	4
1.1.Ekotoksikoloji.....	4
1.1.1. Toksikite testleri.....	4
1.1.2. Toksikite testlerinde alglerin kullanımı ve önemi.....	5
1.2.Fitoplankton Kültürü	6
1.2.1. Fitoplankton kültür ortamı.....	6
1.3.Kafein	8
1.3.1. Kafein tüketimi	9
1.3.2. Kafein metabolizması	10
1.4.Theobromine.....	11
1.5.Theophylline	11
2. MATERYAL VE METOT.....	13
2.1.Materyal.....	13
2.1.1. Isochrysis galbana	13
2.1.2. Thalassiosira pseudonana	14
2.2.Metot.....	15
2.2.1. Materyallerin toplanması ve muhafaza koşulları.....	15
2.2.2. Fitoplankton kültürlerinin ortam koşulları	15
2.2.3. Çalışmada kullanılan malzemelerin hazırlanması	16
2.2.4. Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması	16
2.2.5. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler	17
2.2.6. Teobromin ve teofilin fitoplankton kültürlerine aktarılması	18
2.2.7. Hücrelerin sayımı	19
2.3.Verilerin İstatiksel Analizi.....	20
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
3.1.Isochrysis galbana Türüne Teofilin'in Etkisi.....	21
3.2.Thalassiosira pseudonana Türüne Teofilin Etkisi.....	22
3.3.Isochrysis galbana Türüne Teobromin' in Etkisi.....	24
3.4.Thalassiosira pseudonana Türüne Teobromin'in Etkisi	26
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	31
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	35
ÖZGEÇMİŞ	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fitoplankton kültürünün büyüme evreleri	8
Şekil 1.2. Kafeinin moleküler yapısı	9
Şekil 1.3. Kafein bileşenleri	12
Şekil 2.1. <i>Isochrysis galbana</i>	14
Şekil 2.2. <i>Thalassiosira pseudonana</i>	15
Şekil 2.3. Theophylline ve Theobromine	18
Şekil 2.4. İnkübasyona bırakılan türler	19
Şekil 2.5. Thoma lamı	21
Şekil 3.1. Farklı teofillin konsantrasyonlarının <i>I. galbana</i> türünün birey sayısına etkisi.....	22
Şekil 3.2. Farklı teofillin konsantrasyonlarının <i>T. pseudonana</i> türünün birey sayısına etkisi.....	24
Şekil 3.3. Farklı teobromin konsantrasyonlarının <i>I. galbana</i> türünün birey sayısına etkisi.....	25
Şekil 3.4. Farklı teobromin konsantrasyonlarının <i>T. pseudonana</i> türünün birey sayısına etkisi	27

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	9
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan ve ticari olarak satın alınan fitoplankton türü ve CCAP kültür numaraları.....	15
Tablo 2.2. F/2 besin ortamının içeriği	16
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler.....	17

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrad
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
ATP	: Adenozintrifosfat
B12	: B12 Vitamini
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
g	: Gram
H ₂ O	: Su
HCl	: Hidroklorür
HCO ₃	: Bikarbonat
K	: Potasyum
km	: Kilometre
L	: Litre
Lux	: Işık şiddeti
M	: Metre
mg	: Miligram
mg/L	: Milyonda kısım
mm	: Milimetre
mol	: Molarite
Na	: Sodyum
ng	: Nanogram
ppt	: Binde kısım
rpm	: Dakikada devir sayısı

Kısaltmalar

ÇDR	: Çevre Durum Raporu
EC50	: Etkili Konsantrasyon 50
EPN	: Etil 4--Nitrofenol Fenil Fosforotioat
HDPE	: High Density Polyethylene (Yüksek Yoğunluklu Polietilen Malzeme)
IC50	: İnhibisyon Konsantrasyonu 50
ISO	: International Organization for Standardization (Uluslararası Standartlar Teşkilatı)
LC50	: Letal Concentration 50 (Öldürücü Konsantrasyon)
LD50	: Letal Dose 50 (Öldürücü Doz)
LT50	: Letal Time50 (Öldürücü Zaman)
NCMA	: National Center for Marine Algae (Denizel Alg Ulusal Merkez)

NOEC	: No Observed Effect Concentration (Gözlemlenemeyen Etki Konsantrasyonu)
OECD	: The Organisation for Economic Co--operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)
OSB	: Organize Sanayi Bölgesi
SCADA	: Supervisory Control and Data Acquisition (Merkezi Denetim ve Veri Depolama)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

TEOBROMİN VE TEOFİLİNİN BAZI FİTOPLANKTON KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

ÖZET

Kafein, toplumsal olarak günümüzde en çok tüketilen çay, kahve, çikolata, kola temelli içeceklerin karışımını oluşturan bir maddedir (Loyacano ve ark. 1999). Yerleşim yerlerindeki kanalizasyon, atık su, göl, akarsu, yer altı suyu ve deniz suyuna bir şekilde ulaşan kafein antropojenik indikatör olarak kullanılır. Bu çalışmada kafein molekülünün bileşimindeki metabolitlerden olan teofillin ve teobromin konsantrasyonlarının fitoplankton çoğalması üzerine etkileri ile ilgili verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada bu metabolitlerin *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinde gözlemlendi. Deney gruplarından 24 saat ara ile örnek alındı ve hücre sayısı belirlendi. Çıkan sonuçlar 96. Saat sonunda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. *I. galbana* türünün üremesi 150mg/L teobromin ve 500mg/L teofilin konsantrasyonlarında en düşük düzeyde oldu. *T. Pseudonana* türünde ise 150 mg/L teobromin ve 500 mg/L teofilin konsantrasyonlarında en düşük düzeyde oldu.

Bu çalışma antropojenik indikatör olarak kullanılan kafein metabolitlerinin *I. galbana* ve *T. pseudonana* türlerinin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. Sonuçların kentsel desajrların canlı sistemleri üzerindeki etkilerinin anlaşılması açısından katkı sağlayacağı ve bu türler açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Isochrysis galbana*, Teobromin, Teofilin, *Thalassiosira pseudonana*, Üreme Engellenmesi.

THEOBROMINE AND THEOPHYLLINE EFFECTS ON THE SOME PHYTOPLANKTON CULTURE

ABSTRACT

Caffeine is a mixture of tea, coffee, chocolate and cola based beverages. It is used as antropogenic indicator in city centers, densely populated areas, sewage, wastewater, lakes, rivers, groundwater and seawater. The aim of this work is obtain and evaluate caffeine and caffeine's most effective metabolite theophylline and theobromine concentration on phytoplankton growth.

The effects of caffeine on *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira pseudonana* and the effects of theophylline and theobromine on *Isochrysis galbana* was observed. Phytoplankton culture was inoculated in sterile cabinet and was exposed to 15°C temperate and 14/10 day and night period. The groups was monitored for 96 hours with given different concentration of theophylline, theobromine and control. The samples were taken every 24 hours and cell numbers were determined.

When the samples were compared with control groups at the end of 96 hour, the growth of *I. galbana* was at the lowest on 150 mg/L theobromine and 500 mg/L theophylline concentration. In the growth of *T. pseudonana* was at the lowest on 150 mg/L theobromine and 500 mg/L theophylline concentration.

Antropogenic indicator caffeine and the most effective metabolit theophylline and theobromine effects on the growth of *I. galbana* and *T. pseudonana* was first studied subject of its field. The result of this work will contribute to both phytoplankton species used in this work and municipal discharge's effects on live systems.

Keywords: *Isochrysis galbana*, Theobromine, Theophylline, *Thalassiosira pseudonana*, Growth Inhibition.

GİRİŞ

Planktonik algler, su ortamında birincil üreticilerdir. Bu nedenle besin zincirinde önemli rol üstlenirler. Besin zincirinin birinci basamağında bulunmaları nedeniyle, sucul ekosistemlerin sağlıklı işleyişi için öneme sahiptirler. Ayrıca planktonik algler su ortamına bulaşan kimyasalların farklı etkilerinin test edilmesinde kullanılan indikatörlerdir (Burkiewicz ve diğ., 2005).

Algler, toksisite testlerinin kullanımında da önemlidirler (Manahan, 2000). Toksikite testlerinde en sık kullanılan mikrolag türleri ise yeşil alglerdir (Moreno Garrido ve diğ., 2000).

Su kirliliği, kaynak suyuna ya da herhangi bir doğal suya organik ve inorganik kirleticilerin bulaşmasıyla oluşur. Sucul ekosistemler kirlenmeye yatkındır. Sucul sistemlerin kirliliği çoğunlukla kentleşme, evsel atık, tarım kaynaklı ve insan kaynaklı olarak meydana gelmektedir (Ferreira, 2005). Su kirliliği balıkçılığın ve biyolojik çeşitliliğin azalması gibi çevre sorunlarına da neden olabilmektedir. İnsanlığın en önemli önceliklerinden birisi sucul ekosistemlerin korunmasıdır (Kurissery ve diğ., 2012).

Ekosistemlerde yaşam, enerji akışı ve besin döngüsüyle sürmektedir. Canlı grupları ekosistemi meydana getirir. Bu canlı grupları birbirine besin zinciriyle bağlıdır. Madde ve enerji döngüsü veya besin zinciri gibi ekolojik döngü elemanları, canlılardan herhangi birinin kirleticilerden zarar görmesi sonucu etkilenmektedir. Canlıların arasındaki karşılıklı etkileşim bozulmaktadır. Canlıların yaşamasını zorlaştıracak, ekosistem dengesini bozacak her şey doğrudan veya dolaylı su kirliliği olarak karşımıza çıkar (Tan Aylin, 2004).

Sucul ortamlar kendi kendini temizleyebilme yeteneğine sahiptir. Sucul ortamlarda oluşan kirlilik, sucul ekosistemlerin kendi kendini temizleme kapasitelerini bozarak bazı yerlerde tehlikeli boyutlara ulaşmaktadır. Sucul ekosistemlerde meydana gelen

tehlikenin belirlenmesi amacıyla da sucul organizmalardan yararlanılmaktadır. Sucul ortamların birincil üreticileri ve birçok sucul canlının besin kaynağı olan fotosentetik algler ekosistemin önemli bileşenidir (Ipsiroglu Merve, 2016). Algler, sucul ortamlarda her zaman bulunabilen, ekolojik olarak önemli olan canlılardır. Alg yoğunluğu ve bileşiminin değişmesi, ortamın kimyasal ve biyolojik özelliğini etkiler (Oberholster ve diğ., 2005).

Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer kullanımlar sonucu kirlenmiş içerisinde zararlı maddeleri içeren sular, atıksu olarak tanımlanmaktadır. Sulardaki kirlenmenin en önemli nedenlerinden birini atıksular oluşturmaktadır. Organik maddeler, ağır metal bileşikleri, siyanür, aromatik ve alifatik hidrokarbonlar, deterjanlar, azot, fosfor, renk ve inorganik maddeler atıksularda kirlenmeyi oluşturan genel etmenlerdir (Doğan ve Saylak, 2000). Bu kirleticilerin giderimi için fiziksel, biyolojik ve kimyasal arıtma yöntemleri kullanılmaktadır (URL-1).

Su içerisine karışan atık maddelerde fiziksel, biyolojik ve kimyasal içerikli kirlilikler görülmektedir. Fiziksel kirlilik suyun rengi, bulanıklığı, sıcaklığı gibi özelliklere etki eder. Biyolojik kirlilik sularda patojenik bakteri, mantar, alg, patojenik protozoa vb. bulunmasıyla etki eden tiptir. Bu canlılar zamanla ortamdaki oksijen, karbon, azot gibi maddeleri tüketmektedir. Kimyasal kirlilik ise endüstrinin sebep olduğu kirlilik, sularda organik ve anorganik maddelerin bulunmasıyla meydana gelir (URL-2). Bu kirliliğin besin zincirini etkilemesiyle canlılar üzerinde toksik etkiler meydana gelir, ekosistemde önemli sorunlar ortaya çıkar.

Miktarları her yıl bir önceki yıla nazaran artan sentetik organik maddeler çevreyi büyük ölçüde kirletirler. Bu tip kimyasallar çevrede kolay parçalanamadıklarından sadece sularda değil çevrede ciddi bir sorun haline gelmişlerdir (Tan aylin, 2004).

İnsanlar tarafından günlük yiyecek ve içecekler aracılığıyla alınan ve çeşitli ilaçların hammaddesi olan kafein alıcı ortamda sıklıkla bulunmaktadır. Alınan bu kafein idrarla atılır. Kanalizasyon sistemlerine ve oradan da evsel atıksu arıtma sistemlerine kadar ulaşabilmektedir. Ayrıca kafeinin tamamı, evsel biyolojik arıtma sistemlerinde de giderilememektedir, atık suyun deşarjıyla da alıcı ortama iletilmektedir (Metcalf ve diğ., 2003).

Bu bilgiler çerçevesinde Bu tez çalışmasının amacı, deniz ekosistemlerinde birincil üreticiler olan bir diatom türü olan *T. Pseudonana* ve bir Coccolithopore türü olan *I. Galbana* türlerine kafeinin metabolitleri olan teobromin ve teofilin 'in farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı etkilerinin araştırılmasıdır. Kafeinin deniz canlıları üzerindeki etkileri ile ilgili veriler bu araştırmadan elde edilecek sonuçlar ile sağlanacağı düşünülmektedir.

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Ekotoksikoloji

Ekotoksikoloji çevre toksikolojisinin bir alt dalı olarak değerlendirilir. Ekotoksikoloji kirleticilerin canlılar ve ekosistem üzerindeki zararlı etkileri ile bu zararlı etkilerin önlenmesi konusunda çalışmalar yapar. Karasal ve sucul ortamlarda yaşayan organizmalar (balık, kuş, bitki vb.) üzerindeki zararlı etkileri ve bu etkilerin çevre ile etkileşimini araştırır (Rand ve diğ., 1995). Ekotoksikoloji, kimyasal maddelerin ekosistemler üzerine zararlı etkilerini belirleyen çevre, kimya, biyokimya, fizyoloji, toksikoloji, popülasyon ekolojisi ve popülasyon genetiği disiplinlerinin bir sentezini oluşturan disiplinlerarası bir konudur (Walker ve diğ., 2012).

1.1.1. Toksisite testleri

Toksisite testleri canlılar üzerindeki zararlı etki yapan ve zararsız konsantrasyonları saptamak amacıyla yapılmaktadır. Ayrıca yüzey sularının kalitesini ve deşarjların toksisitesini tayin etmek için de toksisite testleri yapılmaktadır (Parlak ve diğ., 2011).

Toksisite testleriyle doğal ortama verilen kirletici maddenin etkileri ve o ortamda yaşayan canlılar üzerindeki etkileri belirlenir. Bu testler ile akut ve kronik (uzun süreli) etkiler ortaya çıkarılır (Ipsiroğlu Merve, 2016).

Akut etkiler, ani olarak yüksek konsantrasyonlarda bir kimyasala maruz kalma sonucu ortaya çıkan ve genellikle diğer etkilere göre daha şiddetli ve büyük olan etkilerdir. Sucul organizmalarda bu etkileri saptamak için ölçümler birkaç saat, günde, haftada olmak üzere ölüm oranları belirlenir (Rand ve Petrocelli, 1985).

Genellikle, uzun zaman diliminde düşük konsantrasyonlarda kimyasala maruz kalma sonucunda oluşan toksik etkiler, kronik etkilerdir. Bu etkiler ölümcül veya

subletal olabilir. Kronik etkiye maruz kalmış organizma yaşayan yeni organizma üretmede başarısızsa bu ölümcül etkiye örnektir (Rand ve Petrocelli, 1985).

Ekotoksikolojide en önemli konu organizmanın maruz kaldığı kimyasalın miktarı ile ortaya koyduğu toksik etkinin derecesi ve çevresi arasındaki ilişkidir. Çevresel kimyasalların sebep olduğu risk değerlendirilmesinde doz-cevap ilişkisi temeli oluşturur çünkü kirletici miktarına bağlı olarak doz değişmektedir (Parlak ve diğ., 2011).

Hedef dokuya ulaşan madde miktarıyla çevresel konsantrasyon arasındaki farkı ayırt etmek için doz-tepki arasındaki ilişkiyi bilmek gereklidir. Çevresel konsantrasyon, çevresel toksikolojide bir organizmaya giren kimyasalın bilinen miktarının temsili olarak kullanılan terimdir. Belirli bir dozla ortaya çıkan reaksiyon veya tepki, tepkinin büyüklüğü veya gözlemlenebilen özel bir tepki şeklinde kantitatif olarak tanımlanır (Yu, 2005).

1.1.2. Toksikite testlerinde alglerin kullanımı ve önemi

Algler, fotosentez ile karbondioksitten organik madde üreten ve inorganik maddeleri kullanan tek hücreli mikroskobik organizmalardır. Tek tek, ipliksi, tabaka veya koloni halinde olabilirler. Deniz algleri büyük ve oldukça karmaşık yapılı çok hücreli organizmalardır. Mikrofit olarak isimlendirilen mikroalgler tatlısu ve deniz sistemlerinde bulunurlar ve birkaç µm'den birkaç µm ye kadar farklı boyutlarda olabilirler (URL-2).

Sucul ortamın birincil üreticileri olan ve birçok sucul canlıının besin kaynağı olan fotosentetik algler ekosistemin önemli bileşenleridir. Algler, ekosistem içerisinde oldukça değişik yerlerde yaşamlarını sürdürebilen, ekolojik olarak önemli ve stresörlere karşı çok hassas olan canlılardır. Habitatın kimyasal ve biyolojik özelliğini alglerin yoğunluğu ve bileşimi etkiler (Oberholster ve diğ., 2005).

Algler, zooplankton besin kaynağı olmaları, toksik maddelerin besin zincirinde çevriminde aracı olmaları, mikrobiyal besin zinciri için başlıca karbon kaynağı olmaları ve çift kabuklu hayvanların büyümesi için ihtiyaç olan vitaminleri ve doymamış yağ asitlerini karşılamalarıyla önemli role sahiptirler. Yaşamı sona eren

alglerin dış iskeletleri, dibe çökerek denizel sedimentin yapısına katılmaktadır (Burton ve diğ., 1991).

Besin zincirinin bir parçası olmaları ve organik maddenin birincil üreticileri olmaları nedeniyle algler toksisite testlerinde önemli role sahiptirler. Algler kirliliğe karşı aşırı duyarlı veya orta seviyede toleranslı olabilir. Algler; ağır metaller, endüstriyel atıklar, pestisitler, katyonik yüzey aktif maddeler, toprak elütrasyonları ve tehlikeli atık maddelerine karşı makro canlılardan daha duyarlıdırlar (Manahan, 2000).

Chlorophyta (yeşil algler), Chrysophyta (altın rengi algler), Rhodophyta (kırmızı algler) toksisite testlerinde en sık kullanılan alg türleridir. Çeşitli toksisite testlerinde ise en sık kullanılan alg türleri; *Selenastrum capricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia closterium*, *Champia parvula* ve makroalg *Hormosira banksii* (Atay, 2009).

1.2. Fitoplankton Kültürü

Besin değeri oldukça yüksek olan algler su ortamında yaşayan diğer canlılar için önemli besin kaynaklarıdır ayrıca algler balık ve omurgasız canlıların renklenmelerinde önemli rol oynar. Son derece zengin, karbonhidrat ve yağ asidi içeren fitoplanktonik canlılar tüm bu özellikleri nedeniyle 100 yıllardan bu yana fitoplankton üretilmesi ve su canlıları yetiştiriciliğinde kullanılması için yoğun olarak çalışmalarda kullanılmaktadır (URL-3).

1.2.1. Fitoplankton kültür ortamı

Fitoplankton kültürlerinde ışık şiddeti, ışık kalitesi ve süresi önemli etkenlerdir.

Fitoplankton türleri çeşitli pigmentler içermektedirler, içerdiği bu pigmentler sayesinde ışığın farklı ışınlarını absorbe ederler. Kültür sistemlerinde bulunan floresan lambalar da alglerin bu ihtiyaçlarını karşılayacak ışınları içermektedir. Kültürlerde sürekli aydınlatma yapılır bunun nedeni kültürlerde hızlı büyümeyi sağlamaktır. Sürekli aydınlatma tüm türler için uygun olmayabilir bu nedenle fotoperiod sistemi uygulanmaktadır. Bu sistemlerde kültür kaplarının maksimum aydınlatılmasını sağlayacak şekilde içerideki floresan lambalar düzenlenir.

Fitoplankton gelişiminde pH değerinin çok yüksek ya da çok düşük olması gelişimi yavaşlatmaktadır ve hücrel bozulmaya neden olmaktadır. kültürü yapılan alg türleri için 7 ile 9 pH aralığı kullanılmaktadır, türler için optimum aralık ise 8,2-8,7 dir ve bu pH aralığı kullanılmadığı takdirde kültürün çökmesine neden olur (Lavens ve Sorgeloos, 1996).

Kültür kaplarında fitoplankton hücrelerinin dibe çöktüğü gözlenir. Buna karşın kültürün karıştırılması gerekir. Küçük hacimlerdeki kültürlerin el ile çalkalanarak karıştırılması karışım için yeterlidir.

Kültürlerin içerdikleri nutrient içeriğine bağlı olarak kültürü yapılan türlerin sıcaklık toleransları değişebilmektedir. Her türün gelişebilmesi için minimum, maksimum ve uygun değer sıcaklık aralıkları vardır. Kültür ortamının bileşimine bağlı olarak türlerin kültürlerinin uygun değer sıcaklıkları genellikle 20-24 C arasındadır. Kültürü yapılan türlerin uygun sıcaklığa getirilmesi alg türlerinin kullanılmasında önemlidir (Lavens ve Sorgeloos, 1996).

Fitoplankton türleri besleyici maddeleri doğrudan hücre yüzeyinden aldıkları için azot, fosfor, vitaminler ve oligoelementler kültür ortamlarında yeterince bulunması gerekir.

Fitoplankton kültür kaplarının daima ışık geçirmesi gereklidir ve mutlaka cam malzeme tercih edilmelidir. Fitoplankton kültür kapları piramidik, silindirik, küresel, prizmatik şekillerde olabilir bu kapların seçimi kültürün hangi amaçla kullanılacağına bağlıdır (Koray, 2011).

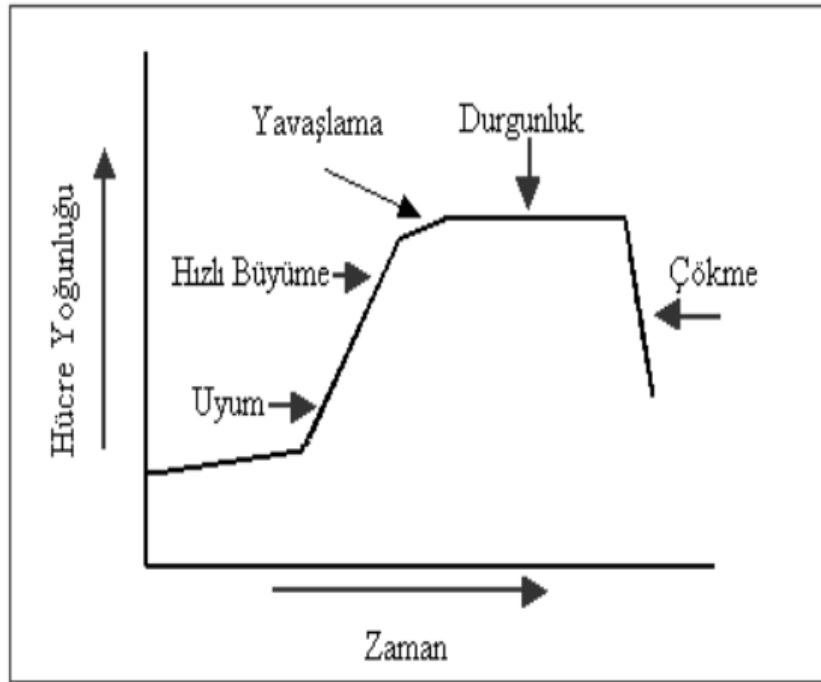
Fitoplanktonun karakteristik gelişme safhaları beş ayrı aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; uyum ve adaptasyon safhası, hızlı gelişme safhası, gelişmenin yavaşlama safhası, duraklama safhası ve çökme safhası olarak belirtilebilir.

Uyum safhası: gelişmenin nispeten yavaş olduğu aşamadır bu kısımda fitoplankton hücreleri ortama uyum aşamasındadır.

Hızlı gelişme safhası: hücreler düzenli ve sürekli olarak sabit bir oranda bölünmeye başlamaktadır. Gelişme oranının maksimum olduğu safhadır.

Yavaş gelişme safhası: Bu aşama hızlı çoğalma ve duraklama safhaları arasındaki gelişmenin yavaşladığı safhadır. Bu safha diğer kültür tankına ekim yapılma zamanı olarak tavsiye edilmektedir.

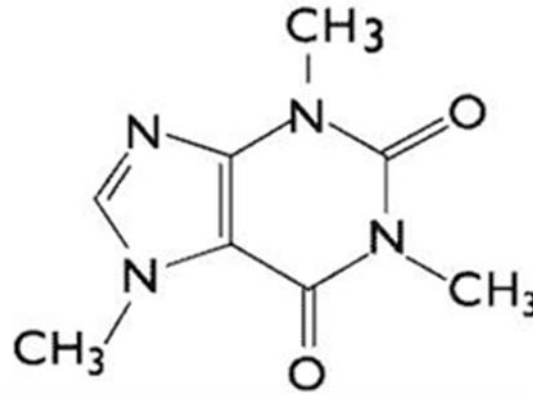
Duraklama safhası: Hücrelerin çoğalma ve yok olma oranlarının eşit olduğu bu evrede, hücre sayılarında herhangi bir değişim olmamaktadır. Çökme safhası: Bu safhada hücre sayısı ani olarak azalmaya başlar (URL-1).



Şekil 0.1. Fitoplankton kültürünün büyüme evreleri (URL-1)

1.3. Kafein

Hafif acı ve kokusuz bir madde olan kafein beyaz kristalize toz şeklinde bulunur. Kahve (*Coffea arabica*) bitkisinin tohumlarında, çay (*Tea sinensis*) yapraklarında ve kakao (*Thebroma cacao*) ağacının tohumlarında bulunan kafein dört tane azot atomu içeren iki halkalı pürin alkaloid yapısında bir bileşiktir. İkincil bitki metabolitleri sınıfında bulunan alkaloidler bitki metabolizmasında aminoasitlerden türeyen bazik organik ürünler olarak bilinmektedir (Duman, 2006). Kafeinin moleküler yapısı Şekil 1.2' de görülmektedir (URL-2).



Şekil 1.2. Kafeinin moleküler yapısı

Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.1' de verilmiştir.

Kafeinin suda çözünürlüğünün yüksek olduğu tabloda görülmektedir (Duman, 2006).

Tablo 1.1. Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Diğer adı	1,3,7--trimetil--1H--pürin--2,6
Moleküler formülü	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Moleküler ağırlığı	194,19 g/mol
Yoğunluk	1,23 g/cm ³
Kaynama noktası	178 °C
Çözünürlük	2,17 g/100 mL (25°C)

1.3.1. Kafein tüketimi

Kafein eski zamanlardan beri çay ve kahve gibi içeceklerle alınan bitkisel bir alkaloiddir. 60'tan fazla bitki türünde bulunan alkaloid olan kafeinin kahve, çay, kakao ve kolada porsiyon başına miktarları sırasıyla 100 mg, 50 mg, 10 mg ve 40 mg'dır. Evrensel (genel) olarak kişi başına ortalama tüketim miktarı günde 70 mg'dır. Fakat bu miktar İngiltere'de 440 mg (çoğunlukla çay), Amerika Birleşik Devletleri'nde 210 mg, İsviçre'de 300mg'dır (Buerge ve diğ., 2003; Siegener ve Chen, 2002).

Kafein, vücuda hemen her gün tüketilen kahve, çay, kola, enerji içecekleri, çikolata gibi yiyeceklerle ve içeceklerle, reçetesiz satılan ağrı kesiciler, diyet hapları ve antihistaminik ilaçlarla alınmaktadır. İnsanların kafeini günde ortalama 300

miligramdan fazla tükettikleri yapılan araştırmalar sonucunda belirtilmiştir (Barone ve Roberts, 1996).

Hatta gün içerisinde farkında olmadan 1 gramdan fazla kafein tüketildiği ve bu miktarın kişiden kişiyeye göre değiştiği görülmektedir. Oysaki yetişkinlerin güvenli olarak tüketeceği kafein miktarı 300 mg (3-4 fincan kahve ya da 5-6 büyük çay) olarak yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Çocukların ise günde tüketeceği kafein miktarı 35-40 miligramı geçmemesi gerekmektedir. Aşırı miktarda kafein alımı çocuklarda ya da yetişkinlerde ciddi derecede zarar ve ölümlere neden olabilmektedir. Bu miktar 57 fincan hazır kahve, 86 fincan kahve ya da 161 bardak aya karşılıktır. Çocukların ise günlük alabileği kafeinin aşırı dozu, 1 gramdan daha az olarak belirlenmiştir. Bu miktar ise 22 tane kutu kolaya karşılık gelmektedir (Ofloğlu, 2007).

Hatta gün içerisinde, kişiden kişiyeye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı hesaplanırsa, hiç farkında olmadan günde 1 gramdan fazla kafein tüketildiği görülmektedir. Oysaki pek çok çalışmada, yetişkinlerin güvenli olarak tüketecekleri kafein miktarı 300 mg (3-4 fincan kahve ya da 5-6 büyük bardak çay) olarak belirlenmiştir. Çocukların tüketeceği kafein miktarının ise, günde 35--40 miligramı geçmemesi gerekmektedir. Yetişkin ya da çocuklarda aşırı miktarda kafein alımı, ciddi zarar ve ölümlere neden olabilmektedir. Yetişkin bir kişinin günde alacağı aşırı doz 5- 10 gram olarak belirlenmiştir. Bu miktar 57 fincan hazır kahve, 86 kahve fincanı kahve ya da 161 çay bardağı aya karşılık gelmektedir. Çocukların günde alacağı aşırı doz ise, 1 gramdan daha az olarak belirlenmiştir. Bu da 22 tane kutu kolaya karşılık gelmektedir (Ofloğlu, 2007).

1.3.2. Kafein metabolizması

Kafein alındıktan sonra, kafeinin neredeyse tamamı hızlı bir şekilde mide bağırsak kanalından emilir ve kan plazmasında en yüksek seviyeye 30-120 dakika sonra ulaşır. Bütün biyolojik zarlardan hidrofobik özelliği sayesinde geçer ve hücrelere ulaşır. Kafeinin %5' inden daha azı rine çevrilmeden kalır. Yapılan alışmalar insan vücudunda kafeinin değişmeden veya metabolitleri şeklinde kaldığını ve sonucunda üre olarak dışarı atıldığını göstermiştir (Boyd ve diğ., 2003).

1.4. Theobromine

Theobromine, daha önce xantheose olarak bilinen, $C_7H_8N_4O_2$ kimyasal formülüne sahip olan kakao bitkisinin bir alkaloididir. Çikolatanın yanı sıra çay bitkisinin yapraklarında ve kola da dâhil olmak üzere birçok gıda da bulunur. Theophylline ile birlikte bir ksantin alkaloid olarak sınıflandırılır. Adı theobromine olmasına rağmen bileşik brom içermez. Theobromin, Theobroma'dan türetilmiştir. Yunanca god tanrı ve broma yiyecek anlamına gelen tanrıların yiyeceği anlamına gelen Theobromin kakao ağacının bir alkaloididir.

Theobromin suda çözünür (330 mg/L), kristalli toz bir yapıya sahiptir. Theobromin beyaz veya renksizdir, ancak ticari numuneler sarımsı olabilir. Theobromin, teofilin ve paraksantin izomeridir. Theobromine bir dimetil Ksantin olarak sınıflandırılır. Theobromin kakao çekirdeklerinden ilk olarak 1841 yılında Rus kimyager Alexander Voskresensky tarafından keşfedilmiştir.

1.5. Theophylline

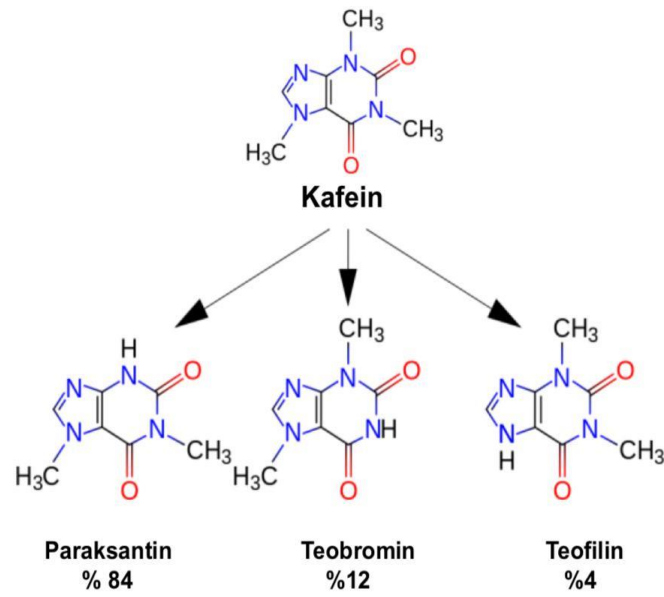
Teofilin kokusuz, acı beyaz toz şeklinde olan bir maddedir ve ilk olarak 1888 yılında Alman biyolog Albrecht Kossel tarafından çay yapraklarından ekstrakte edilmiştir (Baumann, 2006). Teofilin bir metilksantin türevidir, etkili ve ucuz olmasının yanında diğer bronkodilatörlere göre uzun süre kullanıldığında tolerans gelişmemesi nedeniyle astım ve KOAH tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (Barnes, 2011).

Yapısal olarak teobromin ve kafeine benzer ve doğada kolayca bulunur. Çay (*Camellia sinensis*) ve kakaoda (*Theobroma kakao*) da bulunur.

Teofilin, ilk olarak çay yapraklarından ekstrakte edilmiş ve Alman biyolog Albrecht Kossel tarafından 1888 civarında kimyasal olarak tanımlanmıştır (Baumann, 2006). Teofilin doğal olarak çay çekirdeklerinde bulunur. Criolla kakao çekirdeklerinde 3,7 mg/g kadar yüksek miktarlar rapor edilmiştir. Demlenmiş çaylarda da teofilin bulunur, ancak demlenmiş çay sadece 1 mg/L bulundurur buda terapötik dozdan önemli ölçüde daha azdır.

Teofilin' in ilk klinik kullanımı 1902 yılında diüretik olarak olmuştur. Teofilin kalpte pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etkilidir, zayıf diüretik etkisi bulunmaktadır. Kafein kadar olmasa da mide asit salgısını artırdığı bilinmektedir. Kronik astım ve akut astım hastalığında kullanılan bir ilaçtır ve terapötiik aralığının dar olması nedeniyle toksisite gelişmesine zemin hazırlamaktadır. En çok rastlanan yan etkisi bulantı ve kusmadır. Toksikite durumunda ise ölüm ile sonlanabilir (Barnes, 2005).

Teofilin hücre içinde olan fosfodiesteraz(FDE) enzimini hedef alarak bu enzimi inhibe eder. Bu şekilde bronş düz kaslarında gevşeme olur ve inflamatuvar hücre konsantrasyonunda azalma olur (Barnes, 2011).



Şekil 1.3. Kafeinin bileşenleri

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana türü İki adet düz flagellaya ve bir körelmiş haptonemaya sahip bir kokolitofordur. İki flagellada hücrenin uç kısmında bulunur. Yuvarlak hücreler 4-8 um çapındadır ve suda hızlı hareket ederken rotasyon hareketiyle yüzerler. Kloroplast hücrenin 1/3'ünü kapsar şekli ise fincana benzer (Güner ve Aysel, 1997; Koray, 2011). Bivalve larvalarının beslenmesinde *Isochrysis galbana* çok yaygın olarak kullanılır. Besin değeri oldukça yüksektir (Okauchi, 1991). Türün mikroskopik görüntüsü Şekil 2.1'de gösterildi. Aşağıda sistematikteki yeri verilmiştir.

Kingdom: Chromista

Phylum: Haptophyta

Class: Coccolithophyceae

Subclass: Prymnesiophycidaea

Ordo: Isochrysidales

Family: Isochrysidaceae

Genus: *Isochrysis*

Species: *Isochrysis galbana* Parke 1949 (URL-5)



Şekil 2.1. *Isochrysis galbana*

2.1.2. *Thalassiosira pseudonana*

Denizel bir diatom türü olan *Thalassiosira pseudonana* türü 2,5-15 um aralığında çapa sahip olup tek ya da zincirli hücrelerden oluşabilmektedir. *T.pseudonana* yüksek yağlı asit kompozisyona sahip olduğu için akuakültürde yararlı olan bir organizma olduğu bulunmuştur (Volkman ve diğ., 1989). *T.pseudonana* türü genom dizilemede ilk ökaryotik denizel fitoplankton olarak seçilmiştir (Armbrust, 2004). Türün mikroskopik görüntüsü Şekil 2.2de gösterildi. Aşağıda sistematikteki yeri verilmiştir.

Kingdom: Chromista

Phylum: Bacillariophyta

Class: Mediophyceae

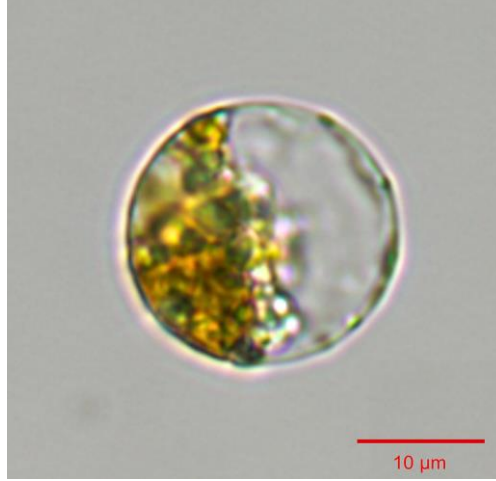
Subclass: Thalassiosiraphycidae

Ordo: Thalassiosirales

Family: Thalassiosiraceae

Genus: Thalassiosira

Species: *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal 1970 (URL-6)



Şekil 2.2. *Thalassiosira pseudonana*

2.2. Metot

2.2.1. Materyallerin toplanması ve muhafaza koşulları

2.2.2. Fitoplankton kültürlerinin ortam koşulları

I. galbana ve *T. Pseudonana* fitoplankton türleri National Center for Marine Algae and Microbioata (NCMA) Bigelow Laboratuvarlarından saf kültür olarak 15 mL'lik tüplerde satın alındı. Türlerin CCAP kültür numaralarına Tablo 2.1'de yer verildi.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan ve ticari olarak satın alınan fitoplankto türü ve CCAP kültür numaraları (URL-7; URL-8)

Türler	CCAP Kültür Numaraları
<i>Isochrysis galbana</i>	CCAP 1323
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCAP 1335

Saf kültürler halinde satın alınan fitoplankton türleri Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Araştırma laboratuvarında bulunan iklimlendirme kabininde muhafaza edildi. Kültürlerin çoğaltılması ve deneyler steril kabinde yapıldı. Çalışılan fitoplankton kültürünün sıcaklığı yaklaşık 15 °C'ta, f2 besin ortamında, 32,5 deniz suyu tuzluluğunda, pH 7,8-8,5 Aralığında, 14/10 gündüz gece ışık periyodunda tutuldu.

2.2.3. Çalışmada kullanılan malzemelerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan cam malzemeler, deniz suyu, selüloz tıpa, tüpler ve pipet uçları otoklavda 121°C'ta 20 dk steril edildi. Deniz suyu hazırlanırken 500 mL distile suya 18,4 g deniz tuzu eklendi. Karıştırıcıda manyetik balık yardımıyla yaklaşık 30 dakika karıştırıldı. Vakum pompası ile 47 mm, 0,22 µm açıklığa sahip membran filtre kâğıdından süzüldü. 500 mL balon jöjeye süzülen deniz suyu aktarıldı. Balon jöjenin ağzı alüminyum folyo kapatılarak 121°C'ta 20 dk süreyle otoklavda steril edildi.

2.2.4. Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması

Fitoplankton kültürü için SIGMA-GUILLARD'S f/2 besin ortamı kullanıldı. Steril kabinde 50 mL'lik santrifüj tüplerine alınan f/2 çözeltileri buzdolabında muhafaza edildi. Fitoplankton kültürlerine aktarılmadan önce toz halindeki teobromin ve teofilin oda sıcaklığında muhafaza edildi. Uygulanması gereken teobromin ve teofilin miktarları hassas terazide ölçüldü. Oda sıcaklığına ulaşması beklenildi. Teobrominin 100 mg/L'lik 500 mL stok çözeltisi hazırlandı. 100 mg teobromin 500 mL distile su ile temiz 500 mL'lik HDPE şişeye koyuldu. Daha sonra bu stok çözelti buzdolabında muhafaza edildi. Buzdolabında muhafaza edilen stok çözeltisinin fitoplankton kültürüne aktarılmadan önce buzunun erimesi ve oda sıcaklığına ulaşması için beklendi.

Tablo 2.2. F/2 besin ortamının içeriği

İçindekiler	Mg/L
Biyotin	0,005
Kobalt klorür 6H ₂ O	0,01
Küprük sülfat 5H ₂ O	0,01
EDTA disodyum 2H ₂ O	4,36
Ferrik klorür 6H ₂ O	3,15
Manganaz klorür 4H ₂ O	0,18
Sodyum molibdat 2H ₂ O	0,006
Sodyum nitrat	75,0
Sodyum fosfat monobazik	4,411
Tiamin HCl	0,1
Vitamin B12	0,005
Çinko sülfat	0,022

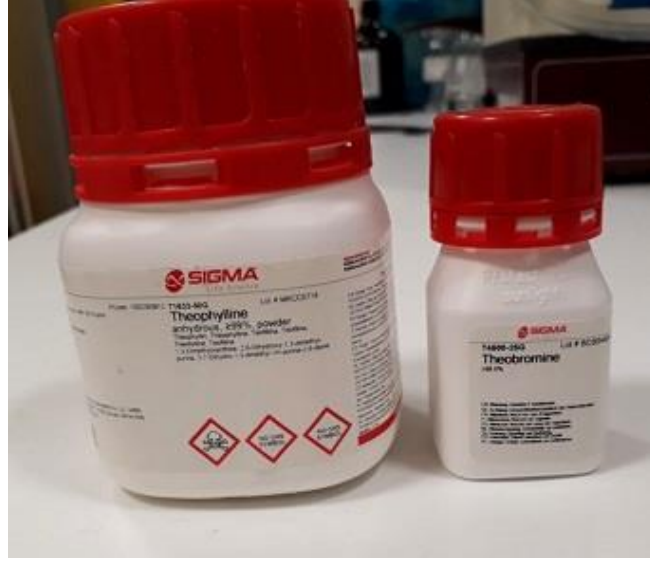
2.2.5. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler Tablo 2,3.'de verildi.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler

Cihaz, malzeme ve kimyasal adı	Özellikleri
Etil alkol	Merck
Bulaşık makinesi	Arçelik, 6230
Buzdolabı	Arçelik
Cam mezür 100 mL-- 500 mL	Isolab
Cam pipet 5 mL, 10 mL	Isolab
Deniz tuzu	Red Sea
Ependorf tüpü 1,5 mL	Isolab
Ependorf tüpü stantı	Isolab
Erlenmayer 250 mL	Isolab
F/2 çözeltisi	SIGMA GUILLARD'S (f/2)
Filtre kağıdı 0,22 µm	Whatman
Formaldehit	Merck
Hassas terazi	AND GR--200
Theophylline	Sigma--Aldrich
Karıştırıcı	Heidolph MR--Hei Standart
Kültür ortamı iklimlendirme kabin	SANYO, MIR--153
Nitrit asit	Merck
Otoklav	HICLAVE HG--20
Otomatik mikropipet 10--1000 µL	Nichipet EX
Otomatik pipet ucu (1 mL)	AXYGEN
Theobromine	Sigma-- Aldrich
pH metre	WTW Ph 315i/SET
Pipet pompası	Isolab
Selüloz tıpa	Isolab
Steril kabil	ESCO, PCR Cabinet
Thoma lamı	ISOLAB
Tuzluluk ölçer	Multi 3410 SET 7
Uzun boyunlu balon joje 500 mL	Isolab
Vakumlu filtre sistemi	Sartorius

Ayrıca çalışmada kullanılan theophylline ve theobromine Şekil 2.3' de verildi.



Şekil 2.3. Theophylline ve Theobromine

2.2.6. Teobromin ve teofilin fitoplankton kültürlerine aktarılması

Teobromin ve Teofilinin fitoplankton kültürlerine aktarılması, kültürlerin ekim işlemleri steril kabinde yapıldı. *I. galbana* ve *T. pseudonana* kültürleri için 250 mL Erlenmeyer içine 100 mL deniz suyu, 2 mL f/2 çözeltisi ve 10 mL bir önceki kültürden örnek alınarak ekim işlemi yapıldı, selüloz tıpa ile erlenmayerin ağzı kapatılarak inkübasyona bırakıldı (Şekil 2.3)



Şekil 2.4. İnkübasyona bırakılan türler

Çalışmada 0. saat, 12. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat olmak üzere farklı Teobromin ve Teofilinkonsantrasyonun fitoplankter türlerine uygulanması OECD 201standartı temel alınarak tamamlandı (OECD, 2011).

Teofilinkonsantrasyonu için gerekli olan miktarlar alüminyum folyo üzerinde hassas terazide tartıldı. İki gün öncesinde kültürlerin ekimi yapıldı ve etiketlendi.

T. pseudonana ve *I. galbana* kültürüne 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500mg/L konsantrasyona sahip olacak şekilde ölçülen Teofilin toz halinde kültürlerin içerisine döküldü, hafifçe çalkalayarak çözünmesi sağlandı. Kontrol kültürlerine Teofilin uygulanmadı.

Teobromin için stok çözeltisi hazırlandı ve stok çözeltide *I. Galbana* ve *T. pseudonana* türüne uygulandı. 1 mg/L, 10 mg/L, 100 ve 150 mg/L teobrominkonsantrasyonlarının her biri için birer kontrol grubuhazırlandı. Kültür kaplarının her birine 100 mL deniz suyu, 2 mL f/2 ve 10 mL bir önceki kültürden aşılandı. İki gün sonra teobromin uygulanması için inkübasyona bırakıldı.

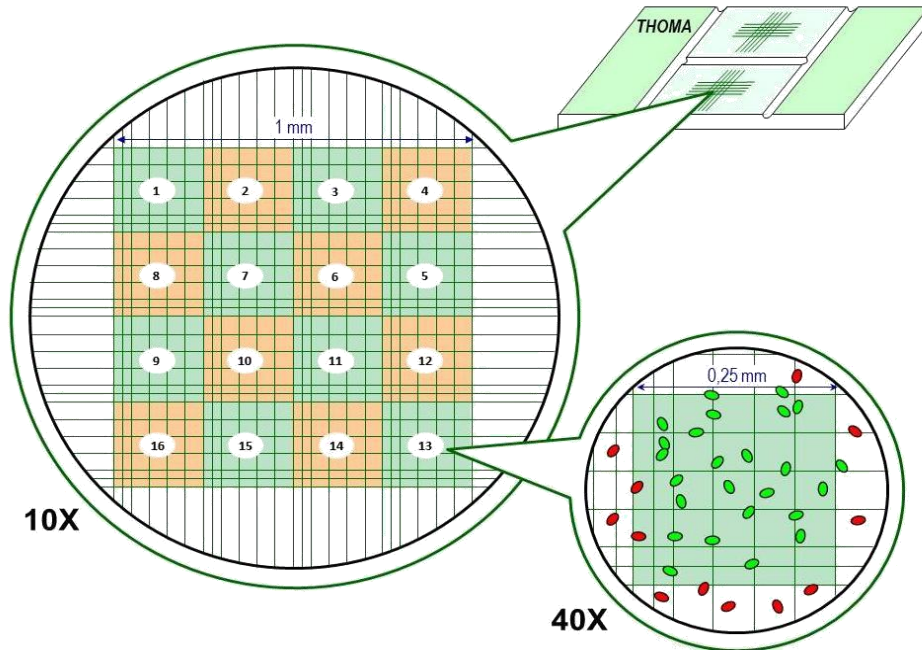
Kültür kapları etiketlendikten sonra 10 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L etiketli kültürlerden sırasıyla 5,7 mL, 57 mL, 85,5 mL örnek alındı. Alınan örnekler yerine hazırlanan teobromin stok çözeltisinden 5,6 mL, 56 mL, 84 mL, f2 çözeltisinden ise 1,5 mL eklendi. Her bir konsantrasyon için hazırlanan kontrol gruplarına stok çözelti yerine aynı oranda deniz suyu ve f/2 çözeltisi eklendi. Teobromin ve Teofilin uygulanan kültürler 96 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir 1 mL örnek ependorf tüpüne alındı ve alınan örneklere 100 µL %37'lik formaldehit ile fikse edildi.

2.2.7. Hücrelerin sayımı

Kültürlerden 0. 24. 48. 72. ve 96. saatlerde alınanfikse edilmiş örneklerThoma lamında inverted mikroskop kullanılarak hücre sayımları yapıldı. Her bir örnekten 100 µL alınarak sayım kamarasına yerleştirildi, örnekler üçer defa sayıldı ve aritmetik ortalamaları alındı.

Fitoplankton hücre sayımında kullanılan Thoma tipi sayım kamarasında en büyük karenin ebatları 1 mm x 1mm'dir. Sayım kamarasında büyük, orta ve küçük kareler

bulunur. Büyük bir karede genellikle 16 adet kare bulunur. Bu kareler 25 adet orta büyüklükte kareye, orta büyüklükte bir karede 25 adet küçük kareye sahiptir. Rastgele 5 tane orta büyüklükte kare seçilerek, bu karelerde kalın çizgilerle çevrelenmiş olan alan içerisinde kalan tüm hücreler mikroskop altında sayılır. Sayımı yapılan kareyi çevreleyen üst ve sol kenar çizgisine dokunan hücreler sayılırken, alt ve sağ kenar çizgisine dokunanlar sayılmaz (URL-9).



Şekil 2.5. Thoma lamı (URL-9)

Fitoplankton birey (hücre) sayısı (adet/mL) aşağıdaki Denklem 2.1.'e göre hesaplanabilir;

$$(N_1 + \dots + N_5) / 5 \times 16 \times (1000 / 0,1) = (N_1 + \dots + N_5) / 5 \times 16 \times 10000 \quad (2.1)$$

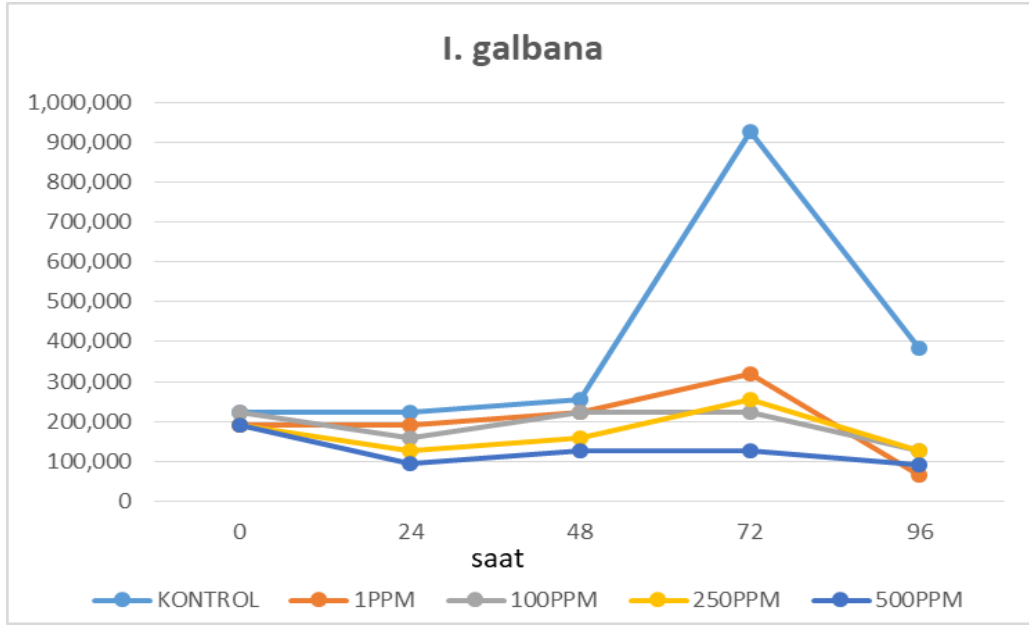
2.3. Verilerin İstatiksel Analizi

Sayımlar en az 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. 3 tekrarın aritmetik ortalaması alındı ve standart sapmaları hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *Isochrysis galbana* Türüne Teofilin'in Etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan Teofilin'in *I. galbana* türünün birey sayısında neden olduğu değişiklikleri Şekil 3.1' de gösterildi.



Şekil 3.1. Farklı Teofilin konsantrasyonlarının *I. galbana* birey sayısına etkisi

I. galbana türünün başlangıç (0. saat) birey sayısı 204.800 adet/mL iken 96. saatin sonunda birey sayıları 165.200 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 224.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla, 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

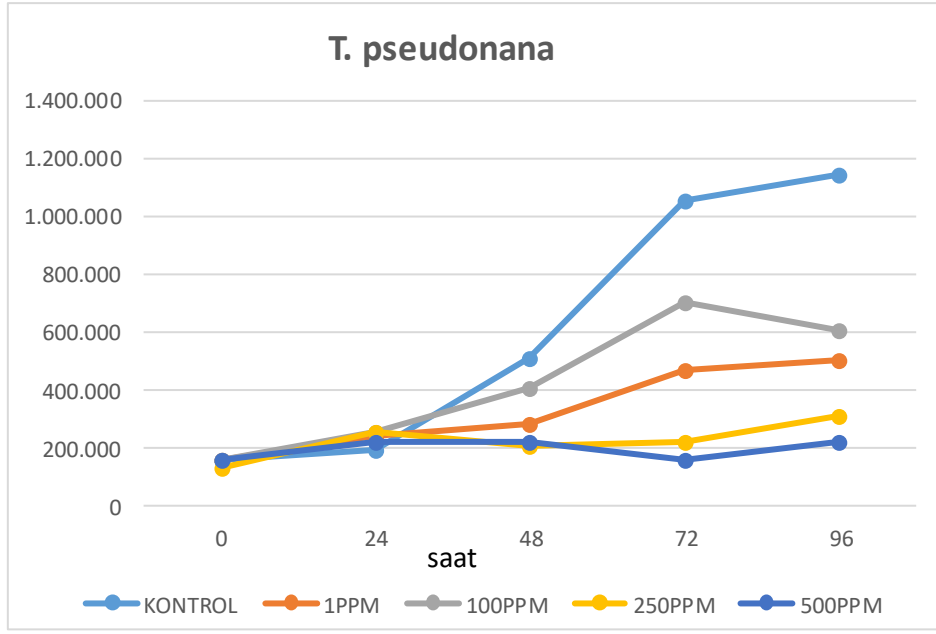
Kırk sekiz saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 256.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L - 250 mg/L eşit ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Yetmiş iki saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 928.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda kontrol grubu 384.000adet/mL birey sayısına ulaştı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 96 saat sonunda en yüksek birey sayısı 128.000 adet/mL ile 100 mg/L ve 250 mg/L Teofilin uygulanan grupta, en düşük birey sayısı 500 mg/L konsantrasyon uygulanan grubun birey sayısını etkilediği görüldü.

3.2. Thalassiosira pseudonana Türüne Teofilin Etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan teofili in *T.pseudonana* türünün birey sayısında neden olduğu değişiklikler Şekil 1.3' de gösterildi.



Şekil 3.2. Farklı Teofilin konsantrasyonlarının *T. pseudonana* birey sayısına etkisi

T. pseudonana türünün başlangıç (0. saat) birey sayısı 153.600 adet/mL iken 96. saatin sonunda birey sayıları 555.600 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 192.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha yüksek olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısına sahip olan kültürler 100 mg/L ve 250 mg/L daha sonra 1 mg/L en düşük birey konsantrasyonlarına sahip olan kültür 500 mg/L olduğu görüldü.

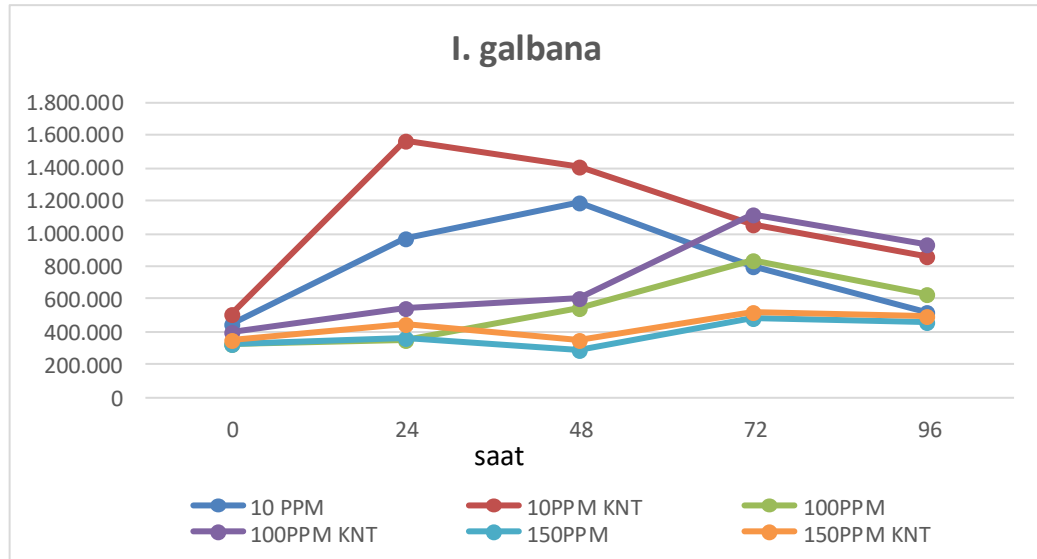
Kırk sekiz saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 512.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha yüksek olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 100 mg/L, 1 mg/L, 500 mg/L ve en düşük 250 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Yetmiş iki saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 1.056.000 adet/mL iken, teofilin uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha yüksek olduğu görüldü. Teofilin konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 100 mg/L, 1 mg/L, 250 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda kontrol grubu 1.144.000adet/mL birey sayısına ulaştı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 96 saat sonunda en yüksek birey sayısı 604.000 adet/mL ile 100 mg/L teofilin uygulanan grupta, en düşük birey sayısı 500 mg/L konsantrasyon uygulanan grubun birey sayısını etkilediği görüldü.

3.3. *Isochrysis galbana* türüne teobromin' in etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan Teobrominin *I. galbana* türünün birey sayısındaki değişiklikleri Şekil 1.4' de gösterildi.



Şekil 3.3. Farklı Teobromin konsantrasyonlarının *I.galbana* birey sayısına etkisi

I.galbana türünün başlangıç (0. saat) birey sayısı 392.000 adet/mL iken 96. saatin sonunda birey sayıları 649.333 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.568.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 968.000

adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 544.000adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun bireysayısının 352.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 448.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobrominkonsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 356.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobrominkonsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Kırk sekiz saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.408.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının1.184.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 608.000adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 544.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı352.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubunbirey sayısının 288.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobrominkonsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

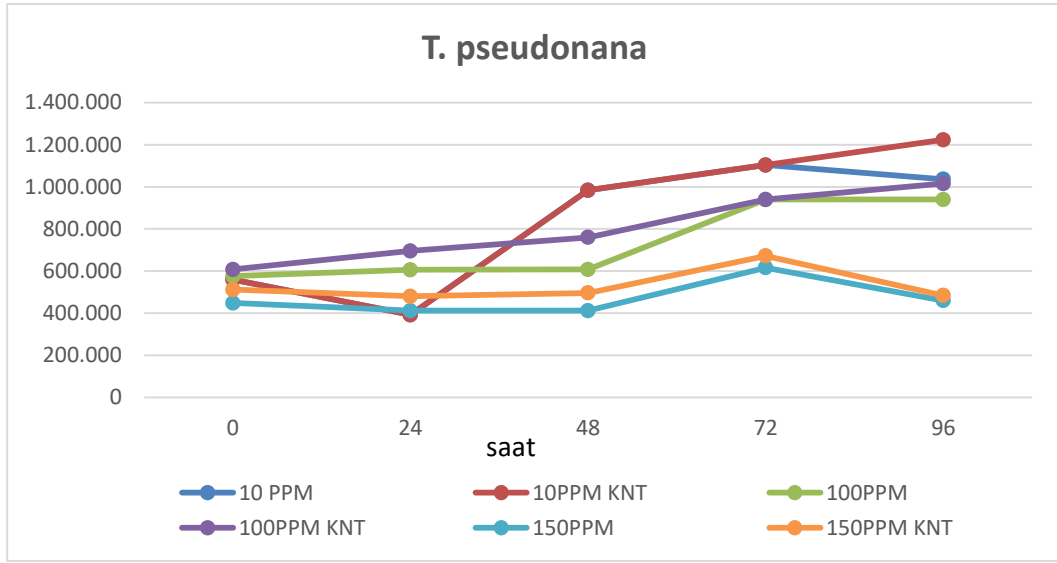
Yetmiş iki saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.056.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 800.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.120.000adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun bireysayısının 832.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 524.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubunbirey sayısının 480.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobrominkonsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 864.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 520.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 928.000adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 624.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 500.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobrominkonsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının

460.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobrominkonsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

3.4. Thalassiosirapseudonana türüne teobromin'in etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanan Teobromin in *T.pseudonana* türünün birey sayısındaki değişiklikleri Şekil 3.4' de gösterildi.



Şekil 3.4. Farklı Teobromin konsantrasyonlarının *T.pseudonana* birey sayısına etkisi

T.pseudonana türünün başlangıç (0. saat) birey sayısı 544.000 adet/mL iken 96. saatin sonunda birey sayıları 860.000 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 392.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 392.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 696.000 adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 606.000 adet/mL olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 480.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobrominkonsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 412.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobromin konsantrasyonu uygulanan gruplarından 100 mg/L ve 150 mg/L için birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Kırk sekiz saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 984.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 984.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 760.000 adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 608.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 496.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 412.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobromin konsantrasyonu uygulanan gruplardan yalnızca 150 mg/L için birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Yetmiş iki saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.104.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 1.104.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.280.000 adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 940.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 672.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 616.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobromin konsantrasyonu uygulanan gruplardan yalnızca 150 mg/L için birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.224.000 adet/mL iken, 10 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 1.036.000 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.016.000 adet/mL iken, 100 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 940.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 484.000 adet/mL iken, 150 mg/L teobromin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 460.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, farklı teobromin konsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Yeung (2006) tarafından yapılan bir çalışmada dinoflagellat türü olan *Cryptocodinium cohnii* türünde kafeinin hücre döngüsünü inhibe edici olduğu saptanmıştır.

Kumar (1964) tarafından yapılan bir çalışmada streptomisin'in düşük konsantrasyonlarda bile *Anacystis nidulans* ve *Anabaena variabilis* büyümesini önlemiştir. Streptomisin'in bu türlerin klorofil, karotenoid ve fikosiyanın pigmentlerinin üretimini önemli ölçüde inhibe edildiği belirlenmiştir.

Cleaver (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Daphnia sp.* ve yeşil alg *Scenedesmus subspicatus* türünde diklofenak, ibuprofen, naproksen ve asetilsalisilik asitin ekotoksitesitesi akut toksisite testi kullanılarak değerlendirilmiştir. EC₅₀ toksisite değerleri *Daphnia sp.* türünde 68-166 mg/L arasında ve *S. subspicatus* türünde 72-626 mg/L aralığında tespit edilmiştir.

Delorenzo (2008) tarafından çevreye giren ilaç ve kişisel bakım ürünlerinin suda yaşayan organizmalar üzerinde zararlı etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle yaptığı çalışmalarda ilaç ve bakım ürünlerinde çoğunlukla kullanılan simvastatin, klofibrinik asit, diklofenak, karbamazepin, triklosan ve fluoksetin su ortamlarında varlığını tespit etmiştir.

Statik akut biyolojik test protokolünü kullanarak altı adet ilaç ve kişisel bakım ürünleri fitoplankton türlerinden biri olan *Dunaliella tertiolecta* üzerine toksisite analizi uygulanmıştır. Teste tabi tutulan tüm ilaç ve kişisel bakım ürünleri *D. tertiolecta* popülasyonunun hücre yoğunluğu üzerinde kayda değer bir etkisi olmamıştır. Ancak test edilen ürünlerden sadece triklosan çevresel konsantrasyonlarda toksisite göstermiştir.

Martinez ve diğ., (2015) yaptıkları standart testler ile kafeinin, karbamazepin, ibuprofen ve novobiosin sucul ortamlarda çevresel konsantrasyonlarının yan etkileri, *Vibrio fischeri*'nin biyoluminesans tepkisi, *Isochrysis galbana* ve *Pseudokirchneriella subcapitata* büyüme inhibisyonu, *Paracentrotus lividus*'de dölleme, embriyo ve larva gelişmesi içeren dört organizmada yan etkileri saptanmıştır. Çalışmanın sonucu kafeinin mg/L düzeyinde olan çevresel konsantrasyonlarının mikroalg büyüme inhibisyonu ve bakteri biyoluminesans tepkisinin akut toksisite değerlerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Moore ve diğ., (2008) tarafından kafeinin tepkisel cevapları *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas* ve *Chironomus dilutes* üzerinde çalışılmıştır. Üç organizmada

0-200 µg/L aralığındaki çeşitli kafein konsantrasyonlarına 48 saat maruz bırakıldıktan sonra, üreme ve büyümede oluşan zararlar gibi akut tepkiler gözlenmiştir.

Domozych (1989), *Gloeomonas kupfferi* türünde yaptığı çalışmada kafeinin diktiyozom vezikül inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir.

Kafeinin metabolitleri olan teobromin ve teofilin daha önce deniz canlıları üzerinde çalışılmamıştır ancak teobromin ve teofilin'in sıçanlar ve insanlar üzerinde çalışmaları mevcuttur.

Bayar (1996) tarafından yapılan çalışmada günde 600 mg dozda teofilini rutin olarak kullanan bireyde, ana madde ve metabolitlerinin idrar ile atımları arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılan analizler sonucunda, Teofilin dozunun mol bazında atılım yüzdesi $14 \pm 2,7$ olarak bulundu. Toplam günlük geri kazanırlık ise $\%76 \pm 4$ olarak bulundu.

Erdoğan Y. (1983) tarafından bronş astımı olan hastalar üzerinde yapılan çalışmada hastalara belirli saatlerde serum Teofilin konsantrasyonu uygulandı tedavi öncesi ve 24 saat sonrasında solunum fonksiyon testleri yapılarak sonuçlar tartışıldı. İnfüzyon tedavisi uygulanan hastalarda 12. ve 24. saatlerdeki Teofilin düzeyi ve tedaviden sonraki solunum fonksiyonlarındaki düzelme yüksek bulundu ve bu tedavinin etkili olduğu izlendi.

Elibol M. (1992), tarafından yapılan çalışmada cimetidine ve Teofilin verilmiş sıçanların karaciğer parenkimasında görülen morfolojik değişiklikler, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bu amaçla sıçanlara 15 gün süreyle yalnız cimetidine, yalnız Teofilin ve her ikisi beraber değerlendirildi. Teofilin uygulanan grupta periportal alanda genişlemelerle, bağ dokusu artışı izlenmesine karşın karaciğer hücre plakları arasındaki sinüzoidlerde önemli genişlemeler gözlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyada en çok tüketilen kimyasallar arasında kafein yer almaktadır. Kafein, yerleşimin yoğun olduğu yerlerde, göl, akarsu, yer altı suyu ve deniz suyunda antropojenik indikatör olarak kullanılır. Bu çalışmada kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki metabolitlerden olan teobromin ve teofilinin, çevremizdeki deniz ekosistemlerinde de bulunan, deniz ürünleri yetiştiriciliğinde balık, kabuklu ve yumuşakçaların beslenmesinde de kullanılan, *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkileri araştırılmıştır. Kafein molekülünün bileşimindeki metabolitlerden olan teobromin ve teofilinin daha önce deniz ekosistemlerindeki etkilerinin incelenmemiş olması bizi bu çalışmayı yapmaya sevk etmiştir.

İlaçlar, atık suyla ya da doğrudan insan ve hayvan atılımı ile çevreye salınır. İnsanlar tarafından kullanılan pek çok ilacın tamamen metabolize edilmediğini bilinmektedir. Bu ilaçlar vücuttan atılır bir kısmı ise dönüştürülür veya polar moleküle bağlanabilir. Bu moleküller kolaylıkla atıksu arıtma işlemleri sırasında ayrılabilir ve ilaçlar sucul ortamda bulunabilirler (Heberer, 2002).

Kafeinin etken maddesi olan teobromin ve teofilin'in atık olarak çevreye geçtiklerinde oluşabilecek zararlı etkilerinin değerlendirilmesi, bunların yerüstü ve yeraltı su kaynaklarına geçen miktarlarının izlenmesi yakın gelecekte ciddi problemlerin önlenmesi açısından önem verilmesi gereken bir konudur. Bu metabolitler idrar yoluyla su ekosistemlerine karışarak bu organizmaları etkilemekte ve bunun sonucunda da ekosisteme zarar vermektedir.

Günümüzde sucul yaşamın dengesinin bozulması ile balık çiftlikleri hızla gelişip çoğalmakta ve bunun sonucunda çevrenin zarar görmesi gözardı edilmektedir. Bu zararın miktarını belirlemek ve önlemlerin alınmasını sağlamak açısından bu çalışmayı yaptık.

KAYNAKLAR

Aguirre Martinez G. V., Owour M. A., Garrido Perez C., Salamanca M. J., Del Valls T. A., Martin Diaz M. L., Are Standard Tests Sensitive Enough to Evaluate Effects of Human Pharmaceutics in Aquatic Biota? Facing Changes in Research Approaches When Performing Risk Assessment of Drugs, *Chemosphere*, 2015, **120**, 75–85.

Armbrust E. V., The Genome of the Diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, Evolution and Metabolism, *Science*, 2004, **306**(5693), 79–86.

Atay Ş., Kirilenmiş Su Ortamının Ekotoksikolojik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 2009, 233102.

Barnes PJ., Theophylline in chronic obstructive disease: new horizons. Proc Am Thorac Soc., 2005, 2(4), 334-339.

Barnes PJ., Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics.,12th ed., McGraw-Hill ,2011.

Barone JJ., Roberts H. R., *Food and Chemical Toxicology*, 1st ed., London, 1996.

Baumann TW., Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee- and glimpse of metabolite profiling. Braz. J. Plant Physiol, 2006, 18(1), 243-251.

Bayar C., Kafein Ve Teofilin Metabolizmaları Arasında Etkileşim, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Ankara, 1996, 48101.

Boyd G. R., Reemtsma H., Grimm D. A., Mitra S., Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Surface and Treated Waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada, *Science of the Total Environment*, 2003, **311**(1–3), 135–149.

Buerge I. J., Poiger T., Buser H., Wa C., Caffeine;; an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters, *Environmental Science and Technology*, 2003, **37**(4), 691–700.

Burkiewicz K., Synak R., Tukaj Z., Toxicity of Three Insecticides in a Standard Algal Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, **74**(6), 1192–1198.

Burton G. A., Allen G., Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1991, **10**(12), 1585–1627.

Cleuvers M., Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. Ecotoxicology and environmental safety, 2004, 59.3: 309-315.

Delorenzo M. E., Flemming J., Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*, *Arch Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **54**(2), 203–210.

Doğan M., Saylak M., *Su kimyası*, Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri, 2000.

Domozych D. S., The Disruption of Dictyosomae Integrity by Caffeine in the Green Algae Flagellate *Gloeomonas kupfferi*, *Journal of Cell Science*, 1989, **93**(2), 375–382.

Duman E., Atıksuların Fenton Oksidasyonu ile Arıtılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006, 182342.

Elibol M., Cimetidine ve Theophylline'nin Sıçan Karaciğeri Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1992, 111722.

Ferreira A. P., Caffeine as an Environmental Indicator for Assessing Urban Aquatic Ecosystems, *Caderno de Saude Publica*, 2005, **21**(6), 1884–1892.

Güner H., Aysel V., *Algoloji Laboratuvar Uygulama Kılavuzu*, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 1997.

Heberer T., Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: a Review of Recent Research Data, *Toxicology letters*, 2002, **131**(1–2), 5–17.

İpşiroğlu M., Kafein ve Paraksantin Bazı Fitoplankton Kültürleri Üzerindeki Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 436220.

Koray T., *Denizel Fitoplankton*, 3. Basım, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2011.

Kumar H. D., Streptomycin and Penicilin Induced Inhibition of Growth and Pigment Production in Blue--green Algae and Production of strains of *Anacystis nidulans* Resistant to These Antibiotics., *Journal of Experimental Botany*, 1964, **15**(2), 232–250.

Kurissery S., Kanavilli N., Verenitch S., Mazumder A., Caffeine as an Anthropogenic Marker of Domestic Waste: A study from Lake Simcoe Watershed, *Ecological Indicators*, 2012, **23**, 501–508.

Lavens P., Sorgeloos P., Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, *FAO Fisheries Technical Paper*, 1996, 361, 10–16.

Manahan S. E., *Environmental Chemistry*, 7. Basım, CRC Press, Florida, 2000.

Metcalf C. D., Koenig B. G., Bennie D. T., Servos M., Ternes T., Hirsch R., Occurrence of Neutral and Acidic Drugs in the Effluents of Canadian Sewage Treatment Plants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, **22**(12), 2872–2880.

Moore M. T., Greenway S. L., Farris J. L., Guerra B., Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern Using Conventional Approaches, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **54**(1), 31–35.

Oberholster P. J., Botha A. M., Cloete T. E., Using a Battery of Bioassays, Benthic Phytoplankton and the AUSRIVAS Method to Monitor Long-term Coal Tar Contaminated Sediment in the Cache la Poudre River, Colorado, *Water Research*, 2005, **39**(20), 4913–4924.

OECD Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, *Organisation for Economic Cooperation and Development Publishing*, Test no: 201, 1–25, 2011.

Ofluoğlu F. E., Ratlarda Beyin L--Arginin Metabolizması Üzerine Kafeinin Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007, 194218.

Okauchi M., The Status of Phytoplankton Production in Japan;; Rotifer and Microalgae Culture Systems, *Proceeding of a US-Asia Workshop*, Honolulu, USA, 28–31 Ocak 1991.

Parlak H., Arslan Ö. Ç., Boyacıoğlu M., Karaaslan M. A., *Ekotoksikoloji Ders Kitabı*, 2. Basım, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2011.

Rand G. M, Wells P. G., McCarty, L. S., *Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Applications*, Hemisphere Publishing Corporation, Michigan-USA, 1985.

Rand G. M., Petrocelli S. R., Introduction, Editors: Rand G. M., Petrocelli S. R., *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1–28, 1985.

Siegener R., Chen R. F., Caffeine in Boston Harbor Seawater, *Marine Pollution Bulletin*, 2002, **44**(5), 383–387.

URL-1:<http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/denizcilik/moduller/fitoplankton-kulturu.pdf> (Ziyaret tarihi: 3 Kasım 2018)

URL-2: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kafein> (Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2018)

URL-3: <https://en.wikipedia.org/wiki/Teobromin> (Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2018)

URL-4: <https://en.wikipedia.org/wiki/Teofilin> (Ziyaret tarihi: 20 Nisan 2018)

URL-5:https://algaebase.org/search/species/species_id=s70a3641a7a16c580 (Ziyaret tarihi: 18 Nisan 2018)

URL-6: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=32239 (Ziyaret tarihi: 18 Nisan 2018)

URL--7: <https://ncma.bigelow.org/ccmp1323#.VmXV3uOLSu4> (Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2018)

URL--8: <https://ncma.bigelow.org/ccmp1335#.VmXWkeOLT--Y> (Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2018)

URL--9: http://insilico.ehu.es/counting_chamber/thoma.php (Ziyaret tarihi: 12 Şubat 2018)

Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I., Garland C. D., Fatty Acid and Lipid Composition of 10 species of Microalgae Used in Mariculture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1989, **128**(3), 219–240.

Walker C. H., Hoplin S. P., Sibley S. P., Peakall D. B., *Principles of Ecotoxicology*, 4 nd ed., Routledge, 2012.

Yeung P. K. K., Lam C. M. C., Ma Z. Y., Wong Y. H., Wong J. T. Y., Involvement of Calcium Mobilization from Caffeine-sensitive Stores in Mechanically Induced Cell Cycle Arrest in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, *Cell Calcium*, 2006, **39**, 259–274.

Yu M., *Environmental Toxicology, Biological and Health Effects of Pollutants*, 2 nd ed., CRC press, Florida, 2005.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

İzzet Noyan Yılmaz, Halim Aytekin Ergul, Sinan Mavruk, Seyfettin Tas, Halim Vedat Aker, Melek Yıldız, Bayram Ozturk, Coastal Plankton Assemblages in the Vicinity of Galindez Island and Neumayer Channel (Western Antarctic Peninsula) during the First Joint Turkish-Ukrainian Antarctic Research Expedition, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **18** (4), (2018).

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Pendik İstanbul'da doğdu, 2011 yılında Tuzla Teknik Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen--Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2015 yılında mezun olduktan sonra, 2015 Eylül ayında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.