



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

ÇOKLU STRESİN DENİZKESTANESİ *ARBACIA LIXULA*
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ÇOK DİSİPLİNLİ OLARAK
ARAŞTIRILMASI

Berna ŞAHİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Önder KILIÇ

Haziran, 2023

İSTANBUL

Bu alışma, [14.06.2023] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Biyoloji Anabilim Dalı], [Genel Biyoloji Programında] [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Önder KILIÇ] (Danışman)
[İstanbul Üniversitesi]
[Fen Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Murat BELİVERMİŞ]
[İstanbul Üniversitesi]
[Fen Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Halim Aytekin ERGÜL]
[Kocaeli Üniversitesi]
[Fen Edebiyat Fakültesi]

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 38641 numaralı Öncelikli Alan Araştırma projesi ile desteklenmiştir. |

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Önder Kılıç'a çok teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca bütün sorularımı içtenlikle yanıtlayan ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Murat Belivermiş'e teşekkür ederim.

Aynı zamanda laboratuvar çalışmasındaki destekleri ve arkadaşlıklarından dolayı canım arkadaşım Selcan Demiralp başta olmak üzere; Dr. Narin Sezer'e ve Melis Ekerbiçer'e teşekkür ederim.

Araziden canlıların toplanmasında büyük emeği geçen değerli hocam Doç. Dr. Onur Gönülal'a ve Orhun Hisli'ye teşekkür ederim.

Ayrıca histopatolojik analizlerin yapılmasında emeği yadsınamaz değerli hocam Prof. Dr. Engin Kaptan'a ve Suna Bektaş'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte tüm destekleri ile bana güç veren ve eğitim hayatım boyunca her zaman benim yanımda olan ablam Betül Şahin'e, annem Ülkenur Şahin'e ve kardeşim Umut Fehmi Şahin'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca TÜBİTAK'a sağladığı 2210/A burs desteğinden dolayı teşekkür ederim. |

Haziran 2023

|Berna ŞAHİN|

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1.DENİZ EKOSİSTEMİNDE PLASTİK KİRLİLİĞİ.....	3
2.1.1.Mikroplastikler	6
2.1.1.1. Mikroplastığın Deniz Biyotasında Birikimi	9
2.1.1.2. Mikroplastığın Biyotaya Etkileri	11
2.2.DENİZ EKOSİSTEMİNDE LANTAN KİRLİLİĞİ.....	12
2.2.1.Deniz Biyotasında Lantan Birikimi.....	13
2.2.2. Lantan'ın Biyota Üzerine Etkileri	14
2.3.OKYANUS ASİTLENMESİ VE KARBONAT KİMYASI	16
2.3.1. Okyanus Asitlenmesinin Deniz Biyotası Üzerine Etkileri	18
2.4.DENİZ BİYOTASI ÜZERİNE ÇOKLU STRESÖR ETKİSİ	21
2.5.ARBACİA LİXULA	23
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	30
3.1.DENİZKESTANELERİNİN TOPLANMASI VE DENEY SETİNİN OLUŞTURULMASI	30
3.2.OKYANUS ASİTLENMESİ MARUZİYETİ	32
3.3.TOPLAM PH (PH _T) KALİBRASYONU	33
3.4.MİKROPLASTİK VE LANTAN MARUZİYETİ	33
3.5.SOLUNUM ORANI ÖLÇÜMÜ	35
3.6.SÖLÖM SIVISI ÖRNEKLERİNİN ALINMASI, SÖLÖMOSİT SAYIMI VE ORGANİZMA DİSEKSİYONU	37
3.7.HİSTOPATOLOJİK ANALİZ.....	39

3.8.VERİLERİN İSTATİSTİK ANALİZİ	40
4. BULGULAR.....	41
4.1.MORTALİTE.....	41
4.2.SÖLOMOSİT SAYIM SONUÇLARI	41
4.3.SOLUNUM TESTİ SONUÇLARI	44
4.4.HİSTOPATOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI.....	45
4.5.TARTIŞMA VE SONUÇ	48
4.6.TOPLAM SÖLOMOSİT VE SÖLOMOSİT YAŞAYABİLİRLİĞİ	49
4.7.SOLUNUM ORANI	53
4.8.HİSTOPATOLOJİK ETKİLER.....	54
5. KAYNAKLAR	59
6. ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Küresel plastik üretiminin yıllara göre değişimi.....	4
Şekil 2.2: Deniz ekosistemlerindeki mikroplastik kaynakları.....	7
Şekil 2.3: Sanayi devrimi öncesi ve sonrası CO ₂ konsantrasyonundaki değişim ve son yıllardaki dramatik artış.....	16
Şekil 2.4: Atmosferdeki CO ₂ 'nin deniz suyu tarafından absorpsiyonu sonucu deniz suyu ile oluşan reaksiyonları.....	17
Şekil 2.5: Gastropod <i>Hexaplex trunculus</i> , <i>Osilinus turbinatus</i> , <i>Patella rustica</i> ve <i>Patella caerulea</i> türlerinin ortam pH'ı, orta pH, düşük pH seviyelerinde maruziyet sonrası kabuk değişimleri..	20
Şekil 2.6: Denizkestanesi anatomisi ve morfolojisi	27
Şekil 2.7: 10 µm'de denizkestanesi sölomositleri.....	29
Şekil 3.1: Deney setinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.2: Solunum oranı ölçüm deneyi.	36
Şekil 3.3: Denizkestanesinden sölom sıvısı alımı.	37
Şekil 3.4: Denizkestanesi diseksiyonu.	39
Şekil 4.1: Denizkestanesi sölom sıvısında fagosit sayısı ve yaşayabilirliği.....	41
Şekil 4.2: Denizkestanesi sölom sıvısında renksiz sferül sayısı ve yaşayabilirliği.....	42
Şekil 4.3: Denizkestanesi sölom sıvısında kırmızı sferül sayısı ve sferül yaşayabilirliği.....	42
Şekil 4.4: Denizkestanesi sölom sıvısında kırmızı sferül hücrelerinin renksiz sferül hücrelerine oranları.....	43
Şekil 4.5: Denizkestanesi sölom sıvısında titreşimli hücre sayısı ve yaşayabilirliği	43
Şekil 4.6: Toplam sölomosit ve yaşayabilirliği.....	44
Şekil 4.7: Denizkestanesi ağırlığı ve birey başına düşen solunum oranları	44
Şekil 4.8: Denizkestanesi özofagus dokusunun enine kesiti.....	45
Şekil 4.9: Hematoksilen-Eozin boyama ile doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus kesitleri	45

Şekil 4.10: Periyodik asit-Schiff boyama ile doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus kesitleri.....	46
Şekil 4.11: Denizkestanesi özofagusu epitel kalınlığı ve kript uzunluğu	47



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Plastik türleri ve kullanım alanları.	5
Tablo 2.2: Çeşitli plastik polimerlerinin yoğunluk değerleri ve doğada parçalanma süreleri.	6
Tablo 2.3: Mikroplastiklerin özelliklerine göre sınıflandırılması.	8
Tablo 2.4: <i>Arbacia lixula</i> türünün sınıflandırması.	23
Tablo 3.1: Her tekrar ve Saros su örneği için pH _T sonuçları.	33
Tablo 3.2: Deneyde uygulanan pH _T , MP ve La değerleri.	35

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
p	: Parsiyel basınç
M	: Molar
n	: Organizma sayısı
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
atm	: Atmosferik basınç
μatm	: Mikroatmosferik basınç
μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
Ω	: Kalsiyumkarbonat doygunluğu
cm	: Santimetre
g	: Gram
mmt	: Milyon metrik ton
Mt	: Metrik ton
kg	: Kilogram
mM	: Milimolar
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
m	: Metre
mm	: Milimetre
$ppmv$	: Milyon hacim başına parça
ppm	: Milyon başına parça

Kısaltmalar	Açıklama
OA	: Okyanus asitlenmesi
MP	: Mikroplastik
La	: Lantan
PET	: Polietilen tereftalat

PP	: Polipropilen
PS	: Polistren
PE	: Polietilen
PA	: Poliamid (naylon)
PVC	: Polivinilklorür
YYPE	: Yüksek yoğunluklu polietilen
DYPE	: Düşük yoğunluklu polietilen
UV	: Ultraviyole
NTE	: Nadir toprak elementi
PAS	: Periyodik-asit Schiff
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	: Egzatik asit
Y	: İtiryum
Sm	: Samaryum
Gd	: Gadolinyum
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
OI	: Okyanus ısınması
Ca	: Kalsiyum
H₂CO₃	: Karbonik asit
HCO₃	: Bikarbonat
CO₃⁻	: Karbonat iyonu
Ct₀	: Başlangıç çözünmüş oksijen konsantrasyonu
SO	: Denizkestanesi gramı başına solunum oranı
Ct₁	: Bir buçuk saat sonraki çözünmüş oksijen konsantrasyonu
M	: Bir denizkestanesinin yaş ağırlığı
t	: Test süresi
LaCl₃	: Lantanklorür
H⁺	: Hidrojen iyonu
Atmos	: Atmosfer
ROS	: Reaktif oksijen türleri
O₂	: Oksijen
CO₂	: Karbondioksit
Mg	: Magnezyum
NO	: Nitrikoksit

Li	: Lityum
OL	: Özofagus lümeni
CaCO₃	: Kalsiyum karbonat
Ort.	: Ortalama
Aq	: Su
Ci	: İnorganik karbon
NH₂	: Amin
COOH	: Karboksilik asit
Ag	: Gümüş
NP	: Nanoplastik
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Ce	: Seryum
Nd	: Neodimyum
Eu	: Evropiyum
HCl	: Hidroklorik asit
La³⁺	: Lantan iyonu
H₂O	: Su
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
EC50	: Yarım maksimum etkili konsantrasyon
LC50	: Letal konsantrasyon
C_ç	: Çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu
NBS	: Yaş ağırlık
pH_T	: Total pH
K_{sp}	: Çözünürlük sabiti

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇOKLU STRESİN DENİZKESTANESİ *ARBACIA LIXULA* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ÇOK DİSİPLİNLİ OLARAK ARAŞTIRILMASI

Berna ŞAHİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Önder KILIÇ

Son zamanlarda artan sanayileşme ve kentleşme ile birlikte çevreye yüksek miktarda CO₂ emisyonu yapılmaktadır. Deniz yüzey suyu tarafından absorbe edilen atmosferik CO₂ deniz suyundaki H⁺ iyonlarının konsantrasyonunu arttırmakta ve böylece deniz ekosistemlerinde pH düşüşüne neden olmaktadır. Birçok araştırma deniz ekosistemlerinin önemli bir kirleticisi olan mikroplastiklerin toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yoğun plastik deşarjı nedeniyle deniz ekosistemlerinde MP konsantrasyonları zamanla artmaktadır. Denizel ekosistemlerde bir diğer önemli kirletici grubu ise yenilikçi teknolojilerde ve tıbbi uygulamalarda yaygın kullanımı ile artış eğilimi göstermekte olan nadir toprak elementleridir (NTE). Tüm bu antropojenik faaliyetler ekosistemlerin sürdürülebilirliği üzerindeki stresi artırmaktadır. Deniz organizmaları antropojenik faaliyetlerin bir sonucu olarak çeşitli stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Okyanus asitlenmesi ile birlikte, mikroplastikler ve NTE'lerden lantanın artan kullanımı deniz türleri üzerindeki etkileri nedeniyle önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı bahsi geçen stres faktörlerinin (düşük pH: pH_T: 7,45, polietilen MP: 26 µg L⁻¹ ve La: 9 µg L⁻¹) denizkestanesi *Arbacia lixula* türünün fizyolojisi ve histolojisi üzerindeki tekli ve birleşik etkilerini araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda, Ege Denizi'nin kuzeydoğusunda yer alan Saros Körfezi'nden *A. lixula* türü erişkin denizkestaneleri toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Deney seti üç kirleticinin tekli ve birleşik olarak uygulanması sebebiyle 8 akvaryumu içerecek şekilde tasarlanmıştır. Laboratuvara getirilen organizmalar 9 gün süreyle laboratuvar koşullarına (20 ± 2 °C, pH_T: 8,00 ve tuzluluk: 38) alıştırılmıştır. Daha

sonra 14 gün boyunca stresörlerin tekli ve birleşik uygulamalarına maruz bırakılmışlardır. Tüm deney üç tekrardan oluşacak şekilde yapılmıştır. OA, MP ve La'nın denizkestaneleri üzerindeki fizyolojik ve histolojik etkileri; solunum hızı, histopatolojik değişim, sölomositlerin sayısı ve canlılığı dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre stresörlerin 14 gün boyunca denizkestanelerinde ölüme yol açmadığı belirlenmiştir. Sölomosit canlılığının genel olarak uygulanan stresörlerden etkilenmediği ancak toplam sölomosit sayısının bu stresörlerden daha düşük düzeyde etkilendiği belirlenmiştir. Sölomosit canlılığının özellikle üçlü stres grubunda (OA-MP-La) baskılandığı tespit edilmiştir. Solunum hızının ise uygulanan stresörlerden anlamlı düzeyde etkilenmediği belirlenmiştir. Histolojik inceleme sonucuna göre kontrol grubuna kıyasla OA-La, MP, MP-La ve OA gruplarında kript uzunluğunda kısalma ve epitel kalınlığında incelmeler tespit edilmiştir. Bu sonuçlar kript yapısında bir atrofiye işaret etmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar farklı seviyelerde ve daha uzun süreli maruziyetlerde uygulanan stresörlerin kronik etkilerini daha iyi anlamak için çok yönlü araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yapılacak benzer çalışmalarda moleküler tekniklerin de uygulanacağı tamamlayıcı analizlere ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Haziran 2023, 103 sayfa.

Anahtar kelimeler: Okyanus asitlenmesi, mikroplastik, lantan, birleşik etki, denizkestanesi

SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

**[MULTIDISCIPLINARY INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF
MULTIPLE STRESS ON THE SEA URCHIN *ARBACIA LIXULA*]**

[Berna ŞAHİN]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor: [Prof. Dr.] [Önder KILIÇ]

Recently, a high amount of CO₂ emission enters the environment through increasing industrialization and urbanization. Atmospheric CO₂, which is absorbed by marine ecosystems, increases the concentration of H⁺ ions in the seawater; thus, it induces a decline of pH in seawater. Many studies indicated that microplastics, a prominent pollutant of marine ecosystems, have toxic effects. Due to intense discharges of plastics, the concentrations of MP increase in marine ecosystems over time. The other important pollutant group in marine ecosystems is rare earth elements which tend to increase in marine ecosystems by increasing the use of innovative technologies and medical applications. All those anthropogenic activities increase the stress on the sustainability of ecosystems over time. Marine organisms are exposed to various stressors as a result of anthropogenic activities. Ocean acidification, microplastics and lanthanum from NTEs are of importance due to their increasing trends and effects on marine species.

The main purpose of the present study is to investigate the single and combined effects of three stressors (low pH: pH_T: 7,45, polyethylene MP: 26 µg L⁻¹ and La: 9 µg L⁻¹) on the physiology and histology of sea urchin *Arbacia lixula*. Adult sea urchins were collected from Saros Bay,

northeast Aegean Sea and they were transported to the laboratory. The experimental setup derived from 8 aquariums on the basis of full factorial design. They were acclimated to the laboratory conditions for 9 days (20 ± 2 °C, pH_T: 8,00 and salinity of 38). Then, they were exposed to single and combined stressors for 14 days. The experiment repeated three times to obtain three replications. The physiological and histological effects of OA, MP and La on the sea urchins were evaluated by considering respiration rate, the quantity and viability of coelomocytes, and histopathology. According to the results, the stressors did not lead to mortality in the sea urchins. Coelomocyte viability was the most affected, however, the total coelomocytes were slightly affected by the stressors. The coelomocyte viability was suppressed most in the triple stressor group (OA-MP-La). The respiration rate was not affected by stressors. According to the histological examination results, crypt lengths were shorter and epithelial layers were thinner in the OA-La, MP, MP-La and OA groups compared to the control group. These results indicate an atrophy in the crypt structure.

We need further studies to better understand the chronic effects of those stressors with different levels and extended exposure periods. Furthermore, it is seen that there is a need for complementary analyzes in which molecular techniques will also be applied in the similar studies. |

June 2023, |103| pages.

Keywords: |Ocean acidification, microplastic, lanthanum, combined effect, sea urchin |

1. GİRİŞ

Son yıllarda artan insan kaynaklı aktivitelerin baskısı ile birlikte sucul ekosistemlerin doğrudan ya da dolaylı olarak etkilendiği bilinmektedir. Söz konusu aktiviteler sonucu ortaya çıkan önemli küresel etkilerden biri okyanus asitlenmesidir. Okyanus asitlenmesi (OA) kısaca atmosferik karbondioksitin (CO_2) okyanus veya deniz yüzey suyuna absorbe olması ve bu ortamda su ile reaksiyona girerek hidrojen (H^+) iyonlarının artması sonucu suyun pH'ının düşmesi olayıdır (Gattuso ve Hansson, 2011). Bu durumun ortaya çıkmasındaki en önemli sebep fosil yakıtların yanması sonucu oluşan atmosferik CO_2 emisyonudur (Guinotte ve Fabry, 2008). Yapılan projeksiyonlar doğrultusunda artan atmosferik CO_2 'den dolayı bu yüzyılın sonunda okyanus sularında pH'ın 0,2 ile 0,4 birim arasında düşeceği tahmin edilmektedir (FAO, 2019). Söz konusu pH düşüşünün deniz yaşamı üzerinde olumsuz yönde etkisi olacağı düşünülmektedir. Bu durumun meydana gelmesi ile birlikte özellikle midye, istiridye ve denizkestanesi gibi denizel ekosistemlerde bulunan kalsiyum karbonat kabuk yapısına sahip canlılarda kalsifikasyon işleminde düşüş meydana gelmektedir (Gattuso ve Hansson, 2011). Böylesi bir etkilenme sonucunda canlıların kabuklarını oluşturan kalsiyum karbonat yapımında sorunların ortaya çıkması ve kabuklarda renk açılması gibi durumlar gözlenmektedir (Duquette ve diğ., 2017). Ayrıca, böyle bir sorunla karşılaşan canlıların kabuk geliştirmek için harcadıkları fazla enerjiden dolayı üreme gibi hayati aktivitelerde enerjileri yetersiz kalmaktadır (Ishimatsu ve Kita, 1999; Ishimatsu ve diğ., 2004, 2005).

Sucul ekosistemleri etkileyen diğer başlıca stres kaynaklarından biri de plastik kirliliğidir. Özellikle su ortamında bulunan mikroplastiklerin (MP) miktarı giderek artan bir endişe kaynağı olmaktadır (Cole ve diğ., 2011; Andrady, 2011). Mikroplastik, boyutları itibariyle canlı tarafından kolayca alınabilmekte ve biriktirilebilmektedir. Bununla birlikte, plastikler dolaylı şekilde okyanus asitlenmesi ve küresel ısınmaya da neden olmaktadır (CIEL, 2019). Amerika Birleşik Devletleri'nde plastikler için hammadde olarak kullanılan doğalgazın çıkarılması ve taşınması sürecinde yılda 12,5 ile 13,5 milyon metrik ton CO_2 salındığı tahmin edilmektedir (CIEL, 2019). Ek olarak doğalgaz çıkarımı sırasında tahrip edilen yeşil alanlar ve bozulan alanlar sonucunda sera gazı emisyonları oluşmasıyla da OA ve küresel ısınmaya neden olmaktadır (CIEL, 2019).

Son zamanlarda yenilikçi teknolojik aletlerin üretiminde kullanılan lantanın (La) su ortamına salınımı ile sucul organizmalarda stres etkisi oluşturabileceği düşünülmektedir. Yarı toprak metali olan La doğada düşük miktarda bulunmasına rağmen kullanım alanlarının artmasıyla birlikte denizel çevreye artan konsantrasyonlarda deşarjları olacaktır. Endüstriyel kullanımı çok yeni olmasından dolayı canlılar üzerindeki etkilerine dair çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla La'nın denizel organizmalarda birikimine ve bu organizmalar üzerinde oluşturacağı etkilerine dair çeşitli araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Derisidikenlilerden *Arbacia lixula* bazı ülkelerde besin olarak tüketilen, ekonomik önemi bulunan, ekosistem dengesi bakımından önemli bir rolü olan ve dünya çapında yaygın bir dağılıma sahip olan bir denizkeşanesi türüdür. Son yıllarda önemi artan plastik kirliliği ve okyanus asitlenmesi çalışmalarında kullanılan omurgasızların evrimsel açıdan gelişmiş türlerinden biri olması sebebiyle *A. lixula* tercih edilmektedir.

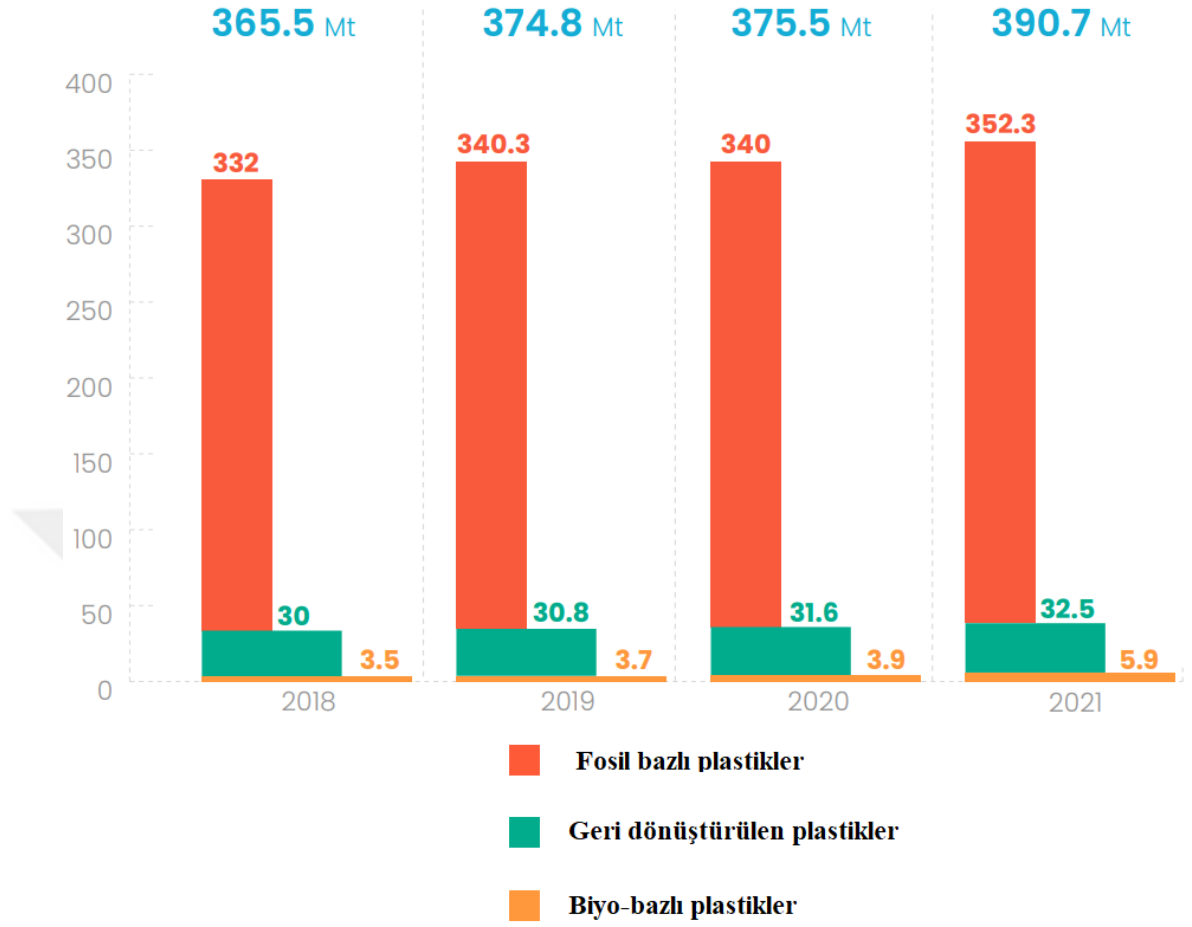
Bu tez çalışmasının hedefi yukarıda özetlenen insan kaynaklı stres faktörlerinden MP, OA ve La'nın, *A. lixula* türü üzerine oluşturacağı etkilerin belirlenmesidir. Dolayısıyla, çalışmanın temel amacı; deniz ekosistemlerinin artan önemdeki stresörlerinden olan MP, OA ve La'nın tekli ve çoklu olarak *A. lixula* türünde fizyolojik ve histopatolojik düzeyde etkilerini araştırmaktır. Deney kapsamında organizmalar 14 gün boyunca düşük pH (7,45), MP (26 $\mu\text{g L}^{-1}$) ve La (9 $\mu\text{g L}^{-1}$) maruziyetine bırakılmış ve bu süre sonucunda organizmaların solunum oranı, dört farklı tipteki sölomositlerin sayıları ve yaşayabilirliği ile birlikte histopatolojik etkileri incelenmiştir. |

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DENİZ EKOSİSTEMİNDE PLASTİK KİRLİLİĞİ

Plastik gündelik hayatımızda en yaygın kullanılan materyallerden biridir. Kullanım miktarının bu şekilde yoğun olması üretim talebinde bir artışa sebep olmaktadır. Plastiğin yüksek miktardaki üretimi ve buna bağlı yoğun kullanımı özellikle denizel çevrede artan bir plastik atık sorununa sebep olmaktadır. Denizel çevrede kalıcı olmaları ve bu ekosistemler üzerinde olumsuz etkilere sahip olmaları sonucu son zamanlarda denizel ekosistemlerde plastik kirliliği çalışmaları küresel çapta odak noktası haline gelmiştir.

Plastik; oksijen, hidrojen, kükürt, azot ve karbonun yanı sıra diğer organik ya da inorganik maddelerin bir araya gelmesiyle oluşan monomerlerin polimerizasyon işlemi sonucunda oluşturduğu polimer yapı olarak tanımlanan sentetik bir materyaldir (American Chemistry, 2005). İlk sentetik plastik 1909 yılında üretilirken, polistiren (PS) ve polivinil klorür (PVC) 1930'lu yıllarda üretilmiş olup endüstride yüksek üretime 1950'de başlamıştır (Gündoğdu, 2018). 1950'li yıllardan beri küresel plastik üretimi sürekli artarak 2018 yılında 365,5 milyon tona ve 2021 yılında 390,7 milyon tona ulaşmıştır (Şekil 2.1) (Plastics Europe, 2022). Artışın bu yönde devam etmesi ile birlikte 2050 yılına kadar toplam plastik üretiminin 34 milyar tona yükseleceği öngörülmektedir. Bugün, üretilen plastiğin yaklaşık %40'ı ambalaj olarak ve sadece bir kez kullanılmaktadır (Plastics Europe, 2016).



Şekil 2.1: Küresel plastik üretiminin yıllara göre değişimi, Mt (Milyon ton) (Plastics Europe, 2022).

Plastikler özellikle ucuz, dayanıklı, hafif, hijyenik olmaları ve hızlı temin edilebilmeleri nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yüksek üretime rağmen plastiklerin geri dönüşümü yaklaşık %9'dur ve geri kalan miktarın %12'si yakılmakta, %79'u ise atık sahalarına gönderilmektedir (Geyer ve diğ., 2017). Plastikler geri dönüşümü ve kullanımına göre 7'ye ayrılmaktadır (Tablo 2.1)

Tablo 2.1: Plastik türleri ve kullanım alanları (Oran ve diğ, 2014).

Plastik Türü	Kullanım Alanları
PET	Giyim, halı, film, yiyecek ve içecek kapları.
YYPE	Yiyecek olmayan ürün kapları (deterjan vb.), boru, film, atık kutusu.
PVC	Paketleme, cilt kapı, havuz kenarı döşemesi, lambri kaplama, oluk, çamurluk, film, trafik konisi, elektriksel ekipman.
DYPE	Nakliye zarfı, çöp kutusu astarı, yer döşeme çinisi, plastik kereste, film, çöp kovası.
PP	Otomobil, batarya muhafazası, sinyal ışıkları, saplı süpürge, petrol bacaları, fırça, tırmık, buz kırıcı.
PS	Termometreler, ışık kontak plakası, ısı yalıtımı, yumurta kartonları, cetvel, araba plaka çerçevesi, köpük ambalajı.

İçecek şişeleri, yiyecek ambalajları gibi kullanım alanına sahip polietilen tereftalat (PET) en çok geri dönüştürülen plastik iken diğer plastik türlerinin geri dönüşüm oranı oldukça düşüktür. Şimdiye kadar üretilen tüm plastiklerin yaklaşık %60'ının çöplüklerde veya doğal ortamda biriktiği tahmin edilmektedir (Geyer ve diğ., 2017).

Plastiklerin geri dönüşümünün düşük ve üretiminin yüksek miktarlarda olması sonucu doğada birikimi kaçınılmaz olmaktadır. Mikro ve makro boyuttaki plastik parçacıkların kara, atmosfer, su yolları ve okyanuslarda birikimi sonucu plastik kirliliği oluşmaktadır. Plastik atıklar nehirler, atık su boruları ve rüzgar yoluyla denizel ekosistemlere taşınmakta olup bu ortamlarda yüksek bir birikim göstermektedir. Plastik atık ticareti deniz çöpünün ana nedenidir ve deniz çöplerinin %80'i plastikten oluşmaktadır (Bertucci ve Bellas 2021).

Plastikler ultraviyole (UV) ışık, mikroorganizmalar, türbasyon, asitlik ve dalga hareketleri yolu ile degradasyona (parçalanma) uğramaktadır. Bu parçalanma işlemi çok uzun sürelerde (yüzlerce yıl) meydana gelmektedir. Parçalanma süresi; plastik materyalin boyutu, kalınlığı ve çevresel koşullar (güneş ışığına maruz kalma miktarı, konumu) gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Plastiklerin parçalanma süreleri polimer türüne bağlı olarak da farklılık göstermektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Çeşitli plastik polimerlerinin yoğunluk değerleri ve doğada parçalanma süreleri (Hidalgo-Ruz V, ve diğ., 2012; A. Glaser, 2019).

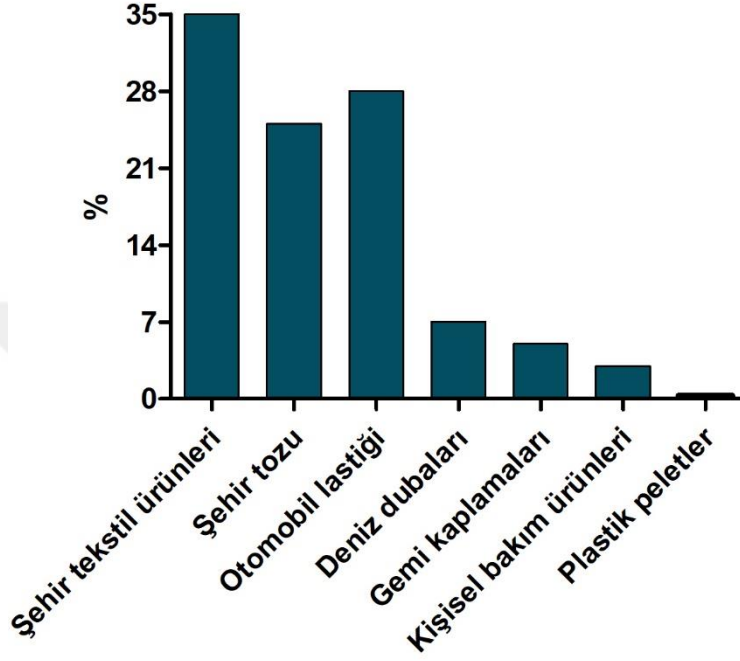
Polimer	Polimer yoğunluğu (g/cm ³)	Doğada parçalanma süresi (yıl)
Polipropilen (PP)	0,90-0,91	10-600
Polietilen (PE)	0,965-0,971	10-600
Poliamid (naylon) (PA)	1,02-1,05	
Polistiren (PS)	1,04-1,1	50-80
Polivinil klorür (PVC)	1,16-1,58	50-100+
Polyester	1,23-2,3	
Polietilen teraftalat (PET)	1,37-1,45	~400

2.1.1.Mikroplastikler

Mikroplastikler boyutları 1 µm-5 mm aralığında olan plastik parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Mikroplastikler yukarıda bahsedilen süreçler ile plastik materyalin parçalanması sonucu oluşmakta veya yukarıda bahsedilen boyutlarda çeşitli ürünlerin yapısında kullanılmak üzere üretilmektedir (Frias ve Nash, 2019). Bu bağlamda MP'ler ile ilgili yapılan sınıflandırmaya göre birincil MP'ler belirli amaçlar için kullanılmak üzere doğrudan mikro boyutlarda üretilirken ikincil MP'ler makroplastiklerin fiziksel, biyolojik ve UV-ışığı etkisi ile parçalanması sonucu oluşmaktadır. İkincil MP'ler fiber, fragment, sferoid, küre, granül, pellet veya pul olarak bulunabilmektedir (Atakan O. ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalarda, ikincil MP'lerin birincil MP'lere göre doğada daha fazla bulunduğu rapor edilmiştir (Liu, Y ve diğ., 2020).

Okyanuslar ve denizler genellikle çevredeki tüm plastikler için nihai birikim ortamı olarak kabul edilmektedir (Browne ve diğ., 2011; Law ve Thompson, 2014). Mikroplastiklerin bu ortamlara geçişi karasal ve denizel aktiviteler olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Karasal aktiviteleri ağırlıklı olarak endüstriyel ve evsel deşarjlar oluşturmaktadır. Denizel aktiviteleri ise deniz taşımacılığı, yasa dışı boşaltım, balıkçılık ve deniz ürünleri yetiştiriciliği ile ilişkili kullanılan malzemeler oluşturmaktadır. Denizel ortamlara ait MP kaynaklarının oranı Şekil 2.2'de bulunmaktadır. Okyanus özelinde ele alındığında MP'lerin özellikle kuzey pasifik

girdabında yoğun bir birikim gösterdiği bildirilmektedir. Dolayısıyla bu girdaba yakın yaşayan deniz organizmaları MP'leri bünyelerinde fazla biriktirmektedir. Böylece, besin zinciri yolu ile MP'lerin daha üst trofik düzeylere taşınması söz konusu olmaktadır (Zhang ve diğ., 2010).



Şekil 2.2: Deniz ekosistemlerindeki MP kaynakları (%) (Myszograj, 2020).

Kaynaklarının farklı olması sebebiyle MP'lerin denizel ekosistemlerdeki boyutu, şekli ve polimer tipleri birbirinden farklılık göstermektedir (Tablo 2.3.). Bu özellikler MP'lerin bu ekosistemlerdeki dinamiğini belirlemektedir. Tüm bu özellikler göz önünde bulundurularak MP'ler sınıflandırılmaktadır (Hidalgo-Ruz ve diğ., 2012).

Tablo 2.3: Mikroplastiklerin özelliklerine göre sınıflandırılması (Hidalgo-Ruz ve diğ., 2012).

Kategoriler	Mikroplastik Özellikleri
Tip	Plastik parçaları, peletler, lifler, köpükler, granüller ve straforlar
Şekil	Pelet şeklinde olanlar: silindirik, diskler, düz, oval ve küresel
Renk	Şeffaf, kristalin, beyaz, açık beyaz-krem, kırmızı, turuncu, pembe, mavi, lacivert, yeşil, opak, siyah, gri, kahverengi ve sarı
Aşınma	Yeni, bozunmamış, pürüzlü yüzey, doğrusal kırıklar, yan paralel çıkıntılar, yeni başlayan değişim ve çizik yüzey (konkoidal kırıklar), oyuklu, pürüzsüz yüzey, bozunmuş ve çok bozunmuş olanlar
Polimer Tipi	Polietilen, polipropilen, polistiren, poliamid, poliester, akrilik, polivinil klorür, polietilen tereftalat vb.

Mikroplastikler pelajik bölgede ve sedimentte yüksek seviyede bulunmaktadır. Sedimentte MP birikimi üzerine yapılan bir çalışmada ortalama MP konsantrasyonu 70 ila 430 parçacık kg^{-1} (yaş ağırlıkta) arasında bulunmuştur (Hennicke ve diğ., 2021). Mikroplastik parçacıklarının yoğunluğunun ve şeklinin, bu parçacıkların taşınımı ve sedimentte birikimi üzerine önemli etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Horton ve diğ., 2017; Bridge ve Bennet, 1992; Ballent ve diğ., 2012). Çoğu polimer parçacığın düşük yoğunluğa sahip olması sebebiyle yüzer formda olmasına karşın, yoğunluğu sudan daha fazla olan polimer tipli parçacıklar su profilinde dibe doğru hareket ederek sedimentte birikim göstermektedir. Yoğunluğu nispeten yüksek olan plastikler boyalarda kullanılan polimer kompozitlere ek olarak PVC, PET ve naylon (PA) gibi yaygın olarak kullanılan polimerleri içermektedir (Horton ve diğ., 2017). Plastik polimerlerin yoğunluğu her zaman sabit değildir, partiküller üzerinde mikroalg büyümesi (biyokirlenme) yoğunluklarını arttırmaktadır. Artan yoğunluk plastiklerin batmasına ve sediment ortamında birikmesine yol açmaktadır (Lagarde ve diğ., 2016). Ayrıca, boyut ve şekli plastik parçacıkların deniz ekosistemi içerisindeki hareketini etkilemektedir. Küresel parçacıklara kıyasla oldukça karmaşık çökme mekaniğine sahip düzensiz şekilli plastik parçacıklar sediment içinde daha fazla tutulmaktadır (Bridge ve Bennett, 1992). Düzensiz yapılı MP'ler küresel MP'ler ile karşılaştırıldığında, düzensiz şekilli olanların su yüzeyinden aşağı yönlü hareketinin ve su altında tutulmalarının daha olası olduğu bildirilmiştir (Ballent ve diğ., 2012). Boyut, şekil ve

yoğunluğa bağlı farklılıklar denizel ekosistemlerde MP taşınımını tahmin etmede ve modelleme yapılmasında bir karmaşıklığa sebep olmaktadır. Dolayısıyla ileriye yönelik projeksiyonlar yapmakta zorluklar ortaya çıkmaktadır.

Mikroplastikler toksik kimyasalların biyotaya transferinde vektör görevi görmektedir. Ayrıca, yapılarında çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan katkı maddelerinden dolayı toksik kimyasallardan oluşan bir karışım içermektedir. Katkı maddeleri, plastiğe renk ve şeffaflık gibi nitelikler veren, ozon, sıcaklık, radyasyon, küf, bakteri ve nem ile bozulmaya karşı dirençli hale getiren ve plastik ürünlerin mekanik, termal ve elektrik direncine dair performansını arttıran plastik üretimi sırasında kasıtlı olarak eklenen kimyasal maddelerdir (Hahladakis ve diğ., 2018). Plastiklerden kaynaklanan büyük miktarda katkı maddesinin etkisiyle birleştirilen, farklı boyut ve şekillerdeki çeşitli polimerlerin kombinasyonu, yalnızca plastiğin doğasını değiştirmekle kalmayıp aynı zamanda havaya, suya, karaya sızabilen bir kirletici kokteyli ile sonuçlanmaktadır.

2.1.1.1. Mikroplastığın Deniz Biyotasında Birikimi

Son zamanlarda yaygın olarak yapılan MP birikim çalışmaları insan da dahil olmak üzere birçok canlının dokularında MP bulunduğunu göstermektedir (Kosuth ve diğ., 2018; Renzi ve diğ., 2018; Akhbarizadeh ve diğ., 2018; Fagiano ve diğ., 2023).

Mikroplastiklerin deniz canlıları tarafından alımı çoğunlukla beslenme ve solunum yolları ile gerçekleşmektedir. Görünüş ve boyut olarak planktonlara benzediği için pek çok sucul canlı tarafından besin yerine alınmaktadır (Wang ve diğ., 2019). *Paracentrotus lividus* denizkestanesi türü kullanılarak MP'lerin alım sürecinde belirli bir boyutun ve rengin seçimine dair yapılan çalışmada bu türün belirli özelliklere sahip MP'leri tercih ettiği bildirilmiştir (Jeong ve diğ., 2016; Choi ve diğ., 2020). Bu durum MP'lerin boyutuna bağlı toksisite değişimini ve potansiyel olarak hayvanların MP'leri besinleri ile karıştırma riskini vurgulamaktadır. Mizraji ve diğ. (2017) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise farklı beslenme tiplerine (omnivor, herbivor, karnivor) sahip balıklardaki MP varlığı incelenmiştir. Söz konusu çalışmada omnivor beslenme tipine sahip balıklarda MP içeriğinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Mizraji ve diğ., 2017).

Daha önce yapılan bir çalışmada bentik bölgede yaşayan canlılarda birikimin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Murphy ve diğ., 2017). Bunun nedeni MP atılımlarının okyanus ve

denizlerde sonlanıp dip zonda birikmesidir. Açık denizlerde bulunan balıklarda mikro ve makro plastiklere daha az rastlandığı, kıyı türlerinde ise daha yüksek miktarda plastik parçacıkların bulunduğu bildirilmiştir (Murphy ve diğ., 2017). Sedimentte yaşayan ve filtre ederek beslenen midye, istiridye veya kıyı bölgelerde yaşayan denizkestanesi gibi türlerde maruziyetin artması ile birlikte MP birikimi de artış göstermektedir. Bu nedenle mevcut literatürde yer alan çalışmalarda MP analizleri için daha çok ekonomik değeri olan ve tüketilen deniz organizmaları (özellikle midye gibi kabuklu deniz canlıları ve balık türleri) hedef alınmaktadır. Örneğin, *Mytilus sp.* dokularındaki MP konsantrasyonlarının $0,2 \pm 0,3$ parçacık g^{-1} (Van Cauwenberghe ve diğ., 2015) ile $7,2$ parçacık g^{-1} (Renzi ve diğ., 2018) arasında değiştiği ve Akdeniz'de yapılan çalışmalardan elde edilen MP konsantrasyonlarının en yüksek değerleri gösterdiği bildirilmektedir (Renzi ve diğ., 2018; Digka ve diğ., 2018). Devriese ve diğ. (2015), *Crangon crangon* karides türünde MP konsantrasyonunu $0,68 \pm 0,55$ parçacık g^{-1} olarak bildirilmiştir. Balık türlerinde yapılan çalışmalarda ise MP konsantrasyonlarının esas olarak gastrointestinal sistemde biriktiği belirtilmiştir (Barboza ve diğ., 2018). Dolayısıyla balıklar genellikle tüketilmeden önce bağırsakları çıkarıldığı için muhtemelen insanlar tarafından alınan MP'lerin miktarını temsil etmemektedir. Ancak, Akhbarizadeh ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada kuzeydoğu Basra Körfezi'ndeki balıkların kas dokusunda $0,56$ parçacık g^{-1} (*Sphyræna jello*) ve $1,85$ parçacık g^{-1} (*Platycephalus indicus*) MP rapor edilmiştir. Denizkestanelerinin otçul beslenme davranışı, bentik ortamlarda bulunan MP'lerin daha yüksek miktarda alınımına neden olmaktadır. Yetişkin denizkestanelerinde MP birikimi başlıca beslenme ve madreporitlerden su alımı ile olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Fagiano ve diğ. (2023), Akdeniz kıyısındaki bir deniz koruma alanının farklı habitatlarındaki (deniz yüzeyi, deniz tabanı ve kumsal çökeltileri) MP'lerin balık ve omurgasız türlerinde (*Pagrus pagrus*, *Serranus scriba*, *Spondyliosa cantharus*, *Diplodus vulgaris*, *Oblada melanura*, *Holothuria forskalii*, *Holothuria tubularis*, *Holothuria polis*, *A. lixula*, *P. lividus*, *Modiolus barbatus*, *Mytilus galloprovincialis* ve *Arca noae*) alımını ölçmüştür. Alımın en düşük olduğu türler sırasıyla $3,40 \pm 3,36$ MP/birey ve $4,17 \pm 3,54$ MP/birey ortalama değerleri ile *A. lixula* ve *P. lividus* olmuştur.

Deniz organizmalarının tüketilmesi ile insanlarda da MP birikimi olmaktadır. Alınan MP'lerin %90'ının zamanla insan vücudundan atıldığı düşünülse de (EFSA, 2016), tutulan plastiklerin kümülatif etkisinin toksik olacağı bildirilmiştir. (Brown ve diğ., 2001; Forte ve diğ., 2016). Kabuklu deniz hayvanları, küçük balıklar, çift kabuklular ve denizkestanesi gibi

derisidikenliler, genellikle MP biriktirdikleri bilinen gastrointestinal sistem, gonadlar ve/veya solungaçlarla tüketilmesi sonucu insanlar için daha büyük bir risk oluşturabilir (Baechler ve diğ., 2020; Smith ve diğ., 2018). Bununla birlikte, diğer yiyecek ve içecek ürünlere kıyasla insanlarda deniz omurgasızları tüketiminden kaynaklanan MP birikiminin genel katkısı orta düzeyde sayılabilir (Wright ve Kelly, 2017). Ortalama bir kişinin musluk suyu, bira ve deniz tuzu yoluyla yılda 5.800'den fazla sentetik MP aldığı öne sürülmektedir (Kosuth ve diğ., 2018). Denizkestenesi tüketimi yoluyla MP'lere maruz kalma diğer birçok yiyecek/içeceğe göre daha düşük olsa da yine de ihmal edilecek düzeyde değildir.

2.1.1.2. Mikroplastığın Biyotaya Etkileri

Mikroplastik ve taşıdığı kirleticiler üzerine yapılan araştırmalarda insan dahil pek çok türde olumsuz etkilere sebep olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda deniz canlılarının tüketilmesiyle alınan MP'lerin sağlık sorunlarına yol açabileceği bildirilmiştir (Clark ve diğ., 2016; Wright ve diğ., 2013). Mikroplastiklere maruz kalan organizmalar üzerindeki olumsuz etkiler fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki kategoride ele alınmaktadır. Fiziksel etkiler, MP'lerin parçacık boyutu, şekli ve konsantrasyonu ile ilgiliyken; kimyasal etkiler, plastiğin kimyasal yapısı ve MP'ler ile bağlantılı zararlı kimyasallarla ilgilidir. Plastikler yapısında yer alan katkı maddeleri ve/veya denizel ortamdan adsorbe ettikleri organik kirleticiler ve metaller (Carpenter ve diğ., 1972; Hale ve diğ., 2010) kimyasal etkiler gösterebilmektedir.

Denizel ekosistemlerde yaşayan canlılar tarafından MP'lerin alınması sonucu sindirim sistemlerinde tıkanma ve hasarlara yol açtığı, ayrıca üreme faaliyetlerinde olumsuz etkilere de neden olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur. (GESAMP, 2016; Rummel ve diğ., 2016). Mikroplastikler sindirim sisteminde tıkanmaya sebep olmakla birlikte canlılarda tokluk hissi oluşturup besin alımına engel olmaktadır (Browne ve diğ., 2008; Wright ve diğ., 2013).

Mikroplastikler bulunduğu sucul ortamlarda kirleticilerin çeşitli organizmalara taşınmasında vektör görevi görmektedir (Rochman ve diğ., 2013a). Dolayısıyla, çeşitli organizmalara taşınan bu kimyasalların karaciğer toksisitesine (Rochman ve diğ., 2013a) ve endokrin sistem üzerine olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Talsness ve diğ., 2009; Rochman ve diğ., 2013b; Rochman ve diğ., 2014). Mikroplastikler ayrıca patojen bakterilerin taşınımında da vektör olarak rol almaktadırlar (Viršek ve diğ., 2017).

Denizel canlıların yapısına dahil olan MP besin zincirine katılarak gıda yoluyla insanlara kadar ulaşabilmektedir (Setälä ve diğ., 2013; Romeo ve diğ., 2015; Akarsu ve diğ., 2017). Mikroplastiklere insan akciğerinde (Prata, 2018) ve insan dışkısında (Liebmann ve diğ., 2018) rastlanılmıştır. Mikroplastiklerin insan sağlığına kanser, obezite gibi olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Sharma ve Chatterjee, 2017).

2.2. DENİZ EKOSİSTEMİNDE LANTAN KİRLİLİĞİ

Lantan atom numarası 57 ve atom ağırlığı 138,91 olan bir nadir toprak elementidir (NTE). Lantan ile ortak özelliklere sahip 15 elementin bulunduğu grup lantanitler veya NTE olarak adlandırılmaktadır (Holden ve diğ., 2004). Genel olarak, lantanitler benzer kimyasal özelliklere sahiptir (de Baar ve diğ., 1988). Ancak atomik, fiziksel ve kimyasal özellikleri seri boyunca kademeli olarak değişmektedir (Elderfield ve Greaves, 1982). Nadir toprak elementlerinin tümü havada kararar gümüş renkli ve reaktif formda olan katı metallerdir (Holden ve diğ., 2004). Nadir toprak elementleri düşük bir çözünürlüğe sahip olmakla birlikte hidroksit, karbonat, florür, fosfatlar veya organik ligandlar gibi kompleks oluşturuıcı iyonları kolayca çöktirir veya bunlara bağlanmaktadır (Wood, 1990; Sneller ve diğ., 2000; Ng ve diğ., 2011).

Nadir toprak elementleri temiz enerjide kullanılan araçlarda (rüzgar türbinleri, hibrit araçlar, şarj edilebilir piller ve katalitik konvertörler), askeri amaçlı kullanılan cihazlarda (yönlendirme ve kontrol sistemleri, iletişim araçları), medikal cihazlarda (manyetik rezonans görüntüleme (MRI), X-Ray tarayıcıları) ve tüketici ürünlerinde (televizyon, bilgisayar ekranı, kamera lensi) dahil olmak üzere dünya çapında yüzlerce uygulamada kullanılmaktadır (Bau ve diğ., 2006; Kulaksız ve Bau, 2011; Li ve diğ., 2013, X Li ve diğ., 2013). Lantan düşük enerjili ampullerde yaygın olarak kullanılan bir NTE'dir (Tan ve diğ., 2015). Lantanın diğer fosforları ve lüminesans uygulamaları LED ampullerinde ve camda renklendirici/rek giderici maddeler olarak kullanılmaktadır (De Lima, 2015). Lantan bileşikleri petrol parçalama katalizörü (Kulaksız ve Bau, 2011) ve sudaki fosfor yüklerini kontrol etmek için adsorban (Chen ve diğ., 2016; Gibbs ve diğ., 2011) olarak kullanılmaktadır.

Migaszewski ve Gałuszka (2015) tarafından yapılan ve çevresel ortamlarda NTE'lerin konsantrasyonlarının araştırıldığı çalışmada nehir suyunda La konsantrasyonunun $19,7 \text{ ng L}^{-1}$ (Mississippi Nehri) ile $74,0 \text{ ng L}^{-1}$ (Amazon Nehri) arasında değiştiği ve cevher madeni (ABD)

ve kömür madeni (Çin) atık suyunda $80,4 \mu\text{g L}^{-1}$ gibi daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığı bildirilmiştir.

Hafif NTE'lerden olan La ortamda bulunan partiküllere tutunma eğilimindedir (Censi ve diğ., 2004). Lantanitlerin kolloidlere ve partiküllere olan yüksek afinitesi nedeniyle bu yapılar esas olarak lantanit taşınmasından ve dağıtımından sorumludur (Sholkovitz, 1992). Moermond ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışmada nehirlerden deniz ekosistemlerine taşınan La için bir türleşme modellemesi tanımlanmıştır. Çözünmüş organik madde ile kompleksleşmeyi de ele alan model, La'nın ağırlıklı olarak nehir sularında hümik maddelerle kompleksler oluşturduğunu, bunu karbonatlar ve bikarbonatların izlediğini bildirmiştir. Deniz suyunda ise La türlerinin sırasının La-karbonatlar, La-bikarbonatlar ve ardından serbest iyonlar olduğu rapor edilmiştir. pH değerinin 6'dan 9'a yükselmesi sonucu serbest iyonlar ve hümik ligandlara bağlı La'nın azaldığı buna karşın La-karbonat ve La-bikarbonat komplekslerinin arttığı ifade edilmiştir (Moermond ve diğ., 2001).

2.2.1. Deniz Biyotasında Lantan Birikimi

Biyotada NTE birikimi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır (Li ve diğ., 2013; Merschel ve Bau, 2015; Qiang ve diğ., 1994; Weltje ve diğ., 2002). Bunun yanı sıra deniz suyunda NTE'nin antropojenik zenginleşmesine ilişkin başka çalışmalar ise özellikle La, İtiryum (Y), Samaryum (Sm) ve Gadolinyum (Gd) konsantrasyonlarının belirlenmesine yönelik olarak yapılmıştır (Hissler ve diğ., 2014; Kulaksız ve Bau, 2011; Olías ve diğ., 2005; Tepe ve diğ., 2014). Diğer metallerde olduğu gibi La'nın mevcudiyeti pH'dan ve ortamdaki diğer katyonların mevcudiyetinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Henning ve diğ., 2016). Dolayısıyla La ortam koşullarına bağlı olarak partiküllere adsorbe olabilmekte, organizmalar tarafından biriktirilebilmekte ve hücrel fonksiyonlara dahil olabilmektedir (Henning ve diğ., 2016).

7 gün boyunca Avrupa yılan balığına (*Anguilla anguilla*) La-klorür (LaCl_3) maruziyeti uygulanan bir çalışmada, 3 gün boyunca Lantanın hızlı bir şekilde biriktiği ve sürekli olarak maruz kaldıktan sonra bile birikimin azalsa da devam ettiği gözlenmiştir (Figueiredo, C. ve diğ., 2018).

Hou ve Yan (1998) tarafından yapılan çalışmada deniz organizmalarındaki en yüksek La konsantrasyonu makroalglerde rapor edilmiştir. Aynı çalışmada Çin kıyılarında göreceli olarak

temiz alanlardan toplanan 35 farklı alg türünde ölçümler yapılmış olup bunlar içerisinde kırmızı ve yeşil alglerin kuru ağırlığında La absorpsiyonu sırasıyla $10,14 \mu\text{g g}^{-1}$ ve $6,73 \mu\text{g g}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Hou ve Yan, 1998).

Pernice ve diğ. (2009) tarafından benzer fizyolojiye sahip ancak farklı coğrafik bölgelerden iki nautilus türü (*Nautilus macro mphalus* ve *Nautilus pompilius*) üzerine yapılan çalışmada sindirim bezlerinin La birikimi, metabolizması ve depolanması bakımından önemine dikkat çekilmiştir. Her iki türün sindirim bezlerinde La alımının boşaltım organlarına göre 3-4 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bustamante ve Miramand (2005) Atlantik Okyanusu'nun Fransa kıyılarına yakın kirli bir alanında *Chlamys varia* alacalı deniztarağı türünde kullanarak çeşitli elementlerin yanı sıra La ölçümleri yapmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın yapıldığı alanda oluşan kontaminasyonun özellikle bir lantanit üretim tesisinden yapılan deşarjlardan dolayı olduğunu ileri sürmüştür. Söz konusu çalışmada sindirim bezlerinin ardından gonadların ve solungaçların La bakımından en yüksek birikime (sırasıyla $8,12$; $5,73$; $5,06 \mu\text{g g}^{-1}$) sahip olduğu bildirilmiştir. Buna karşın en düşük La konsantrasyonunun ise kas dokusunda ölçüldüğü rapor edilmiştir ($0,32 \mu\text{g g}^{-1}$) (Bustamante ve Miramand, 2005).

Figueiredo ve diğ. (2022) tarafından Manila kum midyesi *Ruditapes philippinarium* türü üzerine yapılan çalışmada çevresel konsantrasyonların ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$) maruziyeti sonucu doku bazında La biyobirikimi incelenmiştir. Dokularda La birikiminin $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ maruziyeti sonucu sırasıyla solungaçlar>geri kalan dokular>sindirim bezi şeklindeyken, $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ maruziyeti sonucu solungaçlar>sindirim bezi>geri kalan dokular şeklinde değiştiği rapor edilmiştir.

2.2.2. Lantan'ın Biyota Üzerine Etkileri

Alkali toprak elementlerine benzer kimyasal özelliklere sahip olan La elementinin iyon formunun sitotoksik etkiler yarattığı tanımlanmıştır (Das ve diğ., 1988). La^{3+} 'ün kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) ile benzer iyonik özelliklere sahip olması, La^{3+} 'ün Ca^{2+} 'nin bağlanma bölgeleri ile rekabet etmesine neden olmaktadır. Bu rekabet sonucunda La^{3+} iyonları hücre zarlarındaki Ca-kanallarını inhibe ederek kaslardan sinir sistemine kadar birçok sistemi etkileyebilmektedir.

Avrupa yılan balığına (*A. anguilla*) 7-gün süren LaCl_3 maruziyetinin özellikle 72 saat sonrası katalaz enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu sonuç La mevcudiyetinin fizyolojik bozulmaya neden olabileceğini göstermektedir. (Figueiredo, C. ve diğ., 2018).

Moreira ve diğ. (2020) yaptığı çalışmada istiridye türü olan *Crassostrea gigas* larvasında La'nın Y'den daha yüksek embriyotoksisite sergilediği bildirilmiştir. Bu durum La'nın serbest iyonik formu olan La^{3+} 'nin daha yüksek biyoyararlanıma sahip olmasının sonucu olarak yorumlanmıştır.

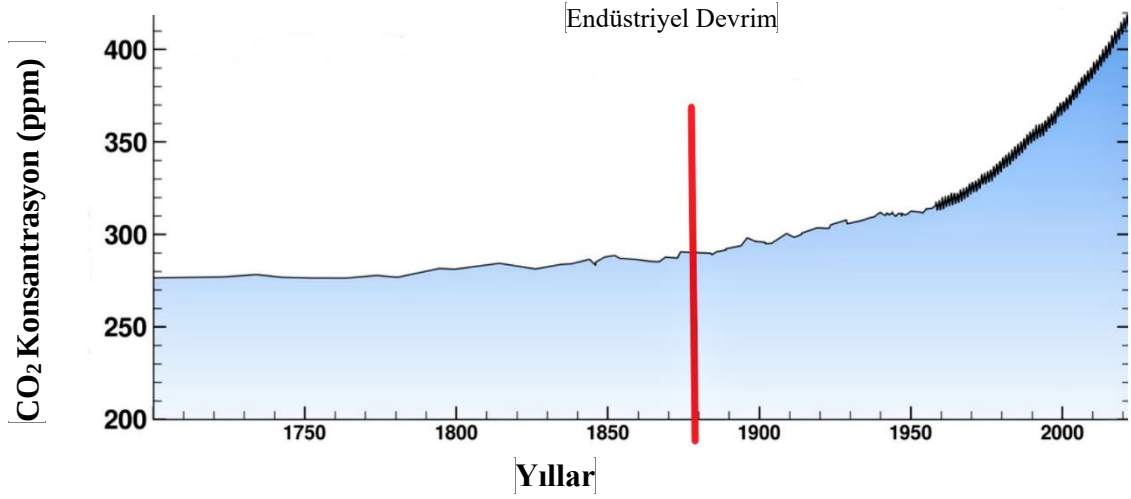
Weltje (2002) yaptığı çalışmada deniz bakterisi *Aliivibrio fischeri*'nin tatlı su koşullarını yansıtan bir ortamda La elementine duyarlılığını araştırmıştır. Çalışmada EC_{50} değerine 5,56 $mg L^{-1}$ gibi yüksek bir konsantrasyon ile ulaşıldığı belirtilmiştir. Tai ve diğ. (2010) *Skeletonema costatum* türü üzerine yaptıkları çalışmada aynı konsantrasyon aralığındaki 13 farklı lantanit tuzuna maruz bırakmış ve maruziyet sonunda alg hücreleri ile çok benzer toksik özellikler tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışmada La için tespit edilen EC_{50} değerine ulaşmak için uygulanan miktarın $29.04 \pm 0.61 \mu mol L^{-1}$ olduğu bildirilmiştir.

Araştırılan deniz organizmaları arasında denizkestanesi türü *P. lividus* embriyolarının La bakımından yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Oral ve diğ., 2010). Türün embriyolarının La^{3+} EC_{50} değeri 0,83 $mg L^{-1}$ olarak belirlenmiş olup söz konusu değer embriyogenez sırasında gelişimsel kusurlara sebep olduğu rapor edilmiştir. Ancak La'nın 0,42 $mg L^{-1}$ 'lik konsantrasyonuna kadar hiçbir sitogenetik etki gözlemlenmediği ifade edilmiştir (Oral ve diğ., 2010). Diğer yandan 1,39 $mg L^{-1}$ La maruziyeti sonucu *P. lividus* türünün (NOEC 0,42 $mg L^{-1}$) sperm fertilizasyon oranının önemli ölçüde inhibe edildiği ancak larvaların gelişimsel sürecinin etkilenmediği bildirilmiştir.

Trifuoggi ve diğ. (2017) üç denizkestanesi türünü (*A. lixula*, *P. lividus*, *Sphaerechinus granularis*) NTE'leri Y(III), La (III), Ce (III), Nd (III), Sm (III), Eu (III) ve Gd (III)' e maruz bırakıp sperm hasarını incelemişlerdir. NTE'lere maruz kalan embriyolarda/larvalarda gelişimsel kusurlar, sitogenetik anomaliler, sperm maruziyetini takiben düşük döllenme başarısı ve yavru hasarı kaydedilmiştir. *Arbacia lixula* sperminin La (III), Sm (III) ve Eu (III)'e maruz kalmasının ardından önemli ölçüde artmış gelişim kusuru ile sonuçlanırken, spermin Y(III), Ce (III), Nd (III) ve Gd (III)'e maruz kalmasının ardından daha az veya önemsiz yavru hasarı gözlenmiştir. Ayrıca üç denizkestanesi türünün NTE duyarlılıklarının farklı olduğu da bulunmuştur. *S. granularis*; *A. lixula* ve *P. lividus*'a kıyasla hem embriyo hem de sperm maruziyetinden sonra önemli ölçüde hassasiyet göstermiştir.

2.3.OKYANUS ASİTLENMESİ VE KARBONAT KİMYASI

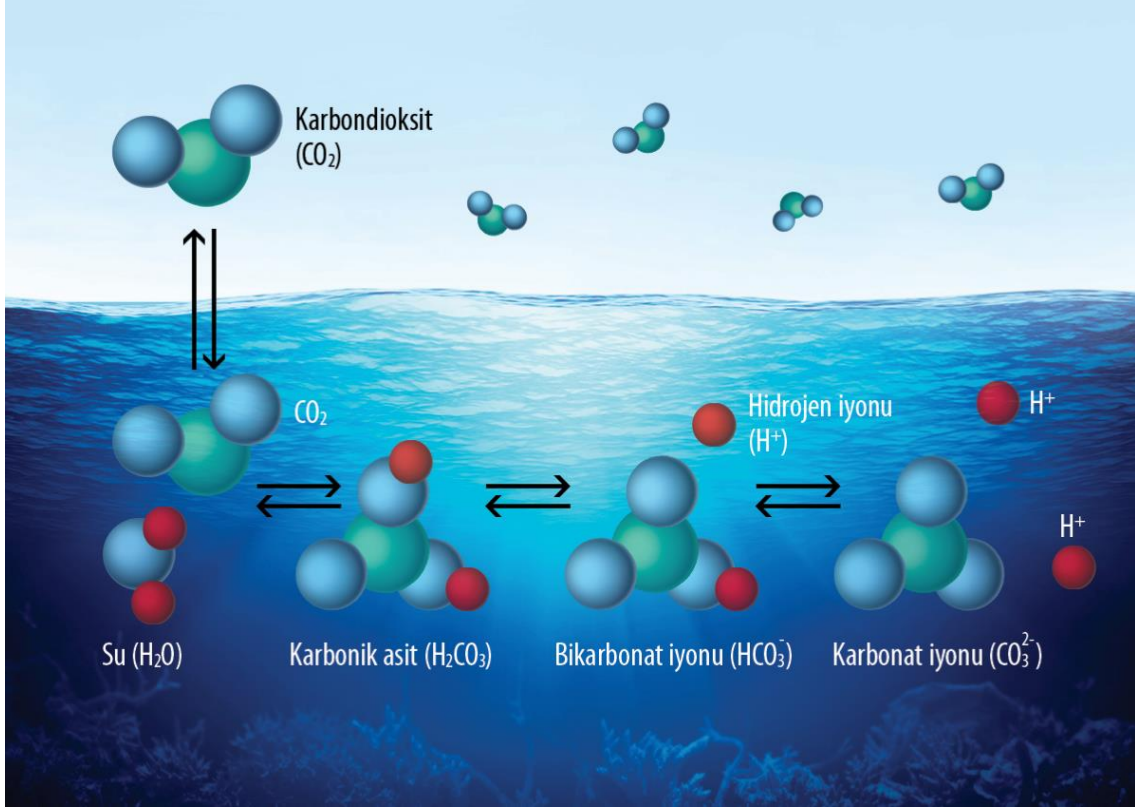
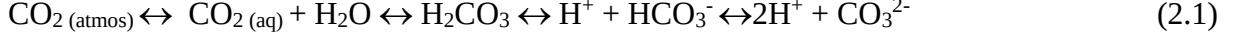
19. yüzyıl sonlarından bu yana antropojenik etkiden kaynaklı olarak artan atmosferik CO₂ konsantrasyonları (277 ppm-1750 – 408,12 ppm-2019) küresel iklim değişikliği süreçlerini tetiklemiştir (Safaeian ve diğ., 2023). Bu sürecin temel sebebi sanayi devrimi ile başlayıp devam eden fosil yakıtların tüketimidir. Sanayi devrimi öncesi ve sonrasında atmosferik CO₂ konsantrasyonunda anlamlı bir artış gerçekleşmiş olup son yıllarda ise artış dramatik bir şekilde devam etmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Sanayi devrimi öncesi ve sonrası CO₂ konsantrasyonundaki değişim ve son yıllardaki dramatik artış (Serebrisky, 2022).

Normal şartlar altında deniz suyu hafif baziktir. Son 200 yıldır fosil yakıtların hızla tüketilmesi, ormansızlaşma, sanayileşme, çimento üretimi ve arazi kullanımı gibi etkiler sonucu atmosferik CO₂ artmakta ve artan CO₂ denizler tarafından absorbe edilmektedir (Guinotte ve Fabry, 2008). Atmosferik CO₂ deniz suyu tarafından absorbe edildikten sonra su ile reaksiyonu sonucu karbonik asit (H₂CO₃) meydana gelmektedir (Şekil 2.4). Oluşan H₂CO₃ sonrasında bikarbonat (HCO₃⁻) ve karbonat (CO₃⁻²) iyonlarını oluşturarak H⁺ kaybedilmesi ile ayrışmaktadır (Şekil 2.4). Bu reaksiyonlar CO₂'nin deniz suyuna girişi ile H⁺ konsantrasyonunda bir artış meydana geldiğini ve artan bu H⁺ konsantrasyonunun pH'ı düşürdüğünü göstermektedir. Okyanus asitlenmesi olgusu esasında artan bu H⁺ konsantrasyonun sonucu pH'ın düşüşüne gönderme yapmaktadır. Bu durumun nedeni pH'ın -log[H⁺] olarak ifade edilmesinden ileri gelmektedir

(Gattuso ve Hansson, 2011). pH logaritmik ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+]$) bir değer olduğundan 1 birimlik fark asitlikte 10 katlık bir değişime denk gelmektedir.



Şekil 2.4: Atmosferdeki CO_2 'nin deniz suyu tarafından absorpsiyonu sonucu deniz suyu ile oluşan reaksiyonları.

Deniz ekosistemlerinin atmosferik CO_2 'yi absorbe edebilme durumu su profili ve/veya sedimentte bulunan CaCO_3 çözünme derecesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. İlgili reaksiyon aşağıda yer almaktadır.



Deniz suyu ve CO_2 arasındaki bu reaksiyon CaCO_3 yapıya sahip canlılarda (ekinodermiler, yumuşakçalar, mercanlar vb.) CO_3^{2-} 'nin azalmasına neden olmaktadır (Zeebe ve Ridgwell, 2011). CaCO_3 oluşumu ve çözünme oranları Ca^{2+} ve CO_3^{2-} konsantrasyonlarına ait iyon ürünü şeklinde tanımlanmakta olan doyma durumuna (Ω) bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Denklem 2.3).

$$\Omega = [\text{Ca}^{+2}] [\text{CO}_3^{-2}] / K_{\text{sp}} \quad (2.3)$$

K_{sp} CaCO_3 yapının çözünürlüğü mineral fazı, basınç, sıcaklık ve tuzluluk parametrelerine bağlıdır. Deniz suyu, $\Omega=1$ olduğunda doygunluğu, $\Omega>1$ olduğunda aşırı doymuşluğu (bu inorganik çökelmeyi teşvik eder) ve $\Omega <1$ olduğunda (inorganik çözünmeyi teşvik eder) yetersiz doygunluğu ifade etmektedir.

Sonuç olarak atmosferik CO_2 'nin deniz tarafından absorbe edilmesi sonucu HCO_3^- ve çözünmüş inorganik karbonun (C_c) konsantrasyonu artmakta ve kabuk, iskeletlerde bulunan üç ana karbonat minerallerinin doygunluk durumu, CO_3^{-2} konsantrasyonu ve pH'ı düşmektedir (Gattuso ve Hansson, 2011).

2.3.1. Okyanus Asitlenmesinin Deniz Biyotası Üzerine Etkileri

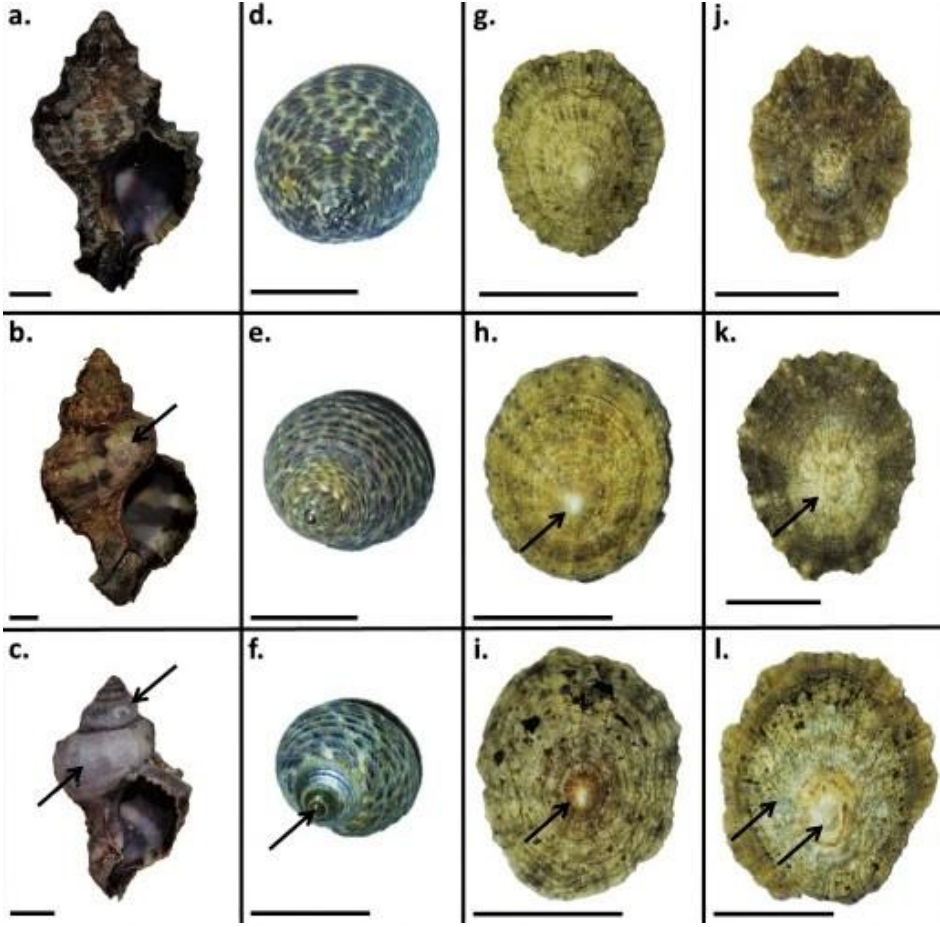
Atmosferik CO_2 'nin absorbe edilmesi, deniz suyunun karbonat kimyasında çok çeşitli etkilere sebep olabilmekte ve bu etkilerden bazıları organizmaların asit-baz dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (Gattuso ve Hansson, 2011). Hayvanların vücut sıvılarının hücre dışı pH'ı ve çeşitli organların veya tek hücreli organizmaların hücre içi pH'ı genellikle iyi bir şekilde düzenlenmektedir. Ancak suyun değişen bu parametreleri nedeniyle düzenleyici mekanizmaların kapasitesi aşılabilmektedir. Deniz canlılarında pH; iyon taşınması, enzim aktivitesi ve protein fonksiyonu gibi birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Birçok hücre içi enzim pH'a duyarlıdır ve fizyolojik aralık civarında bir optimum pH değerinde çalışmaktadır (Madhus, 1988). Örneğin, glikolitik yolda anahtar bir enzim olan fosfofruktokinazın aktivitesi, 0,1 birim pH düşmesi ile 10 ila 20 kat azalma göstermektedir (Trivedi ve Danforth 1966).

Okyanus karbonat kimyasındaki değişiklikler sonucu CaCO_3 yapısına sahip deniz organizmalarının iskeletinin bütünlüğü üzerinde potansiyel olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir (Gattuso ve Hansson, 2011). Akdeniz, Japonya ve Papua Yeni Gine'deki deniz dibi CO_2 menfezlerinde yapılan araştırmalar asitlenmiş koşullar altında deniz omurgasızlarının biyolojik çeşitliliğinde önemli azalmaların yanı sıra trofik yapı ve besin ağlarında kaymalar olduğunu ortaya koymaktadır (Cigliano ve diğ., 2010; Inoue ve diğ., 2013; Kroeker ve diğ., 2013). Biyoçeşitlilikteki bu düşüşün büyük bir kısmının, sert mercanları, yumuşakçalar ve derisidikenliler dahil yapısında CaCO_3 'ün yüksek olduğu deniz organizmalarının

popülasyonundaki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir (Inoue ve diğ., 2013; Fabricius ve diğ., 2014; Garilli ve diğ., 2015).

Deniz suyu karbonat doygunluğunda meydana gelen düşüslere rağmen bazı organizmaların kalsifikasyon oranlarında artış olabilmektedir (Gattuso ve Hansson, 2011). Ancak, zayıf iskeletler ve kabuklar, Ω 1'in altına düştüğünde çözölmektedir (Rodolfo-Metalpa ve diğ., 2011). Dolayısıyla genel olarak iskeletlerin mekanik özellikleri kalsiyum karbonat doygunluk durumundan etkilenebilmektedir (McDonald ve diğ., 2009; Welladsen ve diğ., 2010). Tropik resif oluşturan mercanlara yüksek CO₂ (pCO₂ yaklaşık 560 ppmv) maruziyetinin uygulandığı ileriye yönelik projeksiyonlu araştırmalar kireçlenme oranlarının %20-60 oranında azalacağını göstermektedir (Gattuso ve diğ. 1998; Kleypas ve diğ. 1999; Langdon ve diğ. 2000; Kleypas ve Langdon 2002; Langdon ve diğ. 2003; Reynaud ve diğ. 2003; Langdon ve Atkinson 2005; Royal Society 2005; Kleypas ve diğ., 2006). Kabuklu karolin alglerinin (KKA) yüksek pCO₂'ye (günümüzün 2 katı) maruz bırakılması sonucu büyüme oranlarında %40'a varan bir azalma, KKA'nın kapsadığı toplam alanda %92'lik bir azalma ve kireçlenmeyen alglerde %52'lik bir artış gözlenmiştir (Buddemeier, 2007; Kuffner ve diğ., 2008).

Duquette ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada dört farklı kabuklu türde (*Hexaplex trunculus*, *Osilinus turbinatus*, *Patella rustica*, ve *Patella caerulea*) düşük pH'ın ($7,73 \pm 0,02$) kabuklarda aşınmalara ve incelemelere neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Gastropod *Hexaplex trunculus* (a–c), *Osilinus turbinatus* (d–f), *Patella rustica* (g–i), ve *Patella caerulea* (j–l) türlerinin ortam pH'ı (a,d,g,j), orta pH (b,e,h,k), düşük pH (c,f,i,l) seviyelerinde maruziyet sonrası kabukta meydana gelen fiziksel değişiklikler. Oklar görünür çözünme alanlarını göstermektedir (Duquette ve diğ., 2017).

Denizkestaneleri çoğu deniz canlılarına göre yüksek $p\text{CO}_2$ maruziyeti ile başa çıkma yeteneği daha düşük olan bir fizyolojiye sahiptir (Miles ve diğ., 2007). Çoğu çalışmada OA'nın denizkestaneleri üzerindeki olumsuz etkileri rapor edilmiş ve etkilenme düzeylerinin türler arasında farklılık gösterdiği ifade edilmiştir (Siikavuopio ve diğ., 2007; Dupont ve diğ., 2012; Hall-Spencer ve diğ., 2008; Calosi ve diğ., 2013). Transplantasyon deneyleri, asitlenmenin organizmaları farklı şekilde etkilediğini, bazılarının kalsifikasyonu yukarı yönlü düzenleyerek bu koşullara alıştığını ve diğerlerinin koruyucu tabakaların varlığı nedeniyle kendilerini çözünmekten koruyabildiğini göstermiştir (Rodolfo-Metalpa ve diğ., 2011). Bununla birlikte, denizkestanesi gibi yüksek Magnezyum (Mg)-kalsit iskeletlere sahip türlerin, artan deniz suyu asitliğine karşı özellikle savunmasız olduğu düşünülmektedir. Bu durumun nedeni canlıların kabuk yapısındaki mineral formun düşük pH'lı sularda kolaylıkla çözünmesi, metabolizmanın ve üremenin bu süreçten olumsuz yönde etkilenmesidir (Morse ve diğ., 2006; Andersson ve

diğ., 2008; McClintock ve diğ., 2011; Stumpp ve diğ., 2011, 2012). Bray ve diğ. (2014) *P. lividus* ve *A. lixula* denizkestaneleri türlerini 7,50 pH_{NBS}'ye maruz bıraktıktan sonra *A. lixula*'da iskelet çözünmesinin *P. lividus*'tan daha düşük olduğunu göstermiştir. Artan CO₂ konsantrasyonuna yanıt olarak asit-baz dengesinin korunmasında iki tür arasındaki tepkilerin benzer olduğu ifade edilmiştir (Calosi ve diğ., 2013).

Fotosentez, karbonat sistemindeki değişikliklerden doğrudan etkilenebilen başka bir süreçtir. Nihai inorganik karbon(C) kaynağı CO₂'dir. Bununla birlikte, CO₂ genellikle deniz suyunda çok sınırlıdır ve bazı organizmalar C yoğunlaştırma mekanizmaları geliştirmiştir (Reinfelder, 2011). Çoğu deniz fitoplanktonu türü inorganik karbonu (C_i); CO₂ veya HCO₃⁻ ya da her iki formu biriktiren C yoğunlaştırma mekanizmalarına sahiptir (Giordano ve diğ., 2005). Derin okyanus suyu pH'ının, deniz suyundaki metallerin ve bazı besin maddelerinin termodinamiği ve kinetiği üzerinde bir etkisi vardır ve bu da türleşme, davranış ve akıbetlerinde değişikliklere neden olmaktadır (Millero ve diğ., 2009). Bu değişiklikler metallerin deniz organizmaları için mevcudiyetini ve toksisitesini etkileyebilmektedir.

Deniz suyuna yüksek konsantrasyonlu CO₂ girişinin derisidikenlilerde solunum, beslenme, dölleme ve larva gelişimi gibi çeşitli fizyolojik süreçleri değiştirdiği bildirilmiştir (Kurihara ve Shirayama, 2004; Dupont ve Throrndyke, 2008). Denizkestanesi gametleri düşük homeostatik kapasitesi nedeniyle gelişiminin erken aşamalarını tehlikeye atabilecek doğal ve antropojenik çeşitli stres faktörlerine maruz kaldığında savunmasız kalabilmektedir (Kurihara ve Shirayama, 2004; Melzner ve diğ., 2009).

Cohen ve diğ. (2013) OA ve okyanus ısınması (OI) ikili stresör uygulaması ile yaptığı bir çalışma subtropikal sularda yaşayan en güneydeki *P. lividus* popülasyonunun 21. yüzyılın sonunda öngörülen değişikliklere toleranslı olacağını gösterirken, 23. yüzyılda beklenen OA'nın dramatik yansımaları olabileceğini belirtmiştir. Yüksek CO₂'nin balıklar üzerindeki kısa vadeli etkileri arasında asit-baz dengesi, solunumu, kan dolaşımı ve sinir sistemi fonksiyonlarının değişmesi yer alırken, uzun vadeli etkiler arasında büyüme hızının ve üremenin azalması bulunmaktadır (Ishimatsu ve Kita, 1999; Ishimatsu ve diğ., 2004, 2005).

2.4.DENİZ BİYOTASI ÜZERİNE ÇOKLU STRESÖR ETKİSİ

Deniz ekosistemleri insan kaynaklı olan çeşitli stresörlerin baskısı altında olan ortamlardır. Bunlar içerisinde OA, MP, düşük oksijen, küresel ısınma, radyonüklidler, metaller ve organik

kirleticiler gibi stresörler bu ortamlarda yaşayan organizmalar üzerine tekli etkilerinin yanı sıra birarada çoklu etkilerde bulunabilmektedir. Laboratuvarında yapılan çalışmalarda denizel ekosistemlerde yer alan başlıca stresörler dikkate alınarak model deniz organizmaları üzerine çoklu stresör deneyleri yapılmaktadır. Çoklu stresör ortamlarında söz konusu stresörlerin organizmalar üzerine etkileri eklemeli, sinerjistik ve antagonistik olmak üzere farklı şekilde olabilmektedir. Literatürde bu tür çalışmalarda farklı stresörler kullanılarak etkileri araştırılmaktadır. Çoklu stresör uygulamasına yönelik Bertucci ve Bellas (2021) *P. lividus* üzerine yaptıkları çalışmada OA, MP ve OI'nın tekli ve çoklu etkilerini araştırmıştır. Çalışma MP'nin düşük pH'ın tür üzerindeki etkisini şiddetlendirdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte su sıcaklığındaki bir artışın *P. lividus* larvalarının büyümesini baskıladığı ortaya konmuştur. Cohen ve diğ., (2013) *P. lividus* embriyolarını OA ve OI stresörlerine tekli maruz bırakmış ve maruziyet sonunda döllenme ve erken gelişim etkilerini incelemişlerdir. Maruziyet sonunda ısınmanın döllenmeyi, embriyo ve larva gelişimini hızlandırdığını, asitlemenin ise larva gelişimini geciktirdiğini belirlemişlerdir. Denizkestanesinde OA ve OI stresörlerinin, bakteriyel patojen (*Vibrio anguillarum*) aktivitesi ve sölom sıvısına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada OI ve OA'ya maruz kalan bireylerin en düşük sölomosit konsantrasyonlarına sahip olduğu, daha düşük fagositik kapasiteler sergilediği ve patojen *V. anguillarum*'un bakteriyel büyümesini inhibe etmede en az etkili organizmalar olduğu bulunmuştur (Brother ve diğ., 2016). Diğer yandan çalışmada zamanla artan sıcaklığın ve asitlenmenin fagositik aktivite üzerindeki olumsuz etkilerini hafiflettiği de gösterilmiştir (Brother ve diğ., 2016). Visconti ve diğ. (2011), yaptığı çalışmada *A. lixula* larvası OA (pH 7,8) ve OI'nın (24°C ve 26°C) tekli ve ikili stresine maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonucunda OI'nın larva boyutunu arttırdığı, bunun aksine OA'nın larva boyutunu düşürdüğü gösterilmiştir. İki stresörün de uygulandığı grupta ise OI ve OA'nın antagonistik etkileri sonucu larva boyutunda bir farklılık bulunmamıştır. *Paracentrotus lividus* türü denizkestanesi embriyo ve larvalarında yapılan başka bir çoklu stres çalışmasında bir NTE olan Gd ve OI'nın ikili stresinin birleşik etkileri incelenmiştir. Gelişimsel ilerleme ile ilgili olarak, OI'nın gelişmeyi ve larva aşamasına ulaşımı hızlandırdığı rapor edilmiştir. Kontrol sıcaklığında (18°C) Gd'ye maruz kalan embriyoların ise, döllenmeden 24 saat sonra gelişimde genel bir gecikme ve bodurluk, 48 saat sonrasında da bozulmuş iskelet büyümesi gösterdiği bulunmuştur (Martino ve diğ., 2021). Yakın gelecek projeksiyonlarındaki yüksek sıcaklıklar (21°C ve 24°C), Gd'nin gelişim üzerindeki olumsuz etkileri olan anormallik yüzdesini düşürmüş ve iskelet büyümesindeki gerilemeyi azaltmıştır (Martino ve diğ., 2021).

Doğal deniz ortamında bir arada bulunan stresörlerin deniz organizmalarındaki etkilerine dair doğru bir fikir edinmek adına çoklu stresör çalışmaları yapılması gerekmektedir. Tüm bu veriler sonucunda çoklu stres çalışmaları birçok parametrenin etkilerinin daha gerçekçi görülebilmesi adına değerini korumaktadır.

Sonuç olarak stresörler doğal ortamda bir arada bulunmaktadır ve birbirlerinin alım, birikim ve etkilerini destekleyici veya inhibe edici olarak değiştirebilmektedir. Bu yüzden çoklu stres çalışmaları stresörlerin canlılar üzerindeki etkilerinin doğruluğuna dair fikir vermesi açısından önemli bir rol oynamaktadır. Literatür incelendiğinde bu zamana kadar MP, La ve OA'nın çoklu stresör olarak etkilerinin gösterildiği bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışma *A. lixula* türünde üç stresörün tekli, ikili ve üçlü etkilerinin incelenmesinden dolayı önemlidir. Ayrıca *A. lixula* türü üzerinde yapılan çalışmalarda daha çok embriyoları tercih edilmiştir. Literatürde *Arbacia lixula* erişkinlerinin kullanıldığı çoklu stres çalışmaları yeterli düzeyde değildir. Bu çalışma erişkin *A. lixula* organizmaları üzerinde OA, La, ve MP'nin tekli, ikili ve üçlü etkilerinin ortaya konması bakımından önemlidir.

2.5.ARBACIA LIXULA

Çalışmada *A. lixula* türü denizkestanesi kullanılmış olup sınıflandırması Tablo 2.4'te yer almaktadır (Linnaeus, 1758):

Tablo 2.4: *Arbacia lixula* türünün sınıflandırması.

Takson	İsim	Kaynak
Filum	Echinodermata	(Bruguière, 1790)
Sınıf	Echinoidea	(Leske, 1778)
Takım	Arbacioida	(Gregory, 1900)
Aile	Arbaciidae	(Gray, 1855)
Cins	<i>Arbacia</i>	(Gray, 1835)
Tür	<i>Arbacia lixula</i>	(Linnaeus, 1758)

Arbacia lixula, Akdeniz'de, İspanya'nın Atlantik kıyılarında, Portekiz'de ve Kuzeybatı Afrika'da sığ su sert zeminlerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Ayrıca, Azorlar, Cape Verde Adaları, Kanaryalar ve Madeira'da da görülmektedir. Bunun yanı sıra Güney Yarımküre'de ve Brezilya kıyılarında da bulunmaktadır (Gianguzza ve Bonaviri, 2013). Akdeniz'de bu tür *P. Lividus* (Lamarck, 1816) ile bir arada bulunmaktadır. *Arbacia lixula* dikey substratlarda daha yaygın olup CaCO_3 biriktiren makroalglerin başlıca tüketici türü olarak kabul edilir (Benedetti-Cecchi ve diğ., 1998; Bulleri ve diğ., 1999). *Arbacia lixula*'nın etobur eğilimli bir omnivor olduğu kabul edilmektedir (Wangsteen ve diğ., 2011).

Çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerin dünya çapındaki denizkestanesi popülasyonlarını etkilediği düşünülmektedir (Sala ve diğ., 1998). Avcıların mevcudiyeti (balık, denizyıldızı, ıstakoz, fok, su samurları ve insanlar), ticareti, besin mevcudiyeti, patojenler, rekabet ve kitlesel ölüm olayları denizkestanesi popülasyon dinamiklerini kontrol eden başlıca biyotik faktörlerdir (Tegner ve Dayton, 1977; McClanahan ve Şafir, 1990; Makaslar ve Babcock, 2003; Hereu ve diğ., 2012). Ayrıca, su sıcaklığı, dalga hareketi ve sığınakların mevcudiyeti, kıyı habitatlarının tahrip edilmesi gibi fiziksel faktörler, denizkestanesi popülasyonlarının yoğunluğunu ve yapısını belirlemede çok önemlidir (Pearse ve Hines, 1987; Pedrotti ve Fenaux, 1992; Phillips ve Shima, 2006). Akdeniz kayalık resif dinamiklerindeki önemli ekolojik rolünden dolayı *A. lixula*'nın fonksiyonel özellikleri çokça çalışılmıştır (Hereu ve diğ., 2012). *Arbacia lixula* düşük test (kabuk) yükseklik/çap oranı, test üzerinde bulunan 5 bölme (plaka) arasındaki geniş aralıklara ek olarak zemine ve çeşitli substratlara güçlü bir şekilde bağlanma yeteneği ile karakterize edilir. Bu özellikler dalga hareketine karşı büyük bir direnç sağlar (Chelazzi ve diğ., 1997; Tuya ve diğ., 2007). Bu morfolojik özellikler uzun dikenler ve testin sağlamlığı ile yetişkin *A. lixula*'yı balıkların yırtıcı saldırılarına karşı yapısal olarak dirençli kılar (Guidetti, 2004; Guidetti ve Mori, 2005). Test morfolojisi, bağlanma mukavemeti ve omurga uzunluğu bu türün 2 ila 15 m arasındaki derinliklerde, düşük gelgitte dikey veya yarı dikey kayalık yüzeylerde yaşamasına izin verir (Gianguzza ve diğ., 2010).

Arbacia lixula türü dünya çapında yaygın olması, ticari değere sahip olması, çeşitli kirleticileri biriktirebilmesi ve ekolojik denge açısından bir öneme sahip olması özelliklerinden dolayı birçok araştırmaya konu olmaktadır. Özellikle model organizma olarak sıcaklık ve asitlenme gibi çevresel değişkenlerin gelişimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur (Cohen ve diğ., 2013).

Arbacia cinsin tüm üyeleri morfolojik benzerlikler göstermektedir (Mortensen, 1943). *Arbacia* türlerinin test çapı yaklaşık 15 mm ile 50 mm arasında değişmektedir (Gianguzza ve Bonaviri, 2013). Yetişkin denizkestanelerinin oluşturduğu ana CaCO_3 minerali kalsitin en çözünür formlarından biri olan yüksek Mg'li kalsittir (Morse ve diğ., 2006). Kabuğun sonu bir epitel ile kaplı olup dikenler tüp ayaklar ve pediseller ile çevrilidir. Hayvanın hareket ettirebildiği bu uzantıların farklı işlevleri vardır. Dikenler, doğal yırtıcı hayvanlara karşı ilk savunma sistemidir, ancak hareket etmeye yardımcı olmak ve alt tabakaya yapışmayı kolaylaştırmak için de kullanılmaktadır (Guidetti ve Mori, 2005). Evsel kirliliğin yüksek olduğu yerlerde, dikenler uzar ve inceler. Dikenlerin bu şekilde uzaması ve daha gözenekli iç yapıları, organik materyalin daha aktif ve verimli bir şekilde alınmasına yönelik morfofonksiyonel bir adaptasyon olarak kabul edilmektedir (Delmas ve Régis, 1985; Régis, 1986). Dikenlerin arasında tüp ayaklar ve pediseller bulunur. Tüp ayaklar beşli simetrik şekilde oral bölgeden apikal uca uzanan bir sap ve bir kafa tarafından oluşturulan oldukça hareketli yapılardır. Denizkestanesi tüp ayaklarını besini yakalamak, oksijen ve suyu vücutlarına almak için uzatabilir, geri çekebilir ve uçları sayesinde alt tabakaya yapıştırabilir veya bırakabilir (Flammang, 1996; Flammang ve diğ., 1998). Öte yandan, pediseller denizkestanesi kabuğunda tüm yüzeye seyrek olarak dağılmış küçük kısaç şeklindeki uzantılardır. Dikenler ve pediseller yırtıcı saldırılar veya pH düşüşü gibi değişen çevresel koşullar (Tortonese, 1965) nedeniyle yaşanan kayıplar yeniden telafi edilebilir.

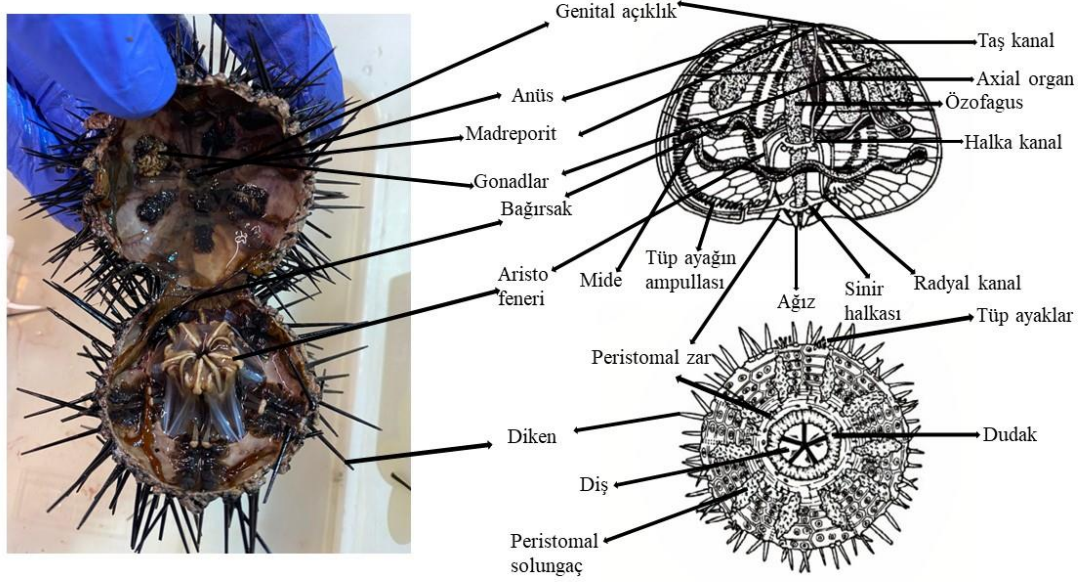
Denizkestanelerinin ağız ile ilişkilendirilen yapısı "Aristo feneri" olarak adlandırılmaktadır (Barnes, 1987). Bu yapı 5 hareketli plakadan oluşmaktadır ve her plağın içinde dışarı itilip geri çekilebilen 5 adet diş bulunmaktadır (Tortonese, 1965). Denizkestanesinin kalsitli dişleri kireç taşından daha serttir. Sığ ve sert alt tabakalarda veya gelgitler arası zonlarda yaşayan popülasyonlara ait denizkestaneleri yırtıcılardan saklanmak veya dalgalara karşı direnmek için dişlerini kayalarda delikler açmak amacıyla kullanmaktadırlar (Tortonese, 1965).

Kalsiyum-karbonattan oluşan dış iskelet, birbirine bağlı 20 sıra plakadan oluşur. Sırasıyla ambulakral ve interambulakral plak olarak adlandırılan 2 tip sıralanmış plak bulunmaktadır. Bu plaklardan interambulakral olanı dikenleri barındırırken, her ambulakral plakadan bir çift tüp ayak çıkar (Carboni, 2013). Aboral tarafta periprokt adı verilen bir zar vardır. Periprokt her bir gonad için bir tane olmak üzere 5 gonopor (spermilerin ve yumurtaların suya salındığı açıklıklar) ile anüsü çevreler. Periprokt, madreporit veya madreporik plakayı da barındırır (Tortonese,

1965). Sölom olarak adlandırılan iç boşluk oldukça geniştir. İç boşlukta bulunan Aristo feneri yapısı sölom olarak adlandırılmaz. Tüm derisidikenlilerin diğer bir özelliği pedisellerdeki endolenf basıncının yerel bir değişimiyle hareket etmeye izin veren akifer aparatın (ambulakral aparat olarak da adlandırılır) bulunmasıdır. Dorsal-ventral yönlerdeki bir kanal daha dairesel kanallı madreporik plakaya bağlar ve iç sıvılar ile deniz suyu arasındaki alışverişini sağlar. Üreme sistemleri ise genital gözeneklere bağlı 5 gonaddan oluşur (Şekil 2.6). Ayrıca gonadlar, iskeletin iç yüzeyine mezenterik filamentler ile birleştirilir. Olgunlaştıklarında hacimli, parlak sarı, turuncu veya kırmızı renkli (az ya da çok yoğun) görünür ve aboral kutbundan neredeyse Aristo fenerine kadar yayılırlar. Aboral yöne doğru her bir gonad incilir ve genital plakanın gonoporusundan (gamet emisyon alanı) dışarı akan kısa bir gonodukt oluşturur. Denizkestanesi genel morfolojik ve anatomik görünümü Şekil 2.6'da verilmiştir.

Derisidikenlilerin nispeten basit sindirim sistemleri vardır. Sindirim sistemi vücudun iç duvarına mezenterle bağlanan basit bir borudur. Önce Aristo fenerinden geçer, merkezinde piramitler arasında ilerler ve birkaç kez katlandıktan sonra anüs ile son bulur. Sindirim sistemi ağız, özofagus, mide, bağırsaklar ve anüs olmak üzere beş ana bölümden oluşmaktadır. Pentaradyal simetrileri ve alışılmadık vücut şekilleri göz önüne alındığında, ağızları neredeyse

her zaman vücutlarının alt tarafındadır (oral taraf) ve vücutlarının üst kısmında (aboral taraf) bulunan açıklık anüsü temsil eder.



Şekil 2.6: Denizkestanesi anatomisi ve morfolojisi (Wallace ve Taylor, 2002).

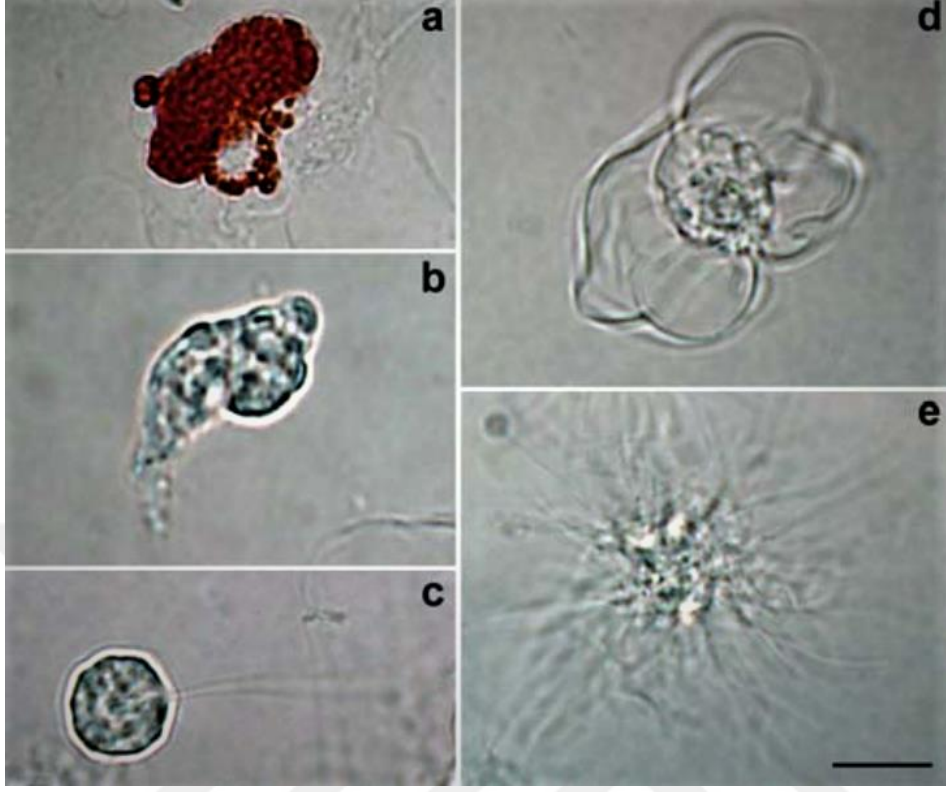
Denizkestanelerinde solungaçlardan, tüp ayaklardan ve madreporitten vücuda oksijen ve su girişi olur. Alınan oksijen basit difüzyon ile taşınarak solunum gerçekleşir. Denizkestaneleri aynı zamanda bir damar ve atardamar ağı gibi hizmet eden bir dizi cep ve tüpten oluşan basit bir dolaşım sistemine sahiptir.

Tüp ayaklar ve Aristo fenerindeki dişler ile tutulan besin Aristo fenerini geçerek özofagusa ulaşır. Özofagustan sonra vücudun geri kalan kısmında yoğun olarak bulunan bağırsaklarda sindirimi tamamlanır ve kalan atıklar anüsten atılır.

Arbacia gonokorik (tek cinsiyetli) bir cinstir ve hermafroditizm nadirdir (Harvey, 1956). Diğer denizkestanelerinde olduğu gibi *Arbacia* türlerinin üremesi, karmaşık ve sinerjik bir şekilde etkileşime giren bir dizi endojen ve çevresel faktör tarafından kontrol edilir (Leviton, 1991; Byrne, 1990). Denizkestanesi gametogenezi, gonadlarda besin birikimini, birikmiş besinlerin besleyici hücrelerden gametojenik hücrelere transferini, biriken gametlerin depolanmasını ve dış döllenme ile sperm ve yumurtaların su kolonuna yayılmasını içerir. Bu sürecin esas olarak fotoperiyotta (Pearse ve diğ., 1986; Bay-Schmith ve Pearse, 1987; Shpigel ve diğ., 2004) ve su

sıcaklığındaki (Byrne, 1990; Gianguzza ve diğ., 2011) mevsimsel değişiklikler tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Bu ekinoidlerin üreme döngüleri tipik olarak yıllık veya altı aylıktır. *Arbacia lixula*'nın üreme döngüsü sürekli veya sınırlı olabilir ve bölgesel olarak değişir. Erkek ve dişi bireyler normalde yılda bir kez gametlerini (yumurta veya sperm) döllenmenin olduğu su sütununa bırakmaktadır (Philip James ve diğ., 2018). Ernst ve diğ. (1973), *A. lixula*, 9,2 ile 14 mm arasında bir test çapıyla cinsel olgunluğa ulaştığını, ancak Tommasi (1964) Brezilya popülasyonunda 6 mm test çapına sahip örneklerde cinsel olgunluğa eriştiğini bildirmiştir. Yumurtalıklarının rengi genellikle koyu mordur (Gianguzza ve Bonaviri, 2013).

Denizkestanelerinin bağışıklık sistemi bakteri, mantar ve parazitlere karşı önemli bir savunma işlevi oluşturur. Denizkestaneleri OA, endüstriyel faaliyetler sonucu oluşan deşarjlar, MP kirliliği ve antropojenik diğer maruziyetler sonucu olumsuz yönde etkilenmeyi azaltmaya yönelik sölomositler tarafından yönetilen farklı bir bağışıklık sistemine sahiptir (Falugi ve diğ., 2012; Della Torre ve diğ., 2014; Pinsino ve diğ., 2015; Marques-Santos ve diğ., 2018; Migliaccio ve diğ., 2019; Alijagic ve diğ., 2020; Milito ve diğ., 2020; Murano ve diğ., 2020). Bu omurgasızlarda farklı tipte hücreler (sölomosit) ve hümmoral bileşenler bulunur ve bu yapılar birbiriyle koordineli bir şekilde çalışırlar. Hücre bazlı bağışıklık sölomositler tarafından gerçekleştirilir. Denizkestanelerinde dört tip sölomosit; fagosit, titreşimli hücre, kırmızı ve renksiz sferül olmak üzere isimlendirilmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: 10 μm 'de denizkeşanesi sölomositleri: a kırmızı sferül; b renksiz sferül; c titreşimli hücre; d-e fagosit (V Matranga ve diğ., 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENİZKESTANELERİNİN TOPLANMASI VE DENEY SETİNİN OLUŞTURULMASI

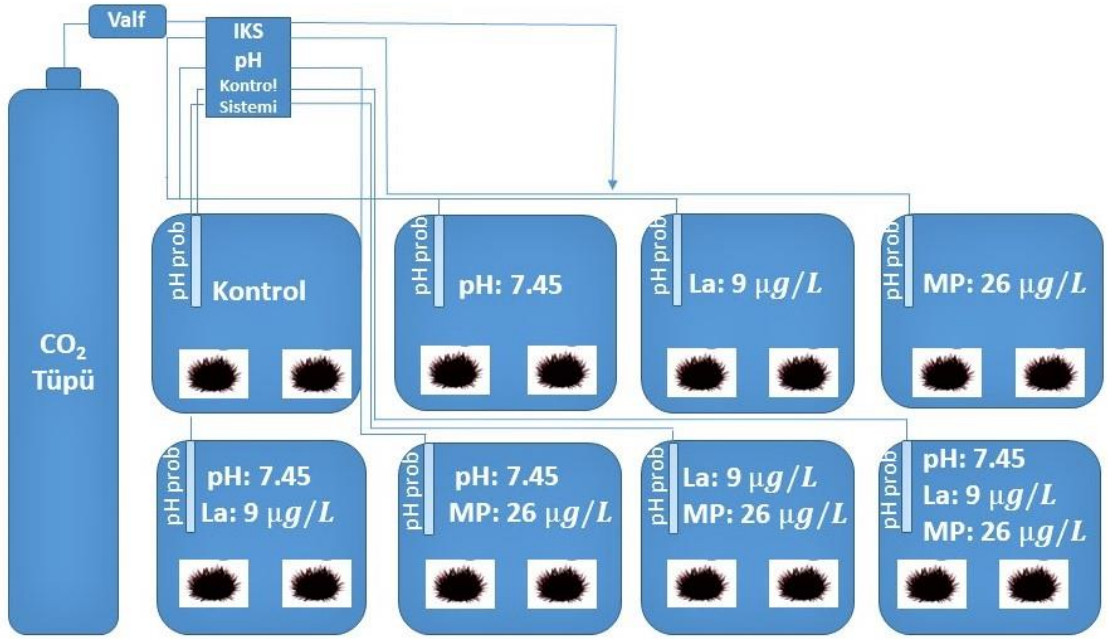
Çalışma aynı deneyin üç tekrarından oluşmuştur ve bütün işlemler üç kez tekrar edilmiştir. Tez çalışması için model organizma olarak denizkestanesi *A. lixula* türü seçilmiştir. Denizkestaneleri Çanakkale Saros Körfezi'nden (40°30'31.7" N 26°41'30.0" E) 1-2 metre derinlikteki kıyıda her bir tekrar için sırasıyla 14.11.2022, 13.01.2023, 16.02.2023 tarihlerinde toplanmıştır. Saros Körfezi, Çanakkale Boğazı ve Ege Denizi'nin kuzeyinde yer almaktadır. Örneklerin toplanması mevsimde literatüre göre sıcaklık yıl boyu en yüksek 24,5°C en düşük 13,0 °C, pH yıl boyu en yüksek 8,53 en düşük 7,91'tür (Türkoğlu ve diğ., 2004). Denizkestanelerinin toplandığı koordinatlarda Hach marka HQ40 model çoklu-parametre cihazı ile tuzluluk, sıcaklık ve pH yapılmıştır. Bu ölçümler her tekrar için ayrı olarak yapılmış ve mevsim farklılıkları gibi nedenlerden dolayı sonuçlar farklılık göstermiştir. Üç tekrar için parametrelerin ortalama değerleri ve standart sapmaları şu şekildedir: Tuzluluk $38 \pm 0,7$, sıcaklık $14,4 \pm 0,4$ °C ve pH $7,99 \pm 0,22$ olarak bulunmuştur.

Her tekrar için 70 denizkestanesi toplanmış ortamdaki deniz suyu ile taşıma kaplarına alınıp hava motorları ile oksijenlendirilerek İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Radyoekoloji Laboratuvarı'na transfer edilmiştir. Laboratuvarda bir gün sonra boy ve ağırlıkları ölçülüp eşit sayıda olacak şekilde akvaryumlara yerleştirilmiştir. Boy ölçümü denizkestanesinin oral kısmı üzerinden, dikenler dikkate alınmadan yapılmıştır. Deneyde kullanılan organizmaların ortalama boy ve ağırlıkları; birinci tekrar için 3,85 cm- 34,71 g, ikinci tekrar için 4,12 cm – 36,99 g, üçüncü tekrar için 3,83 cm – 33,00 g olarak ölçülmüştür. Başlangıç kontrolü olarak toplanan organizmalardan 8 adeti histopatolojik değerlendirme, 5 adeti ise sölomosit sayısı ve yaşayabilirliği değerlendirilmesi için deney setine alınmadan önce ayrılmıştır. Ayrıca 8 organizma yedek olarak ayrılmış ve adaptasyon şartlarında tutulmuştur.

Çalışmanın her tekrarına ait deney düzeneğinde 12 L yapay deniz suyu içeren 8 akvaryum ve her akvaryumda 7 organizma olmak üzere toplam 56 organizma kullanılmıştır. Dolayısıyla çalışmada toplamda 168 denizkestanesi kullanılmıştır. Deney düzeneğindeki pH takibi ve pH'ın düşürülmesi IKS Aquastar pH kontrol sistemi ile sağlanmıştır. pH'ın istenilen seviyelere düşürülmesi bu sisteme bağlı CO₂ tüpünden gelen CO₂ ile gerçekleştirilmiştir. Akvaryum

maruziyeti için MP 26 $\mu\text{g/L}$, La ise 9 $\mu\text{g/L}$ değerinde hazırlanmıştır. OA için çalışılan değer gelecek senaryolarda gösterilen pH_T 7,45 olarak seçilmiştir.

Deney düzeneği kontrol grubu ile birlikte tekli, ikili ve üçlü stresör uygulamalarını içerecek şekilde 8 akvaryumdan oluşmaktadır. Şekil 3.1’de gösterildiği üzere 1. akvaryum kontrol grubunu, 2. akvaryum OA’nın tekli stresini 3. akvaryum La’nın tekli stresini, 4. akvaryum MP’nin tekli stresini, 5. akvaryum OA ve La ikili stresini, 6. akvaryum OA ve MP’nin ikili stresini, 7. akvaryum La ve MP ikili stresini ve 8. Akvaryum OA, La ve MP’nin üçlü stresini içermektedir.



Şekil 3.1: Deney setinin şematik gösterimi.

Her bir akvaryum içinde stresörlerin dağılımını sağlamak için karşılıklı konumlandırılmış iki su altı hava motoru (Eheim 300), pH’ı ölçmek için bir pH probu, sıcaklığı ölçmek için bir sıcaklık probu, pH’ı yükseltmek için bir sodalime (kireç taşı) hortumuna bağlı difüzörü ve düşük pH gruplarında pH’ı düşürmek için bir CO₂ hortumu konumlandırılmıştır. Canlılar üç gün arayla her bir akvaryuma 20 g *Ulva lactuca* ve *Chondrus crispus* makroalglerinden bir karışım verilerek beslenmiştir. Laboratuvara getirilen organizmalar üzerinde ortam değişikliğinden kaynaklı stresin minimal düzeyde tutulması için denizkestaneleri kademeli olarak yapay deniz suyuna alıştırılmış ve iki gün sonra çalışmaya tamamen yapay deniz suyu ile devam edilmiştir. Akvaryum suları, organizmaların toplandığı Saros Körfezi’nin tuzluluk

değeri göz önünde bulundurularak distile su ile 'Instant Ocean' marka deniz tuzu karıştırılarak hazırlanmıştır. Akvaryumların suyu her gün değiştirilmiş ve stresörler yenilenmiştir. Distile su ve tuzdan gelebilecek MP kontaminasyonunu önlemek için hazırlanan yapay deniz suyu 20 µm çelik elekten geçirilerek akvaryumlara aktarılmıştır. Su içerisinde stresör kalmaması için su eklenmeden önce tuzlu su ile akvaryumlar temizlenmiştir. Deney süresince denizkestaneleri doğal ortamlarına benzer şekilde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık günlük ışık periyodunda tutulmuştur. Laboratuvarda sıcaklık 19-21°C değerleri arasında tutulmuştur. Deney süreci her bir tekrar için 9 günlük alıştırmaya periyodu ve sonrasında 14 günlük maruziyet periyodunu kapsayacak şekilde tamamlanmıştır.

3.2.OKYANUS ASİTLENMESİ MARUZİYETİ

8 günlük alıştırmaya periyodu sonunda canlılarda ani stres oluşturmamak adına 9. gün 4 adet akvaryumda pH kademeli olarak 7,75'e düşürülmüştür. Sonraki gün ise hedef değer pH 7,50'ye düşürülerek tam maruziyete başlanmıştır. Kontrol grubuna pH değeri olarak Saros Körfezinin doğal ortam pH'ı olan 8,22 uygulanmıştır. Sıcaklık ve pH değerleri IKS Aquastar deniz suyu şartlandırma sistemi kullanılarak devamlı olarak takip edilmiş ve söz konusu değerler 15 dakikada bir bağlı olduğu bilgisayara otomatik olarak kaydedilmiştir. Deney süresince kaydedilen değerlerin ortalaması alınarak her akvaryum için uygulanan pH değeri bulunmuştur. pH ölçümü için her akvaryumda IKS Aquastar marka referans elektrot içeren jel dolgulu cam pH problemleri kullanılmıştır. Deney düzenğinde pH değeri hedef değerin 0,05 pH seviyesi üzerine çıktığında pH probu yoluyla bunu algılayan IKS Aquastar'ın CO₂ tüpün selenoid valfine sinyal göndermesi ve valfin açılarak pH'ı istenen seviye gelinceye dek akvaryuma saf CO₂ yollaması yolu ile kontrol altında tutulmuştur (Sezer ve diğ., 2018). Akvaryumlara dışarıdan özellikle fiber tipteki MP'lerin karışmaması için çalışma esnasında önlük giyilmiş ve akvaryumlar cam kapaklarla kapatılmıştır. Ayrıca, laboratuvar gibi kapalı ortamlar içerisindeki CO₂ seviyesinin ortalama atmosfer konsantrasyonu olan 420 ppm'in üzerine çıkması sebebiyle yüksek pH düzenğinde bulunan akvaryumların doğal çevresel pH olan 8,22 seviyesinde tutulmaları için akvaryumlara bir motor yardımıyla sürekli olarak CO₂ absorplayıcı reaktif maddeler içeren kireç taşı (sodalime) ile zenginleştirilmiş hava verilmiştir.

3.3. TOPLAM PH (pH_T) KALİBRASYONU

Akvaryumlarda kullanılan pH problemlerinde serbest hidrojen skalası (pH_{NBS}) kullanılmaktadır ve bu skala ile sadece serbest hidrojen iyonları ölçülmekte, deniz suyundaki sülfat ve florit iyonları dikkate alınmamaktadır. Toplam pH skalasında (pH_T) serbest hidrojen iyonlarına ek olarak sülfat ve florit iyonları da ölçülmektedir. Deniz suyu pH ölçümlerinde, H⁺ iyonları yanı sıra florid ve sülfat iyonlarının da ölçülebilmesi sonucu doğru pH ölçüm sonuçları alınması adına pH_T skalası kullanılmalıdır (Dickson ve diğ., 2007).

Tris hidroklorik asit (HCL) tamponu (eşmolal Tris buffer 0.04 mol kg⁻¹-H₂O Tris+0,04 mol kg⁻¹-H₂O Tris-HCl) kullanılarak potansiyometrik yöntemle ölçülen pH kalibre edilerek toplam pH (pH_T) hesaplanabilmektedir. Deney çalışması için A.B.D.'nin Scripps Institution of Oceanography Marine Physical Laboratory'den tedarik edilen Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) HCL tamponu kullanılmıştır (Dickson ve diğ., 2007). Bu tampon kullanılarak akvaryumlarda IKS sisteminin vermiş olduğu pH_{NBS} değerlerine karşılık gelen pH_T değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada sonuçlar kısmında verilen tüm pH değerleri pH_T ölçeğinden verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Her tekrar ve Saros su örneği için pH_T sonuçları (pH_T sonuçları her tekrar süresi için ilgili akvaryumlarda ölçülen değerlerin ortalaması şeklinde yazılmıştır. Organizmaların toplandığı alandan alınan su örneklerinin pH_T'sinin ortalama değeri alınmıştır).

	Düşük pH _T	Kontrol pH _T
1. Tekrar Ort.	7,46	7,97
2. Tekrar Ort.	7,45	8,05
3. Tekrar Ort.	7,45	8,05
Denizkestanelerinin toplandığı kıyı (Ort)	8,11	

3.4. MİKROPLASTİK VE LANTAN MARUZİYETİ

Çalışmada kullanılmak üzere tercih edilen MP'ler Cospheric (ABD) firmasından temin edilmiş olup boyutları 10-45 µm arasında olan floresan boyalı polietilen küreciklerdir. Polietilen MP ağırlıklı olarak ambalaj malzemeleri, kozmetik ve temizlik ürünlerinde kullanılmakta olup en

çok üretilen polimerlerden biri olmasından dolayı tercih edilmiştir (PlasticsEurope, 2018). Mikroplastik maruziyeti içeren dört akvaryumun her birine çevresel konsantrasyon değerine uygun olacak şekilde $26 \mu\text{g L}^{-1}$ MP stok solüsyonundan eklenmiştir (Zhang ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2021). Üç tekrar için toplam MP stok çözeltisi süzölmüş 400 mL yapay deniz suyuna sırasıyla 62,4 mg MP ve 0.24 mL Tween-80 eklenerek hazırlanmıştır. Stok solüsyondaki Tween-80, MP'lerin topaklanmasını önleyip akvaryumlara eşit MP dağılımını sağlamak için ilave edilmiştir. Eklenen Tween-80 oranının her bir akvaryumda %0.00001 düzeyinde olması sağlanmıştır. Söz konusu Tween-80 seviyesinin canlılarda herhangi bir toksik etkiye sebep olmadığı gösterilmiştir (Olbrich ve diğ., 2004). Dolayısıyla kontrol grubuna Tween-80 eklemeye gerek duyulmamıştır. Deney boyunca MP maruziyeti bulunan akvaryumlara MP ana stoğundan her seferinde 2 mL aktararak her bir akvaryumdaki konsantrasyonunun hedef değerinde ($26 \mu\text{g L}^{-1}$) olması sağlanmıştır.

Mikroplastik maruziyeti gerçekleştirilen akvaryumlardaki MP tanecik sayısını belirlemek için MP eklenen akvaryumdan 1 saat sonra 50 mL su alınmış $0,22 \mu\text{m}$ boyutlu filtreden geçirilmiş ve stereomikroskop ile sayılmıştır. Üç tekrar için yapılan sayımlar sonucu MP maruziyeti akvaryumlarında MP sayısı $1,150 \pm 768$ partikül L^{-1} (ortalama $\pm$ standart sapma) olarak belirlenmiştir.

Akvaryumlarda gerçekleştirilecek La stresi için LaCl_3 kullanılmıştır. La stok solüsyonu, $0,22 \mu\text{m}$ boyutlu filtre kağıtları ile süzölen 400 mL distile suya 21.6 mg LaCl_3 'ün ilave edilmesi ile hazırlanmıştır ve her gün La stresi gerçekleştirilen akvaryuma 2 mL eklenerek akvaryumdaki konsantrasyonun çevresel değer olan $9 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cunha ve diğ., 2022) olması sağlanmıştır.

Bütün üç stresör için uygulanan değerler göz önünde bulundurularak uygulanan maruziyet değerleri Tablo 3.2'de bulunmaktadır.

Tablo 3.2: Deneyde uygulanan pH_T, MP ve La değerleri.

Deney grubu	pH _T	MP	La
Kontrol	8,02	-	-
Düşük pH	7,45	-	-
MP	8,02	26 µg L ⁻¹	-
La	8,02	-	9 µg L ⁻¹
Düşük pH-MP	7,45	26 µg L ⁻¹	-
Düşük pH-La	7,45	-	9 µg L ⁻¹
MP-La	8,02	26 µg L ⁻¹	9 µg L ⁻¹
Düşük pH-MP-LA	7,45	26 µg L ⁻¹	9 µg L ⁻¹

3.5.SOLUNUM ORANI ÖLÇÜMÜ

14 gün maruziyetin son günü denizkestanelerinde solunum testi yapılmıştır. Oksijenli solunum yapan canlıların dışarıdan hava almayan bir kapta belirlenen sürede tükettiği çözünmüş oksijen miktarı ile solunum oranı hesaplanmaktadır (Gu ve diğ., 2019). Solunum testi için her akvaryumdan 3, toplamda 24 canlı kullanılmış ve denizkestaneleri akvaryum pH'larına uygun hazırlanan deniz sularından geçirilerek MP ve La'dan arındırılmıştır. Teste alınan denizkestaneleri tartılmıştır. Denizkestaneleri içersinde bir magnetik karıştırıcı, akvaryum pH'larına uygun temiz deniz suyu ve bir IKS Aquastar optik oksijen probu bulunan kavanozlara yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). Ardından kapların ağız dışarıdan hava almayacak şekilde parafilm ile kapatılmıştır. Beş dakika beklendikten sonra başlangıç oksijen değerleri (C_{t0}) ve bir buçuk saat sonra test sonu oksijen seviyesi (C_{t1}) not edilmiştir. Çözünmüş oksijen değerleri oksijen problemlerinin bağlı olduğu IKS Aquastar kontrol ünitesinden kaydedilmiştir. Üç adet kavanoza canlı konulmadan aynı işlemler yapılmış ve bu kavanozlar kontrol (blank) olarak

kullanılmıştır. Denizkestanelerinin yaş ağırlığı başına düşen oksijen tüketimi ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Belivermiş ve diğ., 2023).

$$SO = [C_{t_0} - C_{t_1}] \times V / N \times M \times t$$

SO: Denizkestanesi gramı başına solunum oranı, $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$,

C_{t_0} :Başlangıçtaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$,

C_{t_1} :Bir buçuk saat sonraki çözünmüş oksijen konsantrasyonu, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$,

V: Solunum kabının hacmi (600 mL),

t: Test süresi (1,5 saat),

N: Solunum kabında bulunan denizkestanesi sayısı (1)

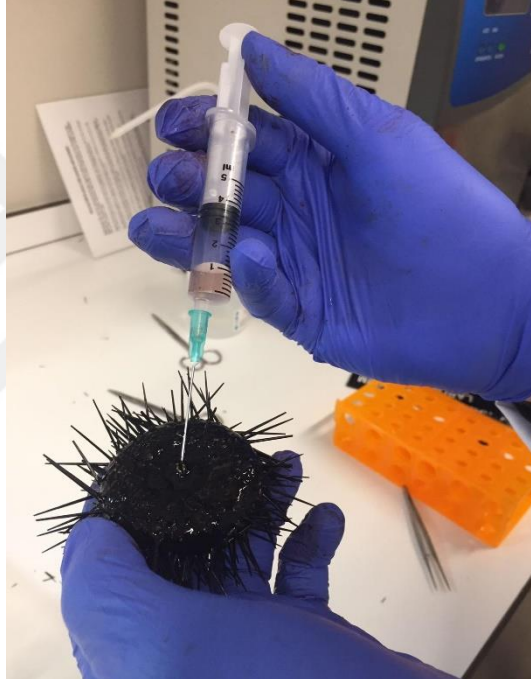
M: Bir denizkestanesinin yaş ağırlığı (g)



Şekil 3.2: Solunum oranı ölçüm deneyi.

3.6.SÖLÖM SIVISI ÖRNEKLERİNİN ALINMASI, SÖLÖMOSİT SAYIMI VE ORGANİZMA DİSEKSİYONU

9 günlük adaptasyon ve 14 günlük maruziyet sonunda ağırlık ölçümü, sölom sıvısı alımı ve diseksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak ağırlıkları ölçülen canlılardan sölomosit yaşayabilirliği ve toplam sölomosit sayımı için sölom sıvısı alınmıştır. Enjektör ağız kısmında bulunan peristomal bölgeden, bağırsağa, gonadlara ve diğer organlara zarar vermemek için 45°'lik açı ile batırılarak sölom boşluğundan 1 mL sölom sıvısı alınmıştır (Şekil 3.3).

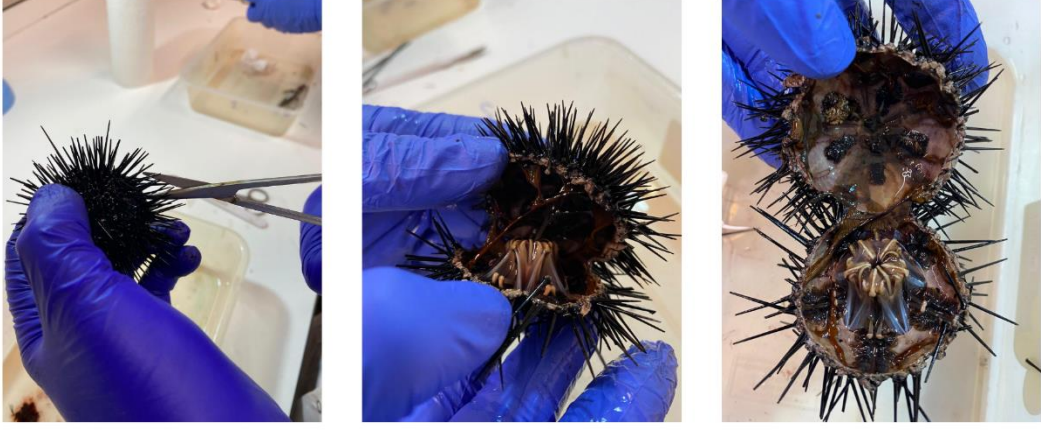


Şekil 3.3: Denizkestanesinden sölom sıvısı alımı.

Denizkestanesi sölomositlerini belirli bir süre boyunca canlı tutmak ve pıhtılaşmayı önlemek için genellikle EDTA ve EGTA şelatlayıcı maddeler kullanılmaktadır (Matranga ve diğ., 2015). Toplam sölomosit sayımı için her akvaryumda bulunan 3 canlıdan 1:1 oranında antikoagülant (20 mM Tris, 0,5 M sodyumklorür (NaCl), 70 mM EDTA pH 7,5): sölomosit olacak şekilde steril 21G uçlu enjektörler kullanılarak sölom sıvısı örneği alınmıştır (Arizza ve diğ., 2007). Sölomosit sayımı ışık mikroskopunda Thoma lamı kullanılarak yapılmış dolaşımdaki total sölomosit sayısı açısından deney grupları arasındaki farklar değerlendirilmiştir.

Sölomosit yaşayabilirliği Arizza ve diğ. (2007) tarafından yapılan çalışmaya göre gerçekleştirilmiştir. Her deney grubundaki 3 canlıdan ayrı ayrı alınan 500 µl sölom sıvısı, hümmoral kompartımanı elemine etmek için 900 g +4 °C’ de 10 dk. boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından hücreler aynı hacimdeki izoosmotik antikoagülant solüsyon ile resüspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonuna 50 µl %0,2 tripan mavisini boya eklenerek karıştırılmış ve +4 °C’de 5 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler Thoma lamına aktarılıp ışık mikroskobu (Olympus SZ 51) altında dört farklı sölomositin (fagosit, renksiz sferül, kırmızı sferül ve titreşimli hücre) ayrı ayrı sayımı yapılarak toplam sölomosit sayısı belirlenmiştir. Ayrıca mikroskop altında yapılan incelemede dört farklı tipteki sölomositin yaşayabilirliği tespit edilmiştir. Hücre yaşayabilirliği tripan mavisini uygulaması ardından hücrelerin inkübasyon sonrasında canlı hücrelerin total hücre sayısına oranı ile ifade edilmektedir (Bianchi ve diğ., 2019). Strese maruz kalan deniz omurgasızlarının hücrelerinde canlılık genel olarak azalmaktadır. Ölü hücreler tripan mavisini hücre içine alıp boyanırken canlı hücreler boyanmadığından canlı/ölü hücre sayıları bu test ile belirlenebilmektedir. Yapılan analiz sonucu canlı hücrelerin total hücre sayısına oranı % olarak hesaplanmıştır.

Sölom sıvısı alınan organizmalardan histopatolojik analiz için doku örneği de alınmıştır. Şekil 3.4’te gösterildiği gibi diseksiyon işleminde organizmanın kabuğu, oral ve aboral kısmın ortasından 1 cm kalacak şekilde yatay olarak makas ile kesilmiştir. İki kısma ayrılan organizma hafifçe açılarak histopatolojik analiz için sindirim sisteminin bir bölümü olan özofagus alınmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Denizkestanesi diseksiyonu.

3.7.HİSTOPATOLOJİK ANALİZ

Organizmadan disekte edilerek alınan özofagusun histopatolojik analizde kullanılmak üzere uygun hale gelmesi için kalıcı preperatı hazırlanmıştır. Dokuların incelenmek üzere hazırlanması için yapılması gereken işlemler sırasıyla; tespit (fiksasyon), suyundan arındırma (dehidratasyon), saydamlaştırma, parafine gömme, blok hazırlama, kesit alma ve boyama işlemleridir (Bancroft ,1990; Culling, 1974). Fiksasyon işleminde amaç dokuyu olabildiğince hızlı ve bozmadan stabil hale getirmek olduğu için dokular disekte edildiği anda bouin solüsyonuna alınmıştır. Bouinde tespitten sonra doku parçaları pikrik asidin sarı rengi giderilene kadar %70 alkol banyolarından geçirilmiştir. Dokular genellikle fazla miktarda su içerir. Bu suyun çıkarılması ile erimiş parafin doku içine nüfuz edebilir. Dokudan su çekme işlemine dehidratasyon denir. Dehidratasyon işleminde dokular sırayla artan konsantrasyonlarda (%80, %90, %96 ve %100) alkolden geçirilmiş ve böylece dokulardan su çekilmiştir. Dokudan dehidratlayıcı ajanı uzaklaştırmak için de doku iki aşamalı olarak ksilolde bekletilmiştir. Ksilol sertleştirici madde ile geçimli olabildiği ve dokuya etkisi daha hassas olduğu için saydamlaştırma işleminde tercih edilmiştir. Saydamlaştırma işlemi sonrası dokular parafin içerisine gömülür. Amaç, dokuları yarı sert ve kolay kesilen materyal içine yerleştirmek ve saydamlaştırıcı ajanı dokudan uzaklaştırmaktır. Uygun takip hızı ve seri kesit için uygun kıvamı olduğundan parafin en çok tercih edilen ortamdır. Doku ısıya alışması amacıyla

42°C'deki parafine gömülerek bir gece bekletildikten sonra 58°C'deki parafine aktarılarak iki saat bekletilmiştir. Daha sonra dokular metal bloklara dökülmüş parafinlerin içine dikey olarak yerleştirilmiştir. Bloklar hazır olunca mikrotom 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak albumin mayer ile kaplanmış lamlara yapıştırılmıştır. Örneklerin genel histolojik yapısını incelemek amacıyla hemotoksilen-eozin (H&E) boyası, nötral müsin içeren yapıları incelemek için ise periyodik asit-Schiff (PAS) ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonrası lamalar Entellan ile kapatılarak mikroskopik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Kript uzunluklarını belirlemede Nikon Eclipse mikroskop ile birlikte NIS-Elements D 3.1 programı kullanılmıştır. Epitel kalınlığı ölçümleri ise Stream 1_9_4 programı ile gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri mikroskop incelemeleri sırasında fotoğraflanmıştır.

3.8.VERİLERİN İSTATİSTİK ANALİZİ

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 22 programı kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle Kolmogorov-Smirnov testi ile verilerin normal dağılım şartlarını karşılayıp karşılamadığı ve Levene testi ile varyansların homojenliği değerlendirilmiştir. Yapılan bu testler sonucunda tüm veri setinin normal dağılıma uymadığı belirlenmiştir. Bu nedenle gruplar arası karşılaştırmanın yapılmasında parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testi tercih edilmiş sonrasında kontrol ve stresör gruplarının ikili karşılaştırmasının yapılmasında Dunn post-hoc testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri ise GraphPad Prism 5 programı ile çizilmiştir. |

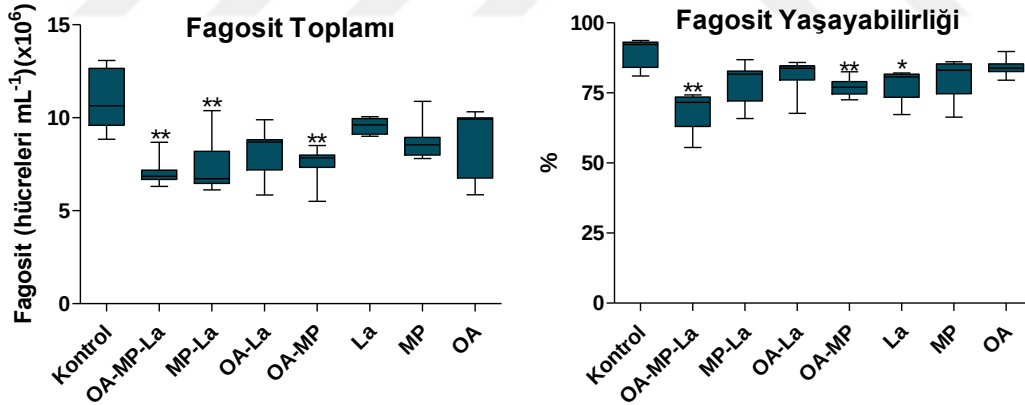
4. BULGULAR

4.1. MORTALİTE

Deney süresince ölüm gözlenmediğinden, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yaşayabilirlik açısından bir fark bulunmamaktadır.

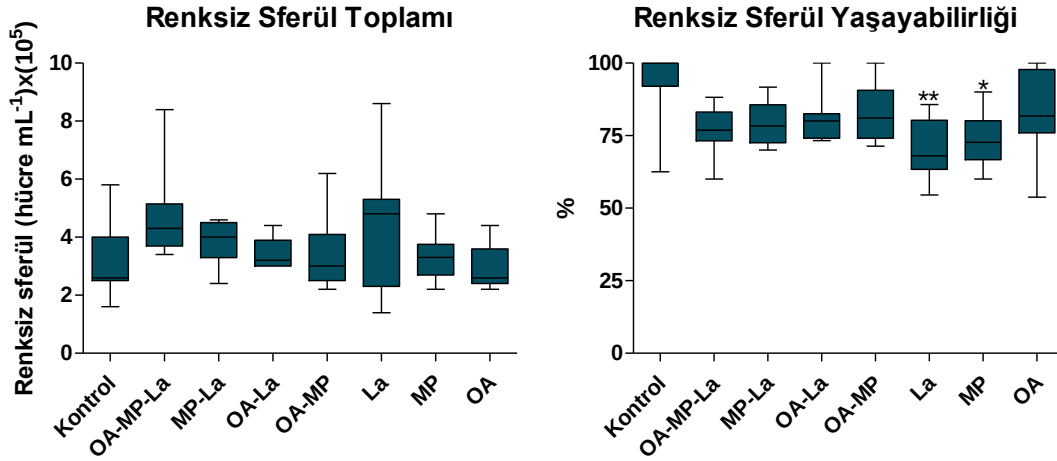
4.2. SÖLİMOSİT SAYIM SONUÇLARI

Çalışmada sölomositlerin dört farklı hücre tipi dikkate alınarak değerlendirmelerde bulunulmuştur. Mikroskopta sayım işlemi sonucu sölomositler içinde en yüksek oranda olan grup fagositler olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre fagosit hücre toplamında kontrol ile OA-MP-La, MP-La ve OA-MP maruziyetli stresör grupları arasında anlamlı farklar belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$) (Şekil 4.1). Fagosit hücre yaşayabilirliği bakımından ele alındığında ise kontrol grubu ile OA-MP-La, OA-La ve La maruziyetli stresör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$) (Şekil 4.1).



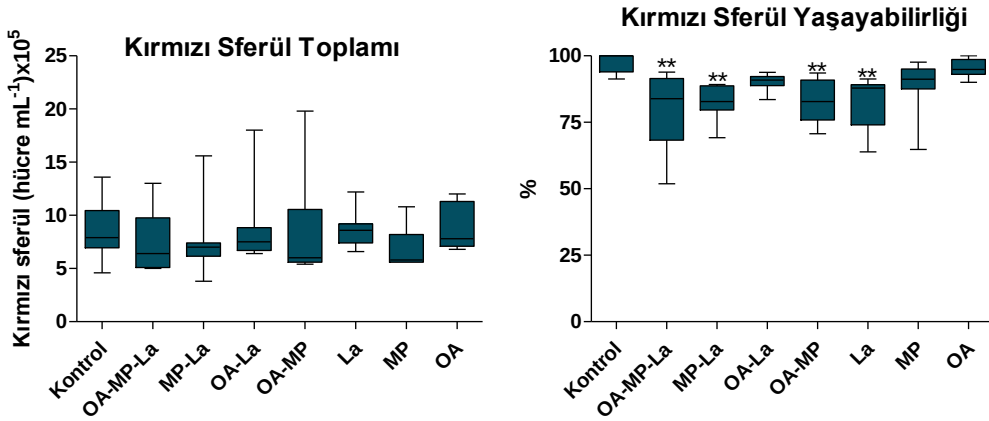
Şekil 4.1: Denizkestanesi sölom sıvısında fagosit sayısı ve yaşayabilirliği (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) (n=9).

Renksiz sferül sayısı kontrol ve stresör grupları karşılaştırmasında herhangi bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.2). Söz konusu hücreler yaşayabilirlik bakımından ele alındığında ise kontrol grubu ile MP ve La tekli stresör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$) (Şekil 4.2).



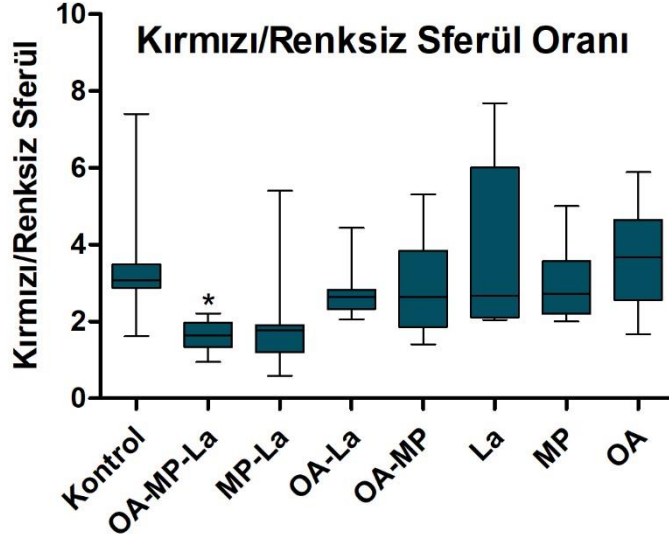
Şekil 4.2: Denizkestanesi sölom sıvısında renksiz sferül hücre sayısı ve yaşayabilirliği (*p<0,05, **p<0,01) (n=9).

Kırmızı sferül toplamının kontrol ve stresör grupları karşılaştırmasında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Ancak, kırmızı sferül yaşayabilirliği kontrol grubu ile OA-MP-La, MP-La, OA-MP ve La stresör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir (p<0,01) (Şekil 4.3).



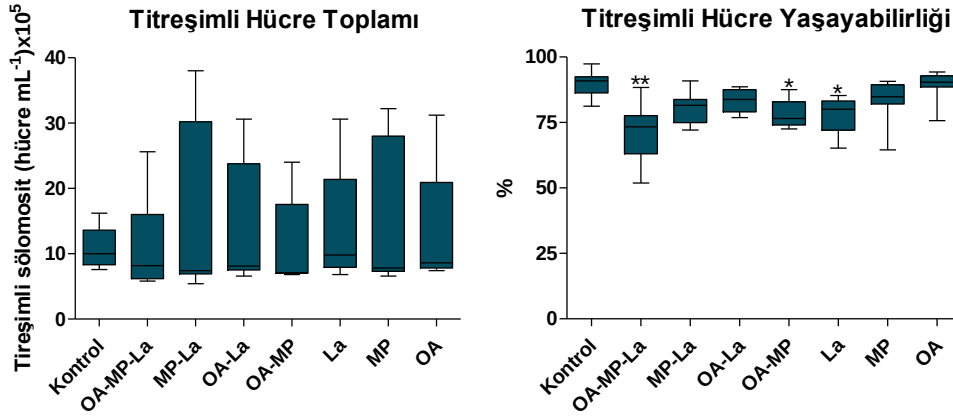
Şekil 4.3: Denizkestanesi sölom sıvısında kırmızı sferül hücre sayısı ve yaşayabilirliği (**p<0,01) (n=9).

Kırmızı sferül/renksiz sferül oranı açısından kontrol ve stresör grupları karşılaştırmasında sadece kontrol grubu ile OA-MP-La stresör grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (*p<0,05) (Şekil 4.4)



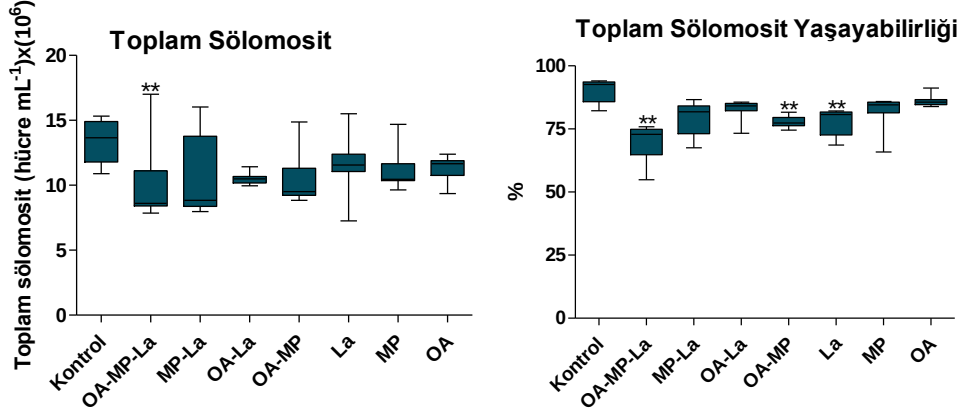
Şekil 4.4: Denizkestanesi sölom sıvısında kırmızı sferül hücrelerinin renksiz sferül hücrelerine oranları (* $p<0,05$) (n=9).

Titreşimli hücre sayısı kontrol ve stresör grupları karşılaştırmasında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Buna karşın, titreşimli hücre yaşayabilirliği kontrol grubu ile OA-MP-La, OA-MP ve La stresör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,01$) (Şekil 4.5)



Şekil 4.5: Denizkestanesi sölom sıvısında titreşimli hücre sayısı ve yaşayabilirliği (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) (n=9).

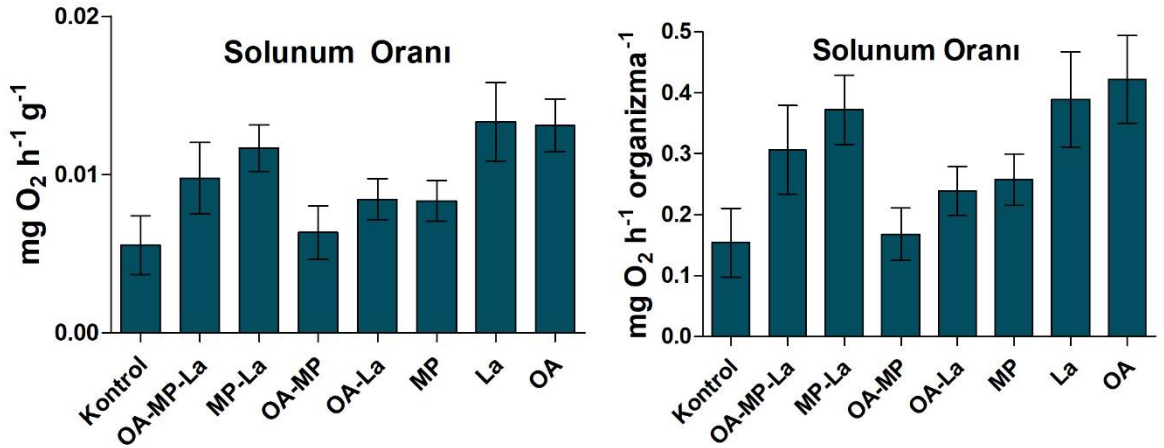
Sölomosit sayısı (tüm sölomosit tipleri toplamı) kontrol ve stresör grupları karşılaştırmasında kontrol grubu ile sadece OA-MP-La üçlü stres grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir. Toplam hücre yaşayabilirliği kontrol grubu ile OA-MP-La, OA-MP ve MP stresör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar belirlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.6)



Şekil 4.6: Toplam sölomosit sayısı ve yaşayabilirliği (**p<0,01) (n=9).

4.3.SOLUNUM TESTİ SONUÇLARI

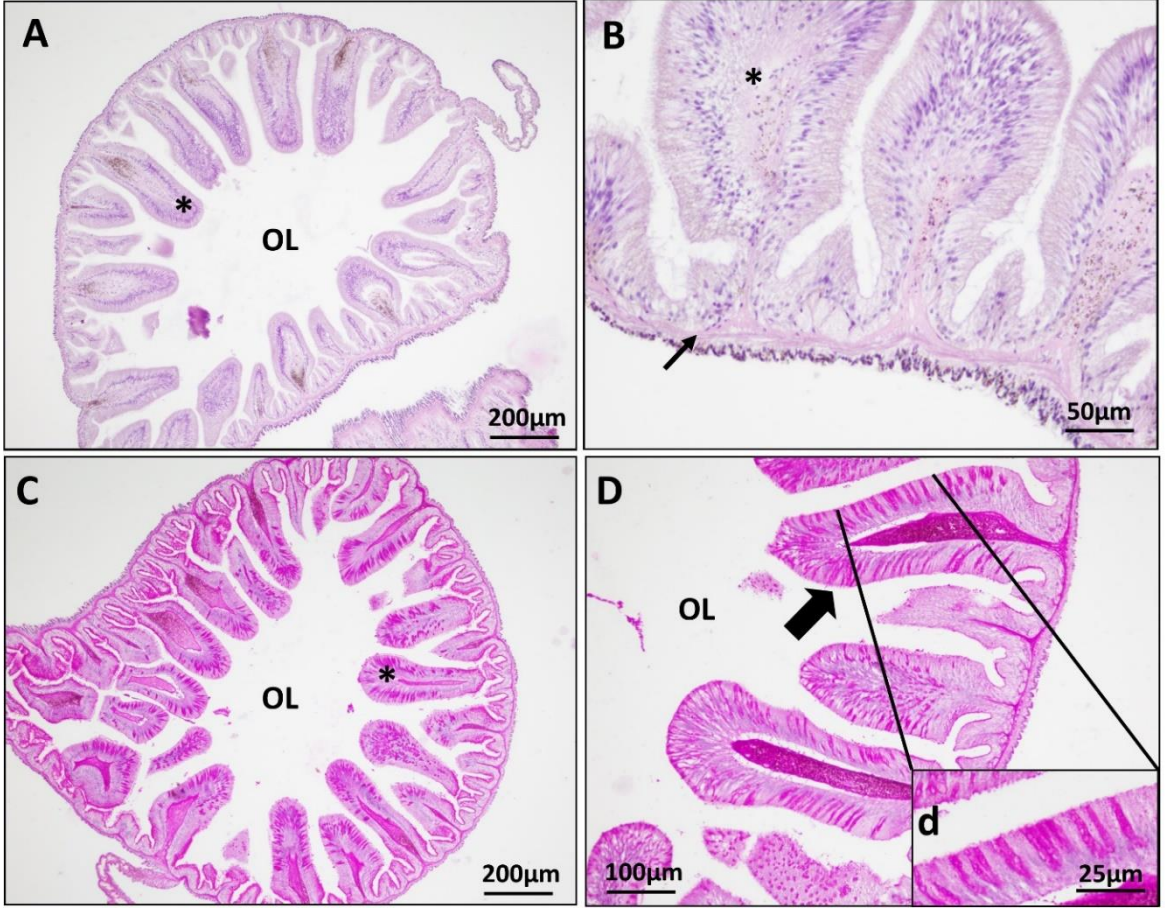
Solunum testi birey başına ve ağırlık (g) başına oksijen (O₂) tüketimi olmak üzere iki ayrı birim bakımından incelenmiştir. Her iki hesaplama göre kontrol ve stresör grupları arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunmamıştır (p> 0,05) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Organizma ağırlığına ve birey başına düşen solunum oranları (n=9).

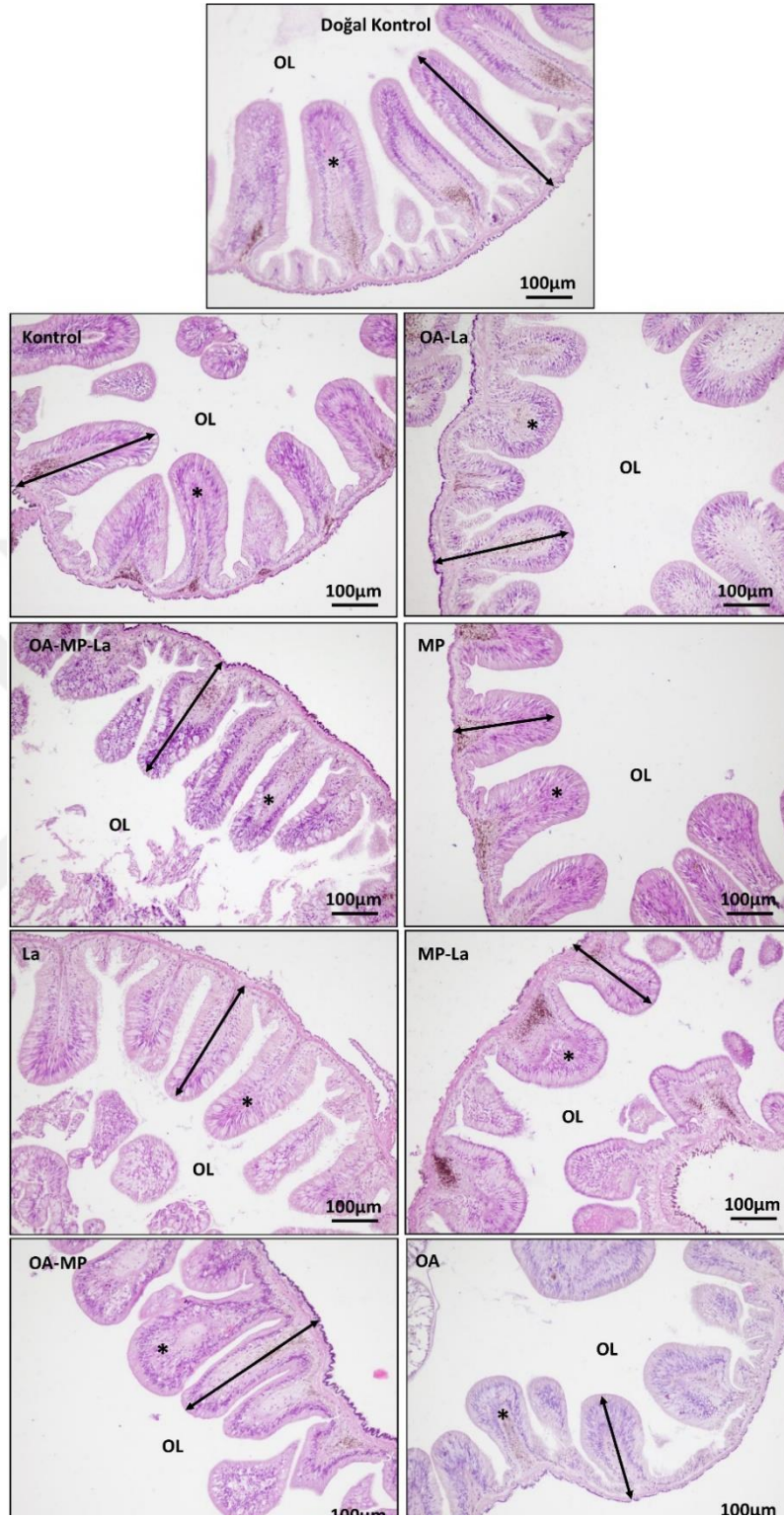
4.4.HİSTOPATOLOJİ ANALİZ SONUÇLARI

Tez çalışmasında denizkestanesi özofagus dokusunun epitel kalınlıkları ve kript boy uzunlukları dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. İki farklı boya (H&E ve PAS) ile boyanmış özofagus dokusunun enine kesitinin genel görünümü Şekil 4.8’de verilmiştir.

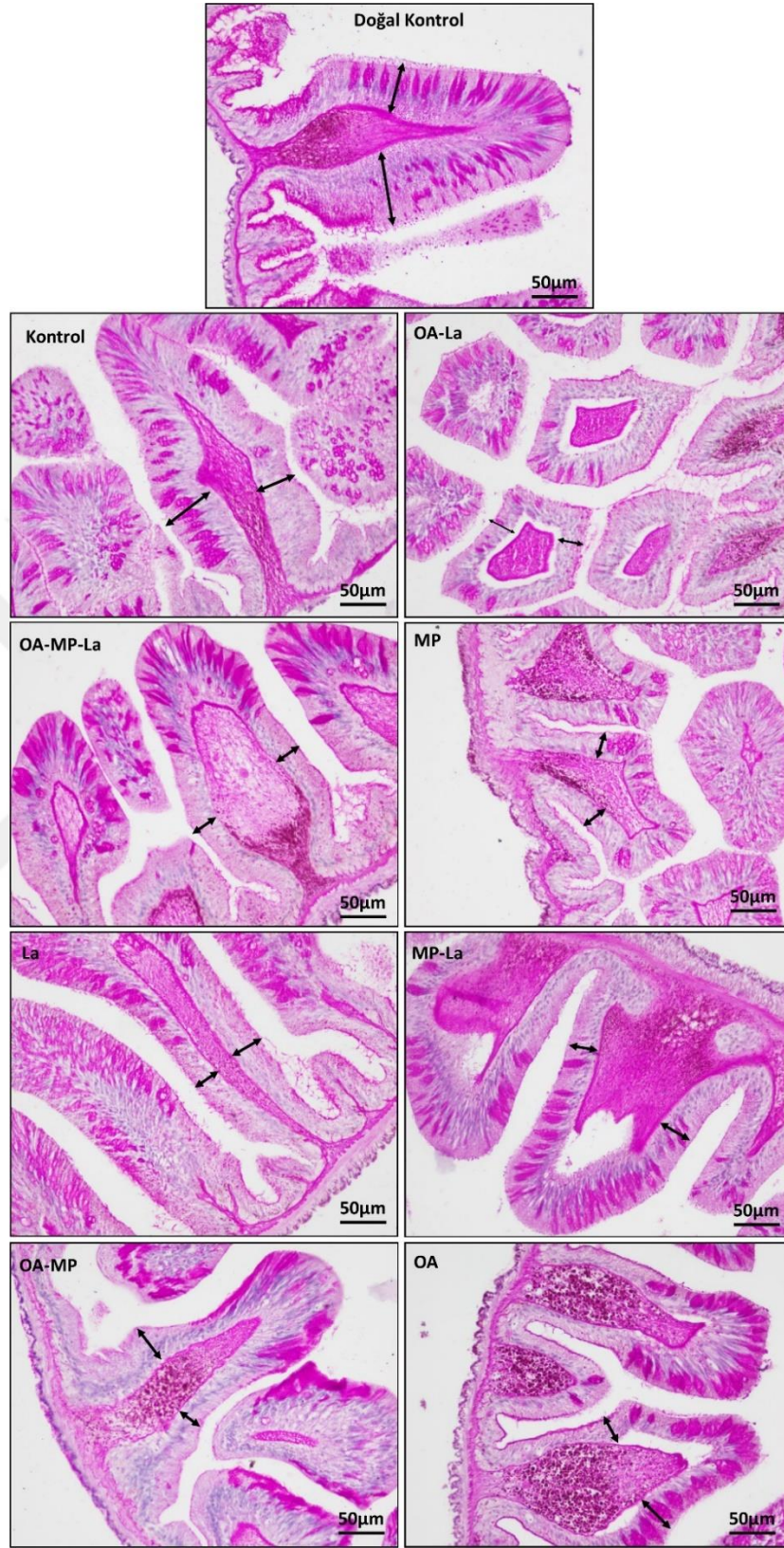


Şekil 4.8: Denizkestanesi özofagus dokusunun enine kesiti (OL: Özofagus lümeni, *: Kript, ince ok: Kas doku, kalın ok: Özofagus epiteli, A-B: Hematoksilen-Eozin boyama, C-D: PAS boyama, d: Epitel doku yakın görünümü).

Hematoksilen-Eozin ile boyanmış doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus enine kesitlerinde kript boy uzunluklarındaki değişiklikler Şekil 4.9’da yer almaktadır. Periyodik asit-Schiff boyama ile doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus kesitlerinde epitel kalınlıklarındaki değişiklikler ise Şekil 4.10’da verilmiştir.

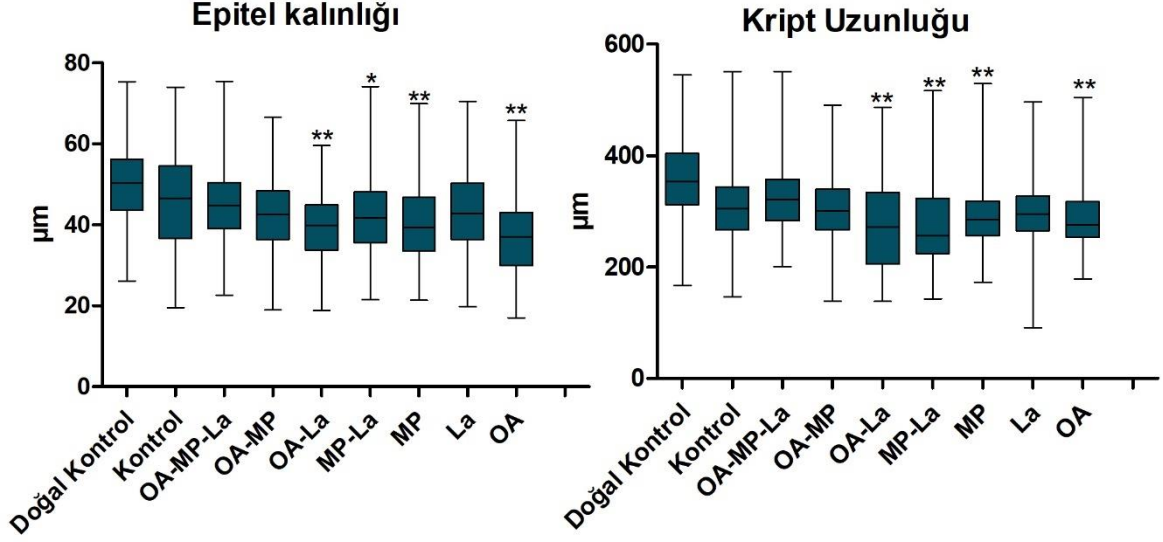


Şekil 4.9: Hematoksilen- Eozin boyama ile doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus kesitleri (OL: Özofagus lümeni, karşılıklı oklar: Kript uzunluğu, *: Kript içerisindeki bağ doku kısımları).



Şekil 4.10: PAS boyama ile doğal kontrol ve deney gruplarının özofagus kesitleri (Karşılıklı oklar epitel kalınlığını göstermektedir).

Özofagus epitel kalınlığı ve kript uzunluğu için kontrol grubu ile OA-MP, MP-La, MP, OA stres grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Denizkestanesi özofagusu epitel kalınlığı ve kript uzunluğu (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) (Tüm gruplar $n=9$, $n_{DK}=8$).

4.5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Antropojenik etkiler sonucu deniz ekosistemlerinde yaşayan canlılar farklı stresörlere birlikte maruz kalmaktadır. Ancak, bu stresörlerin denizel ekosistemlerde yaşayan türler üzerine çoklu etkilerine yönelik araştırmalar literatürde sınırlı sayıda yer almaktadır. Bu tez çalışması literatürdeki bahsi geçen boşluğun çalışılan tür ve stresörler bağlamında doldurması açısından önemli görülmektedir. Çalışmada *A. lixula* denizkestanesi türü 14 günlük MP, La ve OA stresörlerine tekli, ikili ve üçlü olarak maruz bırakılmış ve söz konusu maruziyet sonucunda bu stresörlerin etkileri araştırılmıştır. Kullanılan stresörlerin etkileri dört farklı sölomositin toplamı ve yaşayabilirliği, solunum oranları ve histopatolojik etkileri (kript boyu uzunluğu ve epitel kalınlığı) olmak üzere farklı açılardan ele alınmıştır. Çalışmada laboratuvar ortamına taşınan organizmalardan bir kısmı histopatoloji, sölomosit toplamı ve yaşayabilirliği analizleri için alıştırma ve maruziyet süreci öncesinde doğal kontrol örnekleri olarak ayrılmıştır. Yapılan histopatolojik, sölomosit toplamı ve yaşayabilirliği testleri açısından doğal kontrol ile laboratuvar kontrolü arasında genel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu durumun

nedeni laboratuvar ortamındaki koşulların canlılar üzerinde oluşturduğu etkiler ile açıklanabilir. Laboratuvar ortam parametreleri organizmaların yaşadığı ortamı mümkün olduğunca taklit edecek şekilde düzenlenmektedir. Ancak burada organizmaların beslenmelerinde, akvaryum su sıcaklığında ve suyun fizikokimyasal parametrelerindeki ufak çaplı değişimler ile birlikte doğal ortamda bulundukları sediment ve kaya gibi yapılarının ve diğer türlerle bağlantılarının olmaması çalışılan canlılar üzerinde bir stres oluşturmuş olabilir.

4.6. TOPLAM SÖLÖMOSİT VE SÖLÖMOSİT YAŞAYABİLİRLİĞİ

Denizkestanesi sölom sıvılarının yapısında yer alan sölomositler birçok görevi yerine getirmektedir. Sölomositler derisidikenlilerin bağışıklık yanıtının hassas ve stresle aktive olan efektörleri olduğundan (Smith LC ve diğ., 2006; Matranga ve diğ., 2008) sıcaklık, deniz suyu asitlenmesi, UV-B radyasyonu ve nanoplastik (NP) gibi çevresel stresörlerin etkilerini izlemek için iyi bir biyoişaretçi olarak kabul edilmektedir (Matranga ve diğ., 2000; Matranga 2006; Marques-Santos ve diğ., 2018; Migliaccio ve diğ., 2019). Denizkestanelerinin sölom sıvısı içerisinde genel olarak dört farklı tipte sölomositin (fagosit, titreşen hücre, kırmızı sferül ve renksiz sferül) yer aldığı ve bu hücrelerin omurgalı dolaşım sıvısı hücrelerine benzer işlevleri yerine getirdiği kabul edilmektedir (Ito ve diğ., 1992; Smith ve diğ., 1995; Pinsino ve Matranga, 2015). Sölomositler hücresel tanıma, enflamatuvar reaksiyonlar, fagositoz, kapsülleme (Chia ve Xing, 1996), sitoksisite (Arizza ve diğ., 2007) ve antimikrobiyal ajanların üretimi (Schillaci ve diğ., 2010) gibi immünolojik fonksiyonlardan sorumludur. Sölomositlerin önemli bölümünü fagositler (>%80) oluşturmaktadır (Murano ve diğ., 2023). Kırmızı ve renksiz sferül hücreler ($\approx$ %13) ile titreşen hücreler ($\approx$ %7) ise daha düşük oranlarda bulunmaktadır (Pinsino ve Matranga, 2015). Denizkestanelerinde bulunan her bir hücre grubu bağışıklık için kilit işlevlere sahip olduğundan çevresel zorluklara karşı tepki ilk önce sölomosit gruplarının sayımı yoluyla değerlendirilebilmektedir (Branco ve diğ., 2013; Migliaccio ve diğ., 2019).

Fagositler strese maruziyetleri sonucunda fagositoz, pıhtı oluşturma ile yara onarımı, sitolitik aktiviteler gibi immün sisteme yönelik tepkiler vermektedir (Pinsino ve Matranga, 2014; Hillier ve Vacquier, 2007; Matranga ve diğ., 2000; Smith, 1981). Yapılan bir çalışmada *Strongylocentrotus droebachiensis* türü denizkestanesinin 5 gün boyunca yüksek pCO_2 (1275 μatm) stresine maruz bırakılması ile fagositlerin miktarında artışa neden olan bir bağışıklık tepkisinin olduğu rapor edilmiştir (Dupont ve Thorndyke, 2012). Başka bir çalışmada ise ekinodermilerden *Asterias rubens* deniz yıldızının kısa (7 gün) ve uzun (6 ay) süreli düşük pH'ya

(7,7) maruz bırakılması sonucu fagosit sayılarında bir azalma olduğu bildirilmiştir (Hernroth ve diğ., 2011). Okyanus asitlenmesine yanıt olarak dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin sayısında değişimler olduğu belirtilmiştir (Brothers ve diğ., 2016; Leite Figueiredo ve diğ., 2016; Dupont ve Thorndyke, 2012). *Paracentrotus lividus* denizkestanesi türünün MP'ye maruziyeti üzerine yapılan çalışmalarda toplam bağışıklık hücresi sayısında bir artış (Murano ve diğ., 2020) ve azalma (Sun ve diğ., 2020) şeklinde sonuçlar bildirilmiştir.

Denizkestanesinde bulunan diğer sölomositlerden renksiz ve kırmızı sferüllerin ise fagositler ile beraber immün sisteme destek olduğu düşünülmektedir (Arizza ve diğ., 2007). Derisidikenlilerden denizyıldızı *Leptasterias polaris* türünde yapılan bir çalışmada ise 7 günlük OA maruziyeti sonrası renksiz ve kırmızı sferüllerin sayısında artış olduğu bildirilmiştir (Dupont ve Thorndyke, 2012). Murano ve diğ. (2020) tarafından *P. lividus* türü denizkestanesine 24, 48 ve 72 saatlik polistiren MP (10 ve 45 µm) maruziyetinin uygulandığı çalışmada renksiz sferüllerde artış ve azalışlar olduğu belirtilmiştir. Ancak aynı çalışmada kırmızı sferüllerde özellikle 10 µm MP maruziyeti sonrasında önemli düzeyde artışlar olduğu rapor edilmiştir. Denizkestanesi sölomositlerinden kırmızı sferüllerin yapılarında ekinokrom A'yı bulundurmasından dolayı antibakteriyel olarak görev aldığı düşünülmektedir (Smith ve diğ., 1985). Daha önce yapılan bir çalışma kirlilikle indüklenen strese yanıt olarak kırmızı sferüllerin miktarında hızlı bir artış olduğunu göstermiştir (Matranga ve diğ., 2000). Yapılan başka bir çalışmada ise *P. lividus*'un 12 saat kolonize edilmiş PS-MP'ye ve sadece PS-MP'ye maruz bırakılması sonucu kolonize edilmiş PS-MP'ye maruz kalan grupta kırmızı sferül miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Murano ve diğ., 2021). Burada ekinokrom A içeren kırmızı sferüllerin sayısındaki artışa kolonize edilmiş mikro-PS'nin yüzeyindeki bakteri varlığının neden olduğu rapor edilmiştir (Murano ve diğ., 2021). Kırmızı ve renksiz sferül hücrelerinin homeostazı ait oldukları denizkestanesinin sağlık durumuna bağlıdır. Murano ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada *P. lividus*'un 10 µm MP'ye maruz bırakılması ile kırmızı/renksiz sferül oranında kontrole kıyasla 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetlerde artış olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada *P. lividus* 45 µm MP'ye maruz bırakıldıktan sonra kontrole kıyasla 24. Saatte kırmızı/renksiz sferül oranında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen 48. ve 72. saatlerde anlamlı bir artış belirlenmiştir (Murano ve diğ., 2020). Murano ve diğ. (2021) yaptığı bir başka çalışmada ise spesifik olarak kolonize mikro-PS'ye maruz bırakılan örneklerde 12 saat sonra kırmızı sferüllerin sayısının renksiz olanlardan yaklaşık 2,5 kat daha fazla

olduğunu belirlemiştir. Aynı çalışmada sadece mikro-PS'ye maruz bırakılanlarda ise 1,4 kat daha yüksek bulunduğunu rapor etmiştir.

Denizkestanesinin immün mekanizmasında yer alan diğer bir sölomosit türü titreşimli hücrelerdir. Titreşimli hücrelerin yapısında bulunan lizozom benzeri sitoplazmik granüller ile organizma bağışıklığına destek olduğu düşünülmektedir (Pinsino ve Matranga, 2014; Smith ve diğ., 2010). Yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* ile maruziyet sonucu *P. lividus*'tan alınan bağışıklık hücrelerinden titreşimli hücrelerin sayısı enjeksiyondan 3 saat sonra artış göstermiştir (Pinsino ve Matranga, 2014). *S. droebachiensis* türü denizkestanesinin 5 gün boyunca OA'ya maruziyeti sonucu titreşimli hücrelerin sayısında bir azalma olduğu bildirilmiştir (Dupont ve Thorndyke, 2012).

Toplam sölomosit sayısının ve yaşayabilirlik oranının immünolojik durumun potansiyel bir ölçüsü olduğu öne sürülmüştür (Smith ve diğ., 2006). Dolayısıyla, benzer çalışmalarda tüm bu farklı hücreler dikkate alınarak toplam hücre sayısı ve yaşayabilirliği de hesaplanmaktadır. Murano ve diğ. (2020) *P. lividus* türü denizkestanesi ile yaptığı çalışmada iki farklı boyutta (10 ve 45 µm) MP maruziyetin (24, 48, 72 saat) kontrole kıyasla toplam sölomosit sayısında artışa neden olduğunu bildirmiştir. Murano ve diğ. (2021) iki farklı yüzey yükü taşıyan PS-NP *P. lividus*'a maruziyeti sonucu toplam hücre yaşayabilirliği için kontrol grubu ile kıyaslandığında PS-NH₂'ye (25 µg mL⁻¹) maruz bırakılan sölomositlerde önemli ölçüde bir azalma belirlemiş olup PS-COOH'a maruziyeti sonrasında önemli düzeyde bir değişim tespit edilmediğini bildirmiştir. *S. droebachiensis* denizkestanesinin 5 gün boyunca yüksek pCO₂'ye maruz bırakılması toplam sölomosit sayısında artışa neden olmuştur (Dupont ve Thorndyke, 2012). Buna ek olarak, kısa süreli (7 günlük) pH 7.7'ye maruziyet sonrasında okyanus asitlenmesinin etkisine ilişkin yapılan çalışmada bir denizkestanesinde (*S. droebachiensis*) ve bir denizyıldızında (*L. polaris*) toplam sölomosit sayısında bir artış olduğu gösterilmiştir (Hernroth ve diğ., 2011). Ancak bir hafta veya altı ay süreyle OA'ya maruziyet ile birlikte denizyıldızı *A. rubens*'in toplam sölomosit konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Hernroth ve diğ., 2011). Craig (2016) tarafından yapılan çalışmada 72 saatlik akut maruziyet sonrasında kontrol koşuluyla (pH: 7,9) karşılaştırıldığında düşük pH koşuluna (pH: 7,5) maruz bırakılan denizyıldızı *Pisaster ochraceus*'un toplam sölomosit sayısında %66,6 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (p<0,027) olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların farklılık göstermesinde belirleyici hususlar uygulanan stresörlerin farklılığı,

stresörlerin düzeyleri ve maruziyet süreleridir. Mikroplastikler ile yapılan çalışmalarda ise kullanılan MP partikül boyutlarının, şekillerinin ve kimyasal içeriğinin de önemli olduğunu belirtmek gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında üç stresörün tekli ve birleşik maruziyeti sonucunda yapılan analizde; literatürdekine benzer şekilde farklı sölomosit tipleri içerisinde fagositlerin en yüksek sayıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Çalışmada toplam sölomositlerin OA-MP-La ve fagositlerin OA-MP-La, MP-La ve OA-MP gruplarında azalma ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Benzer şekilde daha önceki bir çalışmada PS-COOH (5 ve 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) maruziyeti sonucunda fagositik kapasitede düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Murano ve diğ., 2021). Çalışmamızda tespit edilen azalmanın nedeni uygulanan stresörlerin muhtemel immünotoksik etkisinden kaynaklıdır (Barua ve diğ., 2021). Buradaki immünotoksik etkiler lizozomal membran stabilitesinin değişimi, lizozom aktivitesinde artış, hücre dışı reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretimi gibi çeşitli etkiler olabilir (Bergami ve diğ., 2019). Ayrıca, uygulanan stresörlerin etkisi ile oluşan immüntoksisite sonucu hücreler sölom sıvısından ayrılmış da olabilir (Murano ve diğ., 2023). Bununla birlikte sölomosit proliferasyonu, farklılaşması, sölomik sıvıya salınımı ve aynı zamanda sölomosit apoptozu aksiyal organ denen bir yapıda gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Golconda ve diğ., 2019). Stresörlerden dolayı aksiyal organda meydana gelen değişiklikler sölomosit proliferasyonuna, farklılaşmasına ve sölomik sıvıya salınımına ket vurabilir ve sölomositlerin apoptoza uğramasına sebep olabilir (Golconda ve diğ., 2019). Dolayısıyla buradaki azalmanın nedeni uygulanan stresörlerin aksiyal organın işlevselliğini etkilenmesinden de ileri gelebilir.

Çalışmada titreşimli, kırmızı ve renksiz sölomosit sayılarında genel olarak önemli düzeyde bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Bu sonuç esas etkilenen hücre tipinin fagositler olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kırmızı/renksiz sferül oranında literatürde belirtilenin aksine anlamlı düzeyde olmasa da bir azalma tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.4). Bununla birlikte OA-MP-La grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.4). Daha önce yapılan çalışmalarda 48 ve 72 saatlik maruziyetlerde k/r oranında artışlar olduğu ifade edilmiştir (Murano ve diğ., 2020; Murano ve diğ., 2021). Bu farkın nedeni muhtemelen uygulanan maruziyet süresinin daha uzun olması (14 gün) ile birlikte üç farklı stresörün farklı seviyelerde uygulanmasıdır. Çalışmada maruziyet sonrasında kırmızı hücreler genelde azalırken renksiz olanlarda ise tam tersine bir artış olmuştur (Şekil 4.3).

Dolayısıyla kırmızı/renksiz sferül oranının düşük olmasının nedeni kırmızı hücrelerin başta üçlü maruziyette olmak üzere tüm gruplarda genel olarak renksizye göre daha fazla azalması şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmada farklı tip sölomositlerin canlılık seviyelerinde anlamlı düşüşler belirlenmiştir (Şekil 4.1, 4.3, 4.5) ($p < 0,05$). Sölomositlerin yaşayabilirliğindeki düşüşün nedeni hücrelerin stresörlere maruziyeti sonucu nekroz ve lizize uğraması ile ilgili olabilir. Çalışmada kullanılan stresörlerin etkileri farklı şekillerde olmaktadır. Örneğin sölomik sıvıya giriş yapan MP'lerin sölomositler üzerine etkisinin daha çok fiziksel yönde olabileceği öngörülmektedir. Bilindiği üzere MP'lerin fiziksel etkisi parçacık boyutu, şekli, konsantrasyonu ve maruziyet süresi ile ilgili bir durumdur. Asidifikasyon ise sölom sıvısı pH'sını ve ayrıca fagositik kapasiteyi etkilemektedir. Bu değişiklikler sölomik sıvıda meydana gelen metabolik süreçleri değiştirebilmektedir (Figueirido ve diğ., 2016). Diğer yandan OA organizma homeostasına ve sölomik sıvının asit-baz dengesine etki etmesinden dolayı da değişikliğe sebep olabilmektedir (Holtmann ve diğ., 2013). Lantan ise nükleoproteinler, amino asitler, fosfolipidler, enzimler ve hücre zarları ile reaksiyona girebilir (Cunha ve diğ., 2022). Bu element genellikle hücre zarlarından Ca^{2+} akışını engeller, mevcut bağlanma yerleri için rekabet eder ve biyolojik makromoleküllerdeki fosfat grupları için yüksek afiniteye sahiptir (Cunha ve diğ., 2022). Tüm bu sebeplerden dolayı La toksikolojik etkilere yol açabilmektedir. Ayrıca, La'nın enerji metabolizmasında bozukluklara sebep olduğu da belirtilmiştir (Zhao ve Li., 2018). Genel olarak ele alındığında sölomosit toplamı ve yaşayabilirliği üzerine tekli ve ikili uygulamalarda yer yer değişimler olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, özellikle üçlü stresör grubuna (OA-MP-La) maruziyet ile en fazla etkilenmenin olduğu gözlemlenmiştir. Bu da üç stresörün bir arada uygulamasının daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

4.7.SOLUNUM ORANI

Canlıların metabolik hızlarındaki değişimini belirlemek için solunum oranı ölçümü öncelikli tercih edilen yöntemlerden biridir (Weis, 2014). İncelenen çoğu toksik maddenin metabolik hızı ve dolayısıyla birçok organizmanın solunumunu azalttığı bulunmuştur (Weis, 2014). Önceki çalışmalar *Mytilus* cinsi midyelerin yüksek pCO_2 'ye maruz kaldıklarında (*M. galloprovincialis* 3820 μatm 'de, *Mytilus chilensis* 981 μatm 'de ve *Mytilus coruscus* 4485 μatm 'de) enerji tasarrufu sağlamak için metabolik depresyonu (solunum hızında azalma) tetikleyebildiğini göstermiştir (Fernández-Reiriz ve diğ., 2011; Navarro ve diğ., 2013; Wang ve diğ., 2015). Bunlara ek olarak,

denizkestanelerinin gıda sınırlaması (McClanahan ve Kurtis, 1991) ve yüksek tuzluluk (Sabourin ve Stickle, 1981; Russell, 2013; Honorato ve diğ., 2017) gibi stres uygulamalarında da solunum hızını azalttığı bildirilmiştir. Suckling ve Richard (2020) tarafından denizkestanesi *Arbacia punctulata* türü ile yapılan bir çalışmada çevresel şartlarda MP'nin tekli maruziyeti (9 µm, 25000 PS MP partikülü L⁻¹) sonucu solunum oranında anlamlı bir fark bulunmadığı rapor edilmiştir. Tongo ve Erhunmwunse (2022) yaptıkları çalışmada Afrika kedi balığını (*Claria gariepinus*) 4 gün boyunca 50-500 µm partikül boyutundaki düşük yoğunluklu PE-MP'nin dört farklı konsantrasyonuna (0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 g/L) maruz bırakmış ve bunun sonucunda solunum oranının arttığını bildirmiştir. Belivermiş ve diğ. (2023) 17 günlük OA (8.27 ve 7.63) ve hipoksi (7.65 ve 2.75 mg L⁻¹) maruziyeti altında çalıştıkları *M. galloprovincialis* solunum oranlarında önemli bir değişiklik gözlemlemediklerini ifade etmiştir.

Bu tez çalışmasında da uygulanan stresörlerin solunum oranı üzerine etkileri araştırılmıştır. Yukarıda bazı çalışmalarda belirtildiği üzere çeşitli stresörlere maruziyet sonucu canlılarda metabolik depresyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Ancak, bu tez çalışmasından elde edilen solunum oranları uygulanan stresör maruziyetinin canlıları düşük metabolik aktiviteye (metabolik depresyon) itecek düzeyde bir etki yaratmadığını göstermiştir (Şekil 4.7). Artan solunum oranının kirleticilerin detoksifikasyonu için önemli bir metabolik fonksiyon olduğu bilinmektedir (Neves ve diğ., 2020). Solunum oranındaki göreceli artış canlıların homeostaz sürdürmek için daha fazla enerji kullanmak zorunda kalması ve göreceli yüksek metabolik aktivitesi ile açıklanabilir (Gu ve diğ., 2020; Cunha ve diğ., 2022). Ancak burada solunum oranının çok yüksek düzeyde olmamasının nedeni muhtemelen stresörlerin oluşturduğu stres düzeyinin canlıların daha fazla enerji kazanmak adına solunumlarını önemli düzeyde arttırmaya gereksinim duymaması ile ilgilidir. Burada böylesi bir sonuçla karşılaşmanın altında yatan sebepler ise uygulanan stresörlerin seviyeleri ve maruziyet süresi ile ilgili olabilir. Yani uygulanan stresörlerin değerleri ve maruziyet süresi canlıların solunumunda anlamlı bir değişikliğin oluşumunu tetiklememiş gibi gözükmektedir. Bu tip bir stres toleransının gelişimi büyük olasılıkla *A. lixula* türünün adaptif plastisitesine ve/veya genetik adaptasyonuna bağlanabilir.

4.8.HİSTOPATOLOJİK ETKİLER

Denizel organizmalarda çeşitli stresörlerin uygulanıp etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda histopatolojik olarak farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bu bağlamda literatür taramasında

denizkestaneleri üzerine yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüştür. Uthicke ve diğ. (2014) *Echinometra sp.* denizkestanesi üzerine yaptıkları çalışmada 2100 yılı sıcaklık (+2 ila +3 °C) ve $p\text{CO}_2$ (860-940 μatm) maruziyetleri uygulanan gruplarda gonadlarda histolojik olarak bir değişim olduğu bildirilmiştir. Parolini ve diğ. (2020) tarafından besinle birlikte çevresel konsantrasyonlarda (8, 80 ve 800 parçacık g^{-1}) ve farklı boyutlarda (12,6-1065 μm) PET MP'ye maruz bırakılan *P. lividus* türü denizkestanesinde özofagusun histopatolojik incelemesinde önemli düzeyde bir enflamasyon (ödem, hipertrofi veya immün hücre birikimi) gözlemlenmediği rapor edilmiştir. Mollusklardan *M. edulis* üzerine yapılan bir çalışmada MP (>0-80 μm) maruziyeti ile sindirim hücrelerinde 6 saat sonrasında ciddi düzeyde enflamatuara sebep olan dikkate değer histolojik değişimler olduğu rapor edilmiştir (Von Moos ve diğ., 2012). *Mytilus spp.* türü midye kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise PS MP (2 ve 6 μm , 32 $\mu\text{g L}^{-1}$) ve florantenin (30 $\mu\text{g L}^{-1}$) 7 günlük maruziyeti sonucunda ciddi düzeyde histopatolojik değişimlere (lezyonlar/anormallikler) sebep olduğu bildirilmiştir. Wu ve Zhou (2013) tarafından *Oryzias latipes* balık türü üzerine 14 günlük maruziyetli çalışmada Ag-NP uygulaması sonucu balıkların solungaçlarında mukus üretimi, epitel hiperplazisi, lamellar füzyon ve şişmiş epitel gibi çok sayıda histolojik değişiklik belirtilmiştir. Artan mukus tabakası ve hücre hiperplazisinin solungaçlar tarafından NP alımı için bir engel oluşturabileceği önerilmiştir. *M. galloprovincialis* türü midye üzerine yapılan çalışmada lityumun (Li) farklı konsantrasyonlarına (2, 5, 13, 34, 89, 233 and 610 mg L^{-1}) 1, 7 ve 21 gün boyunca maruz bırakılmış ve uygulanan konsantrasyonlardaki Li'nin histopatolojik olarak etkileri incelenmiştir (Fraga ve diğ., 2022). Elde edilen sonuca göre Li'ye maruziyet sonucunda sindirim dokusunda atrofi gözlemlenmiş ve bu durumun artan konsantrasyonla ve zamanla daha belirginleştiği vurgulanmıştır. Doku lezyonları denizel canlıların davranışlarını, biyolojisini ve hayatta kalma şansını değiştirebilir (Mansouri ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalarda farklı şekillerde ve seviyelerde görülen etkilerin nedeni çalışılan türe, stresöre, uygulanan stresörlerin konsantrasyonlarına ve maruziyet periyodlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında uygulanan stresörlerin histolojik düzeyde etkilerinin belirlenmesi amacıyla sindirim sisteminin bir bölümü olan özofagus histopatolojik yönden incelenmiştir. Özofagusun iç yüzeyinin epitel tabakası ile örtülü olduğu ve epitel dokusunun altında bulunan bir bağ dokusu katmanı ile özofagus lümenine doğru uzayan kript adı verilen parmak şeklinde çıkıntılara sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Yapılan histolojik analizde özofagus kript boy uzunluğunda ve epitel kalınlığında değişiklikler dikkat çekmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

Buradaki değişiklikler incelendiğinde kontrole göre OA-La, MP, MP-La ve OA gruplarında kript boyunda kısıalma ve epitel tabakasında incelmelerin anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (şekil 4.11). Bütün bu sonuçlar kript yapısında bir atrofiye işaret etmektedir. Lewis (1964)  zofagusda büyük glandüler kriptler yer aldığını ve bunların mukus salgısı ile ilgili olduğunu belirtmiştir. Dolayısıyla bu yapılarıdaki değişimler söz konusu salgının sağlıklı yapılamayacağı ve bunun da beslenmede olumsuzluklara sebep olabileceği şeklinde düşünülebilir.

Mikroplastik ve La muhtemelen besine adsorbe olarak canlının sindirim sistemine giriş yapmıştır. Özofagus sindirim sisteminin ilk ve en dar bölgesi olması sebebiyle (Parolini ve diğ., 2020) MP ve MP-La gruplarındaki değişimler MP'lerin dokuda oluşturduğu fiziksel etkiden dolayı meydana gelmiş olabilir. Suckling (2021) tarafından *P. lividus*  zerine yapılan çalışmada bu organizmaların sindirim sistemi boyunca MP'lerin varlığının ve hareketinin dokunun yapısında fiziksel hasara neden olduğunu belirtmiştir. La canlılarda oksidatif stres, DNA oksidatif hasarı, genotoksisite, hücrelerin nekroz ve/veya apoptoz geçirmesini uyarmaktadır (Wu ve diğ., 2012; Paiva ve diğ., 2009). Burada yaptığımız çalışmada OA-La ve MP-La gruplarında gözlemlenen değişikliklerin La'nın bu yönlü etkilerinin payı olabileceği şeklinde düşünülmektedir. OA-La ve OA gruplarında ise düşük pH'ın organizmaların asit-baz dengesini değiştirmesinden dolayı etkileri ortaya çıkmış olabilir (Gattuso ve Hansson, 2011). Kript uzunluğu ve epitel kalınlığında gözlenen bu dejeneratif sürecin daha önceki çalışmalarda da rapor edildiği üzere farklı stresörlerin maruziyeti sonucunda otolitik süreçlere ve son olarak sindirim atrofisine yol açabilen lizozomların destabilizasyonundan kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir (Benito ve diğ., 2017; Brooks ve diğ., 2011; Mugica ve diğ., 2015). Çalışmada   l  stresör uygulamasında önemli bir değişim olmadığı gözlemlenmiş olup bunun olası nedeni doku düzeyinde    stresörün bir arada uygulamasının birbirlerinin etkilerini inhibe ettiği şeklinde düşünülmektedir (şekil 4.11).

4.9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER |

Bu  alışma kapsamınca model bir organizma olarak kullanılan *A. lixula* denizkestanesi MP ($26 \mu\text{g L}^{-1}$), La ($9 \mu\text{g L}^{-1}$) ve OA (pH 7,45) stresörlerine tekli, ikili ve üçlü olmak üzere 14 günlük maruziyet ile farklı deney senaryoları göz önünde bulundurulularak çalışılmıştır. Maruziyet sonucunda söz konusu stresörlerin farklı uygulamalarına ait etkilerin anlaşılmasında canlının

dört farklı sölom hücresi kantitatif olarak incelenmiş, tüm vücut solunum oranı ölçülmüş ve özofagus histopatolojik yönden incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre uygulanan stresörlerin maruziyetiyle birlikte toplam sölomosit sayısında önemli değişimler oluşmazken sölomosit yaşayabilirliğinde anlamlı düzeyde azalmalar belirlenmiştir. Sölomosit yaşayabilirliğindeki azalma özellikle üçlü stres uygulamasında gözlemlenmiştir. Bu da üç stresörün bir arada uygulanmasının etkisi sonucu canlının immün sisteminde önemli bir değişime sebep olduğunu göstermektedir. Stresörlerin solunum oranları üzerine anlamlı değişimler meydana getirmediği belirlenmiştir. Bu sonuç uygulanan stresör değerlerinin ve uygulanan maruziyet süresinin çalışılan türe ait organizmaların metabolizmasını değiştirecek düzeyde olmadığını göstermektedir. Yapılan histopatolojik analiz sonucunda ise özellikle tekli ve ikili stresör uygulamalarında genel olarak özofagus kript boy uzunluğunda kısalma ve epitel kalınlığında incelme olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu bulgular kript yapısında bir atrofi olduğuna dikkat çekmektedir. Genel olarak *A. lixula* türünün üç farklı stresöre maruziyeti sonucu herhangi bir ölüm durumu gözlemlenmemiş olup sadece subletal etkiler tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar çalışılan türün ele alınan üç stres faktörü bakımından geniş bir tolerans sınırına sahip olduğunu göstermektedir. Geniş tolerans durumu sığ sahil sularından toplanmış olan bu organizmaların farklı düzeylerde ve farklı çevresel değişkenlere maruziyetinden dolayı muhtemelen geliştirmiş olduğu lokal adaptatif esnekliği ile ilişkilidir.

Tüm bu sonuçlar denizel ekosistemlerin önemli stresörleri olan OA, MP ve La'nın tekli ve birleşik uygulamalarında canlıların immün sisteminde ve dokularında değişikliklere neden olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla *A. lixula* üzerine bu bağlamda yapılan çalışma ile literatüre ilk verileri sağlaması bakımından oldukça önem arz etmektedir. *Arbacia lixula* türü denizkestanesi gonadlarının insanlar tarafından düşük düzeyde olsa dahi besin kaynağı olarak tüketilmesinden dolayı türün ekonomik bir önemi söz konusudur. Dolayısıyla, çalışılan bu stresörlerin artan baskısı sebebiyle ilerleyen süreçlerde türün gelişimi olumsuz yönde etkilenebilir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar gelecek çalışmalar için söz konusu stresörlerin farklı değerlerde, daha uzun maruziyet süreli ve farklı türlerde yapılacak uygulamalara yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, yapılacak çalışmalarda söz konusu stresörlerin maruziyet sonrası etkilerinin anlaşılmasında moleküler tekniklere dayalı daha detaylı ve tamamlayıcı analizler ile birlikte diğer parametrelerin belirlenmesine

(mitokondri sayısı, hücre iskeleti yapısı vs.) ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, La dışında yenilikçi teknolojilerde yaygın kullanılan ve deşarjları artış eğiliminde olan diğer nadir toprak elementleri ve denizel çevrede yoğun bulunan fiber ve/veya fragment tipteki yıpranmış yapıya sahip MP'lerin daha ufak boyutları kullanılarak yapılacak çoklu strese yönelik çalışmalar gerekmektedir. Bu anlamda bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar yapılacak benzer çalışmalar için referans olması bakımından önem taşımaktadır.



5. KAYNAKLAR

- Agnetta, D., Bonaviri, C., Badalamenti, F., Scianna, C., Vizzini, S., Gianguzza, P., 2013, Functional traits of two co-occurring sea urchins across a barren/forest patch system, *Journal of Sea Research*, 76, 170–177.
- Akarsu, C., Kideys, A.E., Kumbur, H., 2017, Microplastic threat to aquatic ecosystems of the municipal wastewater treatment plant, *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 74, 73-78.
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., Keshavarzi, B., 2018, Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in fish muscles from north east of persian gulf, *Environmental Pollution*, 232, 154–163
- Alijagic, A., Gaglio, D., Napodano, E., Russo, R., Costa, C., Benada, O., Kofroňová, O., Pinsino, A., 2020, Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-relate gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity, *Journal of hazardous materials*, 384, 121389.
- American Chemistry, 2005, Council Plastics Industry Producer Statistics Group. Alıntılanma adresi: <https://www.americanchemistry.com/chemistry-in-america/chemistry-in-everyday-products/plastics/>.
- Andersson, A. J., Mackenzie, F. T., Bates, N. R., 2008, Life on the margin: implications of ocean acidification on Mg-calcite, high latitude and cold-water marine calcifiers, *Marine Ecology Progress Series*, 373, 265-273.
- Andrady, A., L., 2011, Microplastics in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Arizza, V., Giamita, F. T., Parrinello, D., Cammarata, M., Parrinello, N., 2007, Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(2), 389-394.
- Atakan, O., Yücer, M., Caner, C., 2021, Mikroplastikler ve Gıda Güvenliği, *Akademik Gıda*, 19(4), 433-441.
- Baechler, B.R., Stienbarger, C.D., Horn, D.A., Joseph, J., Taylor, A.R., Granek, E.F., Brander, S.M., 2020, Microplastic occurrence and effects in commercially harvested north american finfish and shellfish: Current knowledge and future directions. *Limnology and Oceanography Letters*, 5 (1), 113–136.
- Ballent, A., Purser, A., de Jesus Mendes, P., Pando, S., & Thomsen, L., 2012, Physical transport properties of marine microplastic pollution. *Biogeosciences Discussions*, 9(12), 18755– 18798.
- Bancroft, JD., 1990, *Theory and practice of histological techniques*, 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 43-67.

Barboza, L.G.A., Vethaak, A.D., Lavorante, B.R., Lundebye, A.K., Guilhermino, L., 2018, Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 336–348.

Barnes, R. D., 1987, *Invertebrate zoology*, 5th ed, Philadelphia.

Barua, A., Gautam, A., Mukherjee, S., Pal, K., Karmakar, P., Ray, M., Ray, S., 2021, Expanded polystyrene microplastic is more cytotoxic to seastar coelomocytes than its nonexpanded counterpart: A comparative analysis, *Journal of Hazardous Materials Letters*, 2, 100031.

Bau, M., Knappe, A., Dulski, P., 2006, Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania and in Lake Erie, northeastern United States, *Chemie erde-Geochemistry*, 662:143–152.

Bay-Schmith, E., Pearse, J. S., 1987, Effect of fixed daylengths on the photoperiodic regulation of gametogenesis in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 11(3), 287-294.

Belivermiş M., Kılıç Ö., Gezginci-Oktayoglu S., Sezer N., Demiralp S., Şahin B., Dupont S., 2023, Physiological and gene expression responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to low pH and low dissolved oxygen, *Marine Pollution Bulletin*, 187, 114602.

Benedetti-Cecchi, L., Bulleri, F., Cinelli, F., 1998, Density dependent foraging in two species of sea urchins in shallow subtidal reefs on the west coast of Italy (Western Mediterranean), *Marine Ecology Progress Series*, 171:203-211.

Benito, D., Niederwanger, M., Izagirre, U., Dallinger, R., Soto, M., 2017, Successive onset of molecular, cellular and tissue-specific responses in midgut gland of *Littorina littorea* exposed to sub-lethal cadmium concentrations, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1–26.

Bergami, E., Krupinski Emerenciano, A., González-Aravena, M., Cárdenas, C. A., Hernández, P., Silva, J. R. M. C., Corsi, I., 2019, Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*, *Polar Biology*, 42, 743-757.

Bertucci, J.I., Bellas, J., 2021, Combined effect of microplastics and global warming factors on early growth and development of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *The Science of the total environment*, 782, 146888.

Bianchi, V. A., Langeloh, H., Tillmann, U., Krock, B., Müller, A., Bickmeyer, U., Abele, D., 2019, Separate and combined effects of neurotoxic and lytic compounds of *Alexandrium* strains on *Mytilus edulis* feeding activity and hemocyte function, *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 414-422.

Bowmer, C.T., Kauffman-Van Bommel, J.A., Degeling, C., 1992, Semi-static acute toxicity test with metal-chloride salts and the marine copepod *Acartia tonsa*. *TNO report IMW 92/342 t/m 349*, In: Maas, J.L., Botterweg, J. (Eds.), 92, 342.

Branco, P. C., Borges, J. C. S., Santos, M. F., Junior, B. E. J., da Silva, J. R. M. C., 2013, The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*, *Marine environmental research*, 92, 95-101.

Bray, L., Pancucci-Papadopoulou, M. A., Hall-Spencer, J. M., 2014, Sea urchin response to rising $p\text{CO}_2$ shows ocean acidification may fundamentally alter the chemistry of marine skeletons, *Mediterranean Marine Science*, 510-519.

Bridge, J. S., & Bennett, S. J., 1992, A model for the entrainment and transport of sediment grains of mixed sizes, shapes, and densities. *Water Resources Research*, 28(2), 337– 363.

Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., Marigomez, ' I., 2011, Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*, *Marine Pollution Bulletin*, 62, 327–339.

Brothers, C.J, Harianto, J., McClintock, J.B., Byrne, M., 2016, Sea urchins in a high- CO_2 world: the influence of acclimation on the immune response to ocean warming and acidification, *Proceedings of the Royal Society B*, 283: 20161501.

Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K., 2001, Size dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175 (3), 191–199.

Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011, Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks, *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175–9179.

Browne, M.A., Dissayanake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008, Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis*, *Environmental Science and Technology*, 42, 5026– 5031.

Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., Cinelli, F., 1999, Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(1), 81-95.

Bustamante, P., Miramand, P., 2005, Subcellular and body distributions of 17 trace elements in the variegated scallop *Chlamys varia* from the French coast of the Bay of Biscay, *Science of The Total Environment*, 337 (1–3), 59–73.

Byrne, M., 1990, Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland, *Marine Biology*, 104, 275-289.

Calosi, P., Rastrick, S. P. S., Graziano, M., Thomas, S. C., Baggini, C., Carter, H. A., Spicer, J. I., 2013, Distribution of sea urchins living near shallow water CO_2 vents is dependent upon species acid–base and ion-regulatory abilities, *Marine pollution bulletin*, 73(2), 470-484.

Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R., Migaud, H., 2013, Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): Effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(2), 376-382.

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972, Polystyrene spherules in coastal waters, *Science*, 178, 749–750.

- Censi, P., Mazzola, S., Sprovieri, M., Bonanno, A., Patti, B., Punturo, R., Spoto, S.E., Saiano, F., Alonzo, G., 2004, Rare earth elements distribution in seawater and suspended particulate of the Central Mediterranean Sea, *Chemistry and Ecology*, 20(5), 323-343.
- Chelazzi, G., Serra, G., Bucciarelli, G., 1997, Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212(1), 1-7.
- Chen, M., Huo, C., Li, Y., & Wang, J., 2016, Selective adsorption and efficient removal of phosphate from aqueous medium with graphene–lanthanum composite, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1296-1302.
- Chia, F. S., Xing, J., 1996, Echinoderm coelomocytes, *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI*, 35, 231-254.
- Choi, J.S., Hong, S.H., Park, J.W., 2020, Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*, *Marine Environmental Research*, 153, 104838.
- Cigliano, M., Gambi, M. C., Rodolfo-Metalpa, R., Patti, F. P., Hall-Spencer, J.M., 2010, Effects of ocean acidification on invertebrate settlement at volcanic CO₂ vents, *Marine Biology*, 157, 2489-2502.
- Clark, J.R.M., Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Blackford, J., Lewis, C., Lenton, T.M., Galloway, T.S., 2016, Marine microplastic debris: a targeted plan for understanding and quantifying interactions with marine life, *Frontiers in Ecology and the Environment*, 14, 317-324.
- Cohen-Rengifo, M., Garcia, E., Hernandez, C. A., Hernandez, J. C., Clemente, S., 2013, Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Cahiers de Biologie Marine*, 54, 667-675.
- Cohen-Rengifo, M., Garcia, E., Hernandez, C. A., Hernandez, J. C., & Clemente, S., 2013, Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Cahiers de Biologie Marine*, 54, 667-675.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T. S., 2011, Microplastics as contaminants in the marine environment: a review, *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597.
- Craig, K., 2016, Immune system impacts of global climate change and ocean acidification conditions in two ecologically critical echinoderms: A laboratory study, *Explorations at UC Davis the undergraduate research journal*, Chapter 18, 1-21.
- Culling, C. F., 1974, *Handbook of histopathological and histochemical techniques*, 126, 73 London: Butterworths.
- Cunha, M., Louro, P., Silva, M., Soares, M.V.M. A., Pereira, E., Freitas, R., 2022, Biochemical alterations caused by lanthanum and gadolinium in *Mytilus galloprovincialis* after exposure and recovery periods, *Environmental Pollution*, 307.

- Das, T., Sharma, A., Talukder, G., 1988, Effects of lanthanum in cellular systems, *Biological Trace Elements Research*, 18 (1), 201–228.
- de Baar, H.J.W., German, C.R., Elderfield, H., van Gaans, P., 1988, Rare earth element distributions in anoxic waters of the Cariaco Trench, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, 1203e1219.
- De Lima, I.B., 2015, Rare earths industry and eco-management: a critical review of recycling and substitutes, *Rare Earths Industry: Technological, Economic, and Environmental Implications*, 293–304.
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., Corsi, I., 2014, Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*, *Environmental science & technology*, 48(20), 12302-12311.
- Delmas, P., Régis, M. B., 1985, Impact de la pollution domestique sur la biologie et la morphométrie de l'échinoïde *Paracentrotus lividus* (Lamarck) Données préliminaires, *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, Série 3, Sciences de la vie*, 300(4), 143-146.
- deSeymour, B.R., 1976, The Role of Fillers and Reinforcements in Plastics Technology, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 7, 49–79
- Devriese, L.I., Van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frere, L., Robbens, J. & Vethaak, A.D., 2015, Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area, *Marine Pollution Bulletin*, 98, 179–187.
- Dickson, A.G., 2007, *PICES Special Publication 3; IOCCP Report 8*, Guide to best practices for ocean CO₂ measurement, In: Sabine, C.L., Christian, J.R. (eds), North Pacific Marine Science Organization, Sidney, British Columbia, 191, ISBN: 1-897176-07-4.
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C., 2018, Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea, *Marine Pollution Bulletin*, 135, 30-40.
- Dupont S, 2023, Physiological and gene expression responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to low pH and low dissolved oxygen. *Marine Pollution Bulletin*, 187, 114602.
- Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M., Melzner, F., Thorndyke, M., 2013, Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Marine biology*, 160, 1835-1843.
- Dupont, S., Havenhand, J., Thorndyke, W., Peck, L., Thorndyke, M., 2008, CO₂-driven ocean acidification radically affect larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*, *Marine Ecology Progress Series*, 373: 285-294
- Dupont, S., Thorndyke, M., 2012, Relationship between CO₂-driven changes in extracellular acid–base balance and cellular immune response in two polar echinoderm species, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 424, 32-37.
- Duquette, A., McClintock, J.B., 2017, Effects of ocean acidification on the shells of four Mediterranean gastropod species near a CO₂ seep, *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 917-928.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2016, Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood, *EFSA Journal*, 14 (6), e04501.

Elderfield, H., Greaves, M.J., 1982, The rare earth elements in seawater, *Nature*, 296, 214e219.

Erez, J., Reynaud, S., Silverman, J., Schneider, K., Allemand, D., 2011, Coral calcification under ocean acidification and global change, *Coral reefs: an ecosystem in transition*, 151-176.

Ernst, G., Hähnel, W., Seibert, E., 1973, Aktuopaläontologie und Merkmalsvariabilität bei mediterranen Echiniden und Rückschlüsse auf die Ökologie und Artumgrenzung fossiler Formen, *Paläontologische Zeitschrift*, 47:188-216.

Fabricius, C., and Cundill, G., 2014, Learning in adaptive management: insights from published practice, *Ecology and Society*, 19(1), 29.

Fagiano, V., Compa, M., Alomar, C., Rios-Fuster, B., Morató, M., Capó, X., Deudero, S., 2023, Breaking the paradigm: Marine sediments hold two-fold microplastics than sea surface waters and are dominated by fibers. *Science of The Total Environment*, 858, 159722.

Falugi, C., Aluigi, M. G., Chiantore, M. C., Privitera, D., Ramoino, P., Gatti, M. A., Fabrizi, A., Pinsino, A., Matranga, V., 2012, Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin, *Marine Environmental Research*, 76, 114-121.

FAO, 2019, *The State of Food and Agriculture 2019*, Moving forward on food loss and waste reduction, Rome, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO, 2019, Deep-ocean climate change impacts on habitat, fish and fisheries, *Fisheries and Aquaculture Technical*, 638.

Fernandez, C., Boudouresque, C.F., 1997, Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment, *Marine Ecology Progress Series*, 152:145-154.

Fernández-Reiriz, M. J., Range, P., Álvarez-Salgado, X. A., Labarta, U., 2011, Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean, *Marine Ecology Progress Series*, 433, 97-105.

Figueiredo, C., Grilo, T. F., Lopes, A. R., Lopes, C., Brito, P., Caetano, M., Raimundo, J., 2022, Differential tissue accumulation in the invasive Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, under two environmentally relevant lanthanum concentrations, *Environmental Monitoring and Assessment*, 194, 1-11.

Figueiredo, C., Grilo, T.F., Lopes, C., Brito, P., Diniz, M., Caetano, M., Rosa, R., Raimundo, J., 2018, Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*anguilla anguilla*), *Chemosphere*, 206, 414–423.

Figueiredo, C., Grilo, T.F., Lopes, C., Brito, P., Diniz, M., Caetano, M., Rosa, R., Raimundo, J., 2018, Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*Anguilla anguilla*), *Chemosphere*, 206, 414–423.

Figueiredo, D.A.L., Branco, P. C., Dos Santos, D. A., Emerenciano, A. K., Iunes, R. S., Borges, J. C. S., da Silva, J. R. M. C., 2016, Ocean acidification affects parameters of immune response

and extracellular pH in tropical sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Echinometra luccunter*, *Aquatic Toxicology*, 180, 84-94.

Flammang, P., Michel, A., Van Cauwenberge, A., Alexandre, H., Jangoux, M., 1998, A study of the temporary adhesion of the podia in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata, Asteroidea) through their footprints, *Journal of Experimental Biology*, 201(16), 2383-2395.

Flammang, V., 1996, Two new points in the spectrum of the absolute Mahler measure of totally positive algebraic integers, *Mathematics of computation*, 65(213), 307-311.

Forte, M., Iachetta, G., Tussellino, M., Carotenuto, R., Prisco, M., De Falco, M., Laforgia, V., Valiante, S., 2016, Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells, *Toxicology in Vitro*, 31, 126–136.

Fraga, N., Benito, D., Briaudeau, T., Izagirre, U., Ruiz, P., 2022, Toxicopathic effects of lithium in mussels, *Chemosphere*, 307, 136022.

Frias, J.P.G.L., Nash, R., 2019, Microplastics: finding a consensus on the definition, *Marine Pollution Bulletin*, 138, 145-147.

Garilli, V., Rodolfo-Metalpa, R., Scuderi, D., Brusca, L., Parrinello, D., Rastrick, S.P.S., Twitchett, R.J., Hall-Spencer, J.M., Milazzo, M., 2015, Physiological advantages of dwarfing in surviving extinctions in high-CO₂ oceans, *Nature Climate Change*, 5, 678–682.

Gattuso, J. P., Frankignoulle, M., Bourge, I., Romaine, S., Buddemeier, R. W., 1998, Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification, *Global and Planetary Change*, 18(1-2), 37-46.

Gattuso, J. P., Hansson, L., 2011, *Ocean acidification*, In: Gattuso, J. P., Hansson, L. (Eds.), Chapter 1, Oxford university press, New York, ISBN: 978-0-19-959108-4, 1-5.

GESAMP, 2016, Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: A Global Assessment. In: Kershaw, P.J., Rochman, C.M. (Eds.), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on The Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) Reports and Studies, *GESAMP*, 93, 220. ISSN: 1020-4873.

Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K.L., 2017, Production use and fate of all plastics ever made, *Science Advances*, 3(7).

Gianguzza, P., & Bonaviri, C., 2013, *Arbacia, Sea Urchins: Biology and Ecology*, 275–283.

Gianguzza, P., Agnetta, D., Bonaviri, C., Di Trapani, F., Visconti, G., Gianguzza, F., Riggio, S., 2011, The rise of thermophilic sea urchins and the expansion of barren grounds in the Mediterranean Sea, *Chemistry and Ecology*, 27(2), 129–134.

Gianguzza, P., Bonaviri, C., Milisenda, G., Barcellona, A., Agnetta, D., Fernández, T. V., Badalamenti, F., 2010, Macroalgal assemblage type affects predation pressure on sea urchins by altering adhesion strength, *Marine Environmental Research*, 70(1), 82-86.

- Gibbs, M.M., Hickey, C.W., Özkundakci, D., 2011, Sustainability assessment and comparison of efficacy of four P-inactivation agents for managing internal phosphorus loads in lakes: sediment incubations, *Hydrobiologia*, 658, 253–275.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A., 2005, CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution, *Annual Review of Plant Biology*, 56, 99-131.
- Glaser, J., A., 2019, *Biological degradation of polymers in the environment*, Chapter 1, 13, London, UK: IntechOpen.
- Golconda, P., Buckley, K. M., Reynolds, C. R., Romanello, J. P., Smith, L. C., 2019, The axial organ and the pharynx are sites of hematopoiesis in the sea urchin, *Frontiers in Immunology*, 10, 870.
- Gu, H., Wei, S., Hu, M., Wei, H., Wang, X., Shang, Y., Li'ang, L., Shi, H., Wang, Y., 2020, Microplastics aggravate the adverse effects of BDE-47 on physiological and defense performance in mussels, *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122909.
- Gu, Y., Zhang, X., Liu, Z., Ren, F., 2019, Wifi-based real-time breathing and heart rate monitoring during sleep, In *2019 IEEE Global Communications Conference (GLOBECOM)*, 1-6.
- Guidetti, P., 2004, Consumers of sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, in shallow Mediterranean rocky reefs, *Helgoland Marine Research*, 58(2), 110-116.
- Guidetti, P., Mori, M., 2005, Morpho-functional defences of Mediterranean sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, against fish predators, *Marine Biology*, 147, 797-802.
- Guinotte, J.M., and Fabry, V.J., 2008, Ocean Acidification and Its Potential Effects on Marine Ecosystems, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1134, 320-342.
- Gündoğdu, S., 2018, Contamination of table salts from Turkey with microplastics, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35:5, 1006- 1014.
- Hahladakis, N.J., Costas, A.V., Weber, R., Iacovidou, E., Purnell, P., 2018, An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199.
- Hale, S.E., Martin, T.J., Goss, K.-U., Arp, H.P.H., Werner, D., 2010, Partitioning of organochlorine pesticides from water to polyethylene passive samplers, *Environmental Pollution*, 158, 2511–2518.
- Hall-Spencer, J. M., Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ransome, E., Fine, M., Turner, S. M., Rowley, S.J., Tedesco, D., Buia, M. C., 2008, Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification, *Nature*, 454(7200), 96-99.
- Harvey, H. W., 1956, The Chemistry and Fertility of Sea Waters, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 35(1), 289-289.

Hennicke, A., Macrina, L., M. McKay, A., Miliou, A., 2021, Assessment of microplastic accumulation in wild *Paracentrotus lividus*, a commercially important sea urchin species, in the Eastern Aegean Sea, Greece, *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101855.

Hereu, B., Linares, C., Sala, E., Garrabou, J., Garcia-Rubies, A., Diaz, D., Zabala, M., 2012, Multiple Processes Regulate Long-Term Population Dynamics of Sea Urchins on Mediterranean Rocky Reefs, *PLoS ONE*, 7(5), e36901.

Hernroth, B., Baden, S., Thorndyke, M., Dupont, S., 2011, Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification, *Aquatic Toxicology*, 103, 222–224.

Herrmann, H., Nolde, J., Berger, S., Heise, S., 2016, Aquatic ecotoxicity of lanthanum—A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria, *Ecotoxicology and environmental safety*, 124, 213-238.

Hidalgo Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012, Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification, *Environmental Science and Technology*, 46(6), 3060-75.

Hill, S.K., Lawrence, J. M., 2003, Habitats and Characteristics of the Sea Urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata* (Echinodermata) on the Florida Gulf-Coast Shelf, *Marine Ecology*, 24(1), 15–30.

Hillier, B. J., Vacquier, V. D., 2007, Structural features and functional domains of amassin-1, a cell-binding olfactomedin protein, *Biochemistry and Cell Biology*, 85(5), 552-562.

Hissler, C., Stille, P., Guignard, C., Iffly, J.F., Pfister, L., 2014, Rare earth elements as hydrological tracers of anthropogenic and critical zone contributions: a case study at the Alzette River Basin Scale, *Procedia Earth Planetary Science*, 10, 349–352.

Holden, N.E., Coplen, T., 2004, "Elementlerin Periyodik Tablosu", *Kimya Uluslararası, IUPAC*, 26 (1): 8.

Holtmann, W. C., Stumpp, M., Gutowska, M. A., Syré, S., Himmerkus, N., Melzner, F., Bleich, M., 2013, Maintenance of coelomic fluid pH in sea urchins exposed to elevated CO₂: the role of body cavity epithelia and stereom dissolution, *Marine Biology*, 160, 2631-2645.

Honorato, T. B. M., Boni, R., da Silva, P. M., Marques-Santos, L. F., 2017, Effects of salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 22-31.

Horton, A. A., Svendsen, C., Williams, R. J., Spurgeon, D. J., Lahive, E., 2017, Large microplastic particles in sediments of tributaries of the river Thames, UK—Abundance, sources and methods for effective quantification, *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), 218–226.

Hou, X., Yan, X., 1998, Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae, *Science Total Environment*, 222 (3), 141–156.

Inoue, S., Kayanne, H., Yamamoto, S., Kurihara, H., 2013, Spatial community shift from hard to soft corals in acidified water, *Nature Climate Change*, 3, 683–687.

- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Lee, K.S., Kikkawa, T., 2005, Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world, *Journal of Geophysical Research*, 110.
- Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K-S., Kita, J., 2004. Effects of CO₂ on marine fish: larvae and adults, *Journal of Oceanography*, 60: 731–741.
- Ishimatsu, A., Kita, J., 1999, Effects of environmental hypercapnia on fish, *Japanese Journal of Ichthyology*, 46: 1–13.
- Ito, T., Matsutani, T., Mori, K., Nomura, T., 1992, Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*, *Developmental & Comparative Immunology*, 16(4), 287-294.
- James, P., Siikavuopio, S. I., & Johansson, G. S., 2018, A Guide to the Sea Urchin Reproductive Cycle and Staging Sea Urchin Gonad Samples, Muninbakken 9-13, Breivika, ISBN 978-82-8296-546-0.
- Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, J.S., 2016, Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*), *Environmental Science & Technology*, 50 (16), 8849–8857.
- Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Gattuso, J. P., Langdon, C., & Opdyke, B. N., 1999, Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs, *Science*, 284(5411), 118-120.
- Kleypas, J., Langdon, C., 2002, Response of coral reef builders to changes in ocean chemistry, *Global Biogeochemical Cycles*, 14, 639-654.
- Kleypas, J.A., Yates, K. K., 2009, Coral reefs and ocean acidification, *Oceanography*, 22(4), 108-117.
- Kosuth, M., Mason, S.A., Wattenberg, E.V., 2018, Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt, *PLoS One*, 13 (4), 0194970.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., Gattuso, J. P., 2013, Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global change biology*, 19(6), 1884-1896.
- Kuffner, I. B., Andersson, A. J., Jokiel, P. L., Rodgers, K. U. S., Mackenzie, F. T., 2008, Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification, *Nature geoscience*, 1(2), 114-117.
- Kulaksiz, S., Bau, M., 2011, Rare earth elements in the Rhine River, Germany: first case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere, *Environment International*, 37, 973–979.
- Kurihara, H., Shirayama, Y., 2004, Effects of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development, *Marine Ecology Progress Series*, 274: 161-169.

- Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., & Caruso, A., 2016, Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environmental Pollution*, 215, 331–339.
- Langdon, C., Atkinson, M. J., 2005, Effect of elevated $p\text{CO}_2$ on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment, *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 110(C9).
- Langdon, C., Broecker, W. S., Hammond, D. E., Glenn, E., Fitzsimmons, K., Nelson, S. G., Peng, T.-H., Hajdas, I., Bonani, G., 2003, Effect of elevated CO_2 on the community metabolism of an experimental coral reef, *Global Biogeochemical Cycles*, 17(1).
- Langdon, C., Takahashi, T., Sweeney, C., Chipman, D., Goddard, J., Marubini, F., Aceves, H., Bernett, H., Atkinson, M. J., 2000, Effect of calcium carbonate saturation state on the calcification rate of an experimental coral reef, *Global Biogeochemical Cycles*, 14(2), 639-654.
- Law, K. L., Thompson, R.C., 2014, Microplastics in the seas, *Science*, 345, 144-145.
- Li, C.R., Zhuang, Z.Y., Huang, F., Wu, Z.C., Hong, Y.P., Lin, Z., 2013, Recycling rare earth elements from industrial wastewater with flowerlike nano-mg $(\text{OH})_2$, *CS Applied Materials & Interfaces*, 5, 9719–9725.
- Li, X., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, Y., 2013, A human health risk assessment of rare earth elements in soil and vegetables from a mining area in Fujian Province, Southeast China, *Chemosphere*, 93, 1240–1246.
- Liebmann, B., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Reiberger, T., & Schwabl, P., 2018, Assessment of microplastic concentrations in human stool: Final results of a prospective study, In *Conference on nano and microplastics in technical and freshwater systems*, 28-31.
- Liu, Y., Huang, J., Jin, J., Lou, S., Shen, C., Zang, Wang, H., Wang, L., 2020, The Classification of micro-plastics and biodegradation of plastics / micro-plastics. *Academic Journal of Engineering and Technology Science*, 3(6), 181-90.
- Madshus, I.H., 1988, Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells, *Biochemical journal*, 250(1), 1.
- Marques-Santos, L. F., Grassi, G., Bergami, E., Faleri, C., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., Canesi, L., Corsi, I., 2018, Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype, *Nanotoxicology*, 12(8), 847-867.
- Marques-Santos, L. F., Grassi, G., Bergami, E., Faleri, C., Balbi, T., Salis, A., Damonte, G., Canesi, L., Corsi, I., 2018, Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype, *Nanotoxicology*, 12, 847–867.
- Martino, C., Byrne, M., Roccheri, M. C., Chiarelli, R., 2021, Interactive effects of increased temperature and gadolinium pollution in *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos: a climate change perspective, *Aquatic Toxicology*, 232, 105750.

- Matranga, V., Pinsino, A., Celi, M., Natoli, A., Bonaventura, R., Schröder, H. C., & Müller, W. E.G., 2005, Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells, *Echinodermata*, 85-110.
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., Müller, W. E., 2000, Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes, *Cell stress & chaperones*, 5(2), 113-120.
- Matranga, V., Yokota, Y., 2008, Responses of marine organisms to physical and chemical impacts, *Cell Biology and Toxicology*, 24(6):471-474.
- McClanahan, T. R., and S. H. Safir, 1990, Causes and consequences of sea urchin abundance and diversity in Kenyan coral reef lagoons, *Oecologia*, 362-370.
- McClanahan, T. R., Kurtis, J. D., 1991, Population regulation of the rock-boring sea urchin *Echinometra mathaei* (de Blainville), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 147(1), 121-146.
- McClintock, J. B., Amsler, M. O., Angus, R. A., Challener, R. C., Schram, J. B., Amsler, C. D., Mah, C.L., Cuce, J., Baker, B. J., 2011, The Mg-calcite composition of Antarctic echinoderms: important implications for predicting the impacts of ocean acidification, *The Journal of Geology*, 119(5), 457-466.
- McDonald, M. R., McClintock, J. B., Amsler, C. D., Rittschof, D., Angus, R. A., Orihuela, B., Lutostanski, K., 2009, Effects of ocean acidification over the life history of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, *Marine Ecology Progress Series*, 385, 179-187.
- Melzner, F., Gutowska, M.A., Langenbuch, M., Dupont, S., Lucassen, M., Thorndyke, M.C., Bleich, M., Pörtner, H.O., 2009, Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny?, *Biogeosciences*, 6: 2313-2331.
- Merschel, G., Bau, M., 2015, Rare earth elements in the aragonitic shell of freshwater mussel *Corbicula fluminea* and the bioavailability of anthropogenic lanthanum, samarium and gadolinium in river water, *Science of the Total Environment*, 533, 91-101.
- Migaszewski, Z.M., Gałuszka, A., 2015, The characteristics, occurrence, and geochemical behavior of rare earth elements in the environment: a review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 429-471.
- Migliaccio, O., Pinsino, A., Maffioli, E., Smith, A. M., Agnisola, C., Matranga, V., Nonnis, S., Tedeschi, G., Byrne, M., Gambi, M.C., Palumbo, A., 2019, Living in future ocean acidification, physiological adaptive responses of the immune system of sea urchins resident at a CO₂ vent system, *Science of the Total Environment*, 672, 938-950.
- Migliaccio, O., Pinsino, A., Maffioli, E., Smith, A. M., Agnisola, C., Matranga, V., Nonnis, S., Gabriella, T., Bryne, M., Gambi, M.C., Palumbo, A., 2019, Living in future ocean acidification, physiological adaptive responses of the immune system of sea urchins resident at a CO₂ vent system, *Science of The Total Environment*, 672, 938-950.

- Miles, H., Widdicombe, S., Spicer, J. I., Hall-Spencer, J., 2007, Effects of anthropogenic seawater acidification on acid–base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*, *Marine pollution bulletin*, 54(1), 89-96.
- MillerO, F. J., Woosley, R., DiTrollo, B., Waters, J., 2009, Effect of ocean acidification on the speciation of metals in seawater, *Oceanography*, 22(4), 72-85.
- Mizraji, R., Ahrendt, C., Perez-Venegas, D., Vargas, J., Pulgar, J., Aldana, M., Galbán-Malagón, C., 2017, Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut?. *Marine pollution bulletin*, 116(1-2), 498-500.
- Moermond, C.T., Tijink, J., van Wezel, A.P., Koelmans, A.A., 2001, Distribution, speciation, and bioavailability of lanthanides in the Rhine-Meuse estuary, The Netherlands, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(9), 1916-1926.
- Moreiraa, A., Henriques, B., Leitea, C., Libralatoc, G., Pereirab, E., Freitas, R., 2020, Potential impacts of lanthanum and yttrium through embryotoxicity assays with *Crassostrea gigas*, *Ecological Indicators*, 108.
- Morse, J. W., Andersson, A. J., Mackenzie, F.T., 2006, Initial response of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric $p\text{CO}_2$ and “ocean acidification”: role of high Mg-calcites. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 70: 5814–5830.
- Morse, J.W., Andersson, A.J., Mackenzie, F.T., 2006, Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric $p\text{CO}_2$ and “ocean acidification”: Role of high Mg-calcites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 5814-5830.
- Mortensen, T. H., 1943, *A Monograph of the Echinoidea*, Camarodonta. I. *Orthopsidae, Glyphocyphidae, Temnopleuridae and Toxopneustidae*-Atlas, Chapter 3, No.2, Copenhagen CA Reitzel.
- Muffett, C., Feit, S., 2019, *Plastic & climate: the hidden costs of a plastic planet*, CIEL 2019 report, In: Kistler, A., Muffett, C. (ed), Chapter 3, 11th Hour Project, San Diego, 17-18.
- Múgica, M., Sokolova, I.M., Izagirre, U., Marigomez, I., 2015, Season-dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels, *Marine Environment Research*, 103, 1–10.
- Murano, C., Agnisola, C., Caramiello, D., Castellano, I., Casotti, R., Corsi, I., & Palumbo, A., 2020, How sea urchins face microplastics: uptake, tissue distribution and immune system response, *Environmental Pollution*, 264, 114685.
- Murano, C., Agnisola, C., Caramiello, D., Castellano, I., Casotti, R., Corsi, I., Palumbo, A., 2020, How sea urchins face microplastics: uptake, tissue distribution and immune system response, *Environmental Pollution*, 264, 114685.
- Murano, C., Bergami, E., Liberatori, G., Palumbo, A., Corsi, I., 2021, Interplay between nanoplastics and the immune system of the mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Frontiers in Marine Science*, 8, 647394.

- Murano, C., Nonnis, S., Scalvini, F. G., Maffioli, E., Corsi, I., Tedeschi, G., Palumbo, A., 2023, Response to microplastic exposure: An exploration into the sea urchin immune cell proteome, *Environmental Pollution*, 121062.
- Murano, C., Nonnis, S., Scalvini, F. G., Maffioli, E., Corsi, I., Tedeschi, G., Palumbo, A., 2023, Response to microplastic exposure: An exploration into the sea urchin immune cell proteome, *Environmental Pollution*, 121062.
- Murphy, F., Russell, M., Ewins, C. & Quinn, B., 2017, The uptake of macroplastic & microplastic by demersal & pelagic fish in the Northeast Atlantic around Scotland, *Marine Pollution Bulletin*, 122(1–2), 353-359.
- Myszograj, M., 2020, Microplastic in food and drinking water-environmental monitoring data, *Civil and Environmental Engineering Reports*, 30(4), 201-9.
- Navarro, J. M., Torres, R., Acuña, K., Duarte, C., Manriquez, P. H., Lardies, M., Lagos, N.A., Vargas, C., Aguilera, V., 2013, Impact of medium-term exposure to elevated $p\text{CO}_2$ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*, *Chemosphere*, 90(3), 1242-1248.
- Neves, R. A., Nascimento, S. M., Santos, L. N., 2020, Sublethal fish responses to short-term food chain transfer of DSP toxins: The role of somatic condition, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 524, 151317.
- Ng, T., Smith, D.S., Straus, A., McGeer, J.C., 2011, Review of Aquatic Effects of Lanthanides and Other Uncommon Elements, *Final Project Report*, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Canada.
- Olbrich, C., Schöler, N., Tabatt, K., Kayser, O., Müller, R.H., 2004, Cytotoxicity studies of Dynasan 114 solid lipid nanoparticles (SLN) on RAW 264.7 macrophages—impact of phagocytosis on viability and cytokine production, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(7), 883-891.
- Olías, M., Cerón, J.C., Fernández, I., De La Rosa, J., 2005, Distribution of rare earth elements in an alluvial aquifer affected by acid mine drainage: the Guadiamar aquifer (SW Spain), *Environmental Pollution*, 135, 53–64.
- Oral, R., Bustamante, P., Warnau, M., D'Ambra, A., Guida, M., Pagano, G., 2010, Cytogenetic and developmental toxicity of cerium and lanthanum to sea urchin embryos, *Chemosphere*, 81 (2), 194–198.
- Oran, S., Babacan, M., 2014, Plastik geri dönüşümünde son teknolojiler, Yalova Üniversitesi, Polimer Mühendisliği Bitirme Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Paiva, A. V., de Oliveira, M. S., Yunes, S. N., de Oliveira, L. G., Cabral-Neto, J. B., de Almeida, C. E. B., 2009, Effects of lanthanum on human lymphocytes viability and DNA strand break, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82, 423-427.
- Parolini, M., Ferrario, C., De Felice, B., Gazzotti, S., Bonasoro, F., Carnevali, M. D. C., Ortenzi, M.A., Sugni, M., 2020, Interactive effects between sinking polyethylene terephthalate (PET) microplastics deriving from water bottles and a benthic grazer, *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122848.

- Pearse, J. S., Hines, A.H., 1987, Long-term population dynamics of sea urchins in a central California kelp forest: Rare recruitment and rapid decline, *Marine ecology progress series*, 39(3), 275-283.
- Pearse, J. S., Pearse, V. B., & Davis, K. K., 1986, Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, *Journal of Experimental Zoology*, 237(1), 107-118.
- Pedrotti, M. L., Fenaux, L., 1992, Dispersal of echinoderm larvae in a geographical area marked by upwelling (Ligurian Sea, NW Mediterranean), *Marine Ecology Progress Series*, 86(3), 217-227.
- Pernice, M., Boucher, J., Boucher-Rodoni, R., Joannot, P., Bustamante, P., 2009, Comparative bioaccumulation of trace elements between *Nautilus pompilius* and *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda: *Nautiloidea*) from Vanuatu and New Caledonia, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72 (2), 365–371.
- Phillips, N. E., Shima, J. S, 2006, Differential effects of suspended sediments on larval survival and settlement of New Zealand urchins *Evechinus chloroticus* and abalone *Haliotis iris*, *Marine Ecology Progress Series*, 314, 149-158.
- Pinsino, A., & Matranga, V., 2015, Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress, *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 198-205.
- Pinsino, A., Matranga, V., 2015, Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress, *Developmental & Comparative Immunology*, 49(1), 198-205.
- Pinsino, A., Russo, R., Bonaventura, R., Brunelli, A., Marcomini, A., and Matranga, V., 2015, Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway, *Scientific Reports*, 5:14492.
- Plastics Europe, 2016, *Plastics—the Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data*.
- Plastics Europe, 2022, *European plastics data*, Plastics—the Facts 2022, 26-28.
- Pourret, O., Davranche, M., Gruau, G., Dia, A., 2007, Organic complexation of rare earth elements in natural waters: evaluating model calculations from ultrafiltration data, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71 (11), 2718–2735.
- Prata, J. C., 2018, Airborne microplastics: consequences to human health?, *Environmental pollution*, 234, 115-126.
- Qiang, T., Xiao-Rong, W., Li-Qing, T., & Le-Mei, D, 1994, Bioaccumulation of the rare earth elements lanthanum, gadolinium and yttrium in carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental pollution*, 85(3), 345-350.
- Régis, M. B., 1986, Microstructure adaptative des radioles de *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: *Echinoidea*) en milieu eutrophisé par des eaux usées, *Marine Biology*, 90, 271-277.

- Reinfelder, J. R., 2011, Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton, *Annual review of marine science*, 3, 291-315.
- Renzi, M., Guerranti, C., Blašković, A., 2018, Microplastic contents from maricultured and natural mussels, *Marine Pollution Bulletin*, 131, 248–251.
- Rochman, C.M., Browne, M.A., Halpern, B.S., Hentschel, B.T., Hoh, E., Karapanagioti, H.K, Rios-Mendoza, L.M., Takada, H., Teh, S., Thompson R.C., 2013a, Policy: Classify plastic waste as hazardous, *Nature*, 494, 169-171.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T. & Teh, S.J., 2013b, Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress, *Scientific Repots*, 3, 3263.
- Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014, Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493, 656-661.
- Rodolfo-Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F. P., Hall-Spencer, J. M., 2011, Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming, *Nature Climate Change*, 1(6), 308-312.
- Romeo, T., D'Alessandro, M., Esposito, V., Scotti, G., Berto, D., Formalewicz, M., Noventa, S., Giuliani, S., Macchia, S., Sartori, D., Mazzola, A., Andaloro, F., Giacobbe, S., Deidun, A., Renzi, M., 2015, Environmental quality assessment of Grand Harbour (Valletta, Maltese Islands): a case study of a busy harbour in the Central Mediterranean Sea, *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-21.
- Rummel, C.D., Löder, M.G.J., Fricke, N.F., Lang, T., Griebeler, E.M., Janke, M., Gerdts, G. 2016, Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the north Sea and baltic sea, *Marine Pollution Bulletin*, 102, 134- 141.
- Russell, M. P., 2013, Echinoderm responses to variation in salinity, In *Advances in marine biology*, 66, 171-212.
- Russo, R., Chiamonte, M., Matranga, V., Arizza, V., 2015, A member of the Tlr family is involved in dsRNA innate immune response in *Paracentrotus lividus* sea urchin, *Developmental & Comparative Immunology*, 51(2), 271-277.
- Sabourin, T. D., Stickle, W. B., 1981, Effects of salinity on respiration and nitrogen excretion in two species of echinoderms, *Marine Biology*, 65, 91-99.
- Safaeian, S., Falahatkar, S., Tourian, M. J., 2023, Satellite observation of atmospheric CO₂ and water storage change over Iran, *Scientific Reports*, 13(1), 3036.
- Sala, E., Ribes, M., Hereu, B., Zabala, M., Alvà, V., Coma, R., Garrabou, J., 1998, Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area, *Marine Ecology Progress Series*, 168:135-145.

Schillaci, D., Arizza, V., Parrinello, N., Di Stefano, V., Fanara, S., Muccilli, V., Cunsolo, V., Haagenzen, J.J.A., Molin, S., 2010, Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 17-24.

Serebrisky, D., 2022, CO₂ reached 420 ppm in the atmosphere, <https://serebrisky.com/2022/05/05/co2-reached-420-ppm-in-the-atmosphere/>, [Ziyaret Tarihi: 6 Haziran 2023].

Setälä, H., Viippola, V., Rantalainen, A. L., Pennanen, A., & Yli-Pelkonen, V., 2013, Does urban vegetation mitigate air pollution in northern conditions?, *Environmental pollution*, 183, 104-112.

Sezer, N., Kılıç, Ö., Metian, M., Belivermiş, M., 2018, Effects of ocean acidification on ¹⁰⁹Cd, ⁵⁷Co, and ¹³⁴Cs bioconcentration by the European oyster (*Ostrea edulis*): Biokinetics and tissue-to-subcellular partitioning, *Journal of Environmental Radioactivity*, 192, 376-384.

Sharma, S., & Chatterjee, S., 2017, Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review, *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21530-21547.

Sholkovitz, E.R., 1992, Chemical evolution of rare earth elements: fractionation between colloidal and solution phases of filtered river water, *Earth and Planetary Science Letters*, 114(1), 77-84.

Shpigel, M., McBride, S. C., Marciano, S., Lupatsch, I., 2004, The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Aquaculture*, 232(1-4), 343-355.

Siikavuopio, S. I., Mortensen, A., Dale, T., Foss, A., 2007, Effects of carbon dioxide exposure on feed intake and gonad growth in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Aquaculture*, 266(1-4), 97-101.

Smith, L. C., 2010, Diversification of innate immune genes: lessons from the purple sea urchin, *Disease Models & Mechanisms*, 3(5-6), 274-279.

Smith, L. C., 2012, Innate immune complexity in the purple sea urchin: diversity of the Sp185/333 system, *Frontiers in Immunology*, 3, 70.

Smith, L. C., Britten, R. J., Davidson, E. H., 1995, Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system, *Developmental & Comparative Immunology*, 19(3), 217-224.

Smith, L.C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D. P., Nair, S. V., Buckley, K.M., Majeske, A.J., 2006, The sea urchin immune system, *Invertebrate Survival Journal*, 3:25-39.

Smith, M., Love, D.C., Rochman, C.M., Neff, R.A., 2018. Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environ. Health Rep.* 5 (3), 375–386

Sneller, F.E.C., Kalf, D.F., Weltje, L., van Wezel, A.P., 2000, Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for Rare Earth Elements (REEs), *RIVM Report*, 601501011, 60.

- Stumpp, M., Hu, M. Y., Melzner, F., Gutowska, M. A., Dorey, N., Himmerkus, N., Holtmann, W.C., Dupont, S., Thorndyke, M.C., Bleich, M., 2012, Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), 18192-18197.
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M. C., Dupont, S. T., 2011, CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(3), 331-340.
- Suckling, C. C., 2021, Responses to environmentally relevant microplastics are species-specific with dietary habit as a potential sensitivity indicator, *Science of the Total Environment*, 751, 142341.
- Suckling, C. C., Richard, J., 2020, Short-term exposure to storm-like scenario microplastic and salinity conditions does not impact adult sea urchin (*Arbacia punctulata*) physiology. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 78, 495-500.
- Sun, S., Shi, W., Tang, Y., Han, Y., Du, X., Zhou, W., Hu, Y., Zhou, C., Liu, G., 2020, Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms, *Science of The Total Environment*, 728, 138852.
- Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., Stagnitti, F., 2010, Biological toxicity of lanthanide elements on algae, *Chemosphere*, 80 (9), 1031–1035.
- Talsness, C.E., Andrade, A.J., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., Vom Saal, F.S., 2009, Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health, *Biological Sciences*, 364, 2079–2096.
- Tan, Q., Li, J., Zeng, X., 2015, Rare earth elements recovery from waste fluorescent lamps: a review, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*.
- Tang, J., Johannesson, K.H., 2003, Speciation of rare earth elements in natural terrestrial waters: assessing the role of dissolved organic matter from the modeling approach, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67 (13), 2321–2339.
- Tegner, M., Dayton, P., 1977, Sea urchin recruitment patterns and implications of commercial fishing, *Science*, 196(4287), 324–326.
- Tepe, N., Romero, M., Bau, M., 2014, High-technology metals as emerging contaminants: strong increase of anthropogenic gadolinium levels in tap water of Berlin, Germany, from 2009 to 2012, *Applied Geochemistry*, 45, 191–197.
- Tommasi, L.R., 1964, Observações sobre Equinóides do Brasil, *Revista Brasileira Biologia*, 24:83–93.
- Tongo, I., Erhunmwunse, N. O., 2022, Effects of ingestion of polyethylene microplastics on survival rate, opercular respiration rate and swimming performance of African catfish (*Clarias gariepinus*), *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127237.

Tortonese, E., 1965, Biologie comparée de trois espèces méditerranéennes de Diplodus (*Pisces Sparidae*), *Rapp. PV Comm. Int. Explor. Sc. Me. Medit*, 18, 189-192.

Trifuoggi, M., Pagano, G., Guida, M., Palumbo, A., Siciliano, A., Gravina, M., Oral, R., 2017, Comparative toxicity of seven rare earth elements in sea urchin early life stages, *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 20803-20810.

Trivedi, B., Danforth, W.H., 1966, Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase, *Journal of Biological Chemistry*, 241(17), 4110-4114.

Tuya, F., Cisneros-Aguirre, J., Ortega-Borges, L., Haroun, R. J., 2007, Bathymetric segregation of sea urchins on reefs of the Canarian Archipelago: role of flow-induced forces, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(3-4), 481-488.

Türkoğlu, M., Ünsal, M., Mavili, S., Sever, T. M., Yenici, E., Kaya, S., Çoker, T., Çanakkale Boğazı ve Saros Körfezi (Kuzey Ege Denizi) Alt ve Üst Besin Tabakalarının Dinamiği, 2004.
Uthicke, S., Liddy, M., Nguyen, H. D., Byrne, M., 2014, Interactive effects of near-future temperature increase and ocean acidification on physiology and gonad development in adult Pacific sea urchin, *Echinometra sp. A.*, *Coral Reefs*, 33, 831-845.

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., Janssen, C. R., 2015, Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental pollution*, 199, 10-17.

Viršek, M. K., Lovšin, M. N., Koren, Š., Kržan, A., Peterlin, M., 2017, Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 301-309.

Visconti, G., Gianguzza, F., Butera, E., Costa, V., Vizzini, S., Byrne, M., Gianguzza, P., 2017, Morphological response of the larvae of *Arbacia lixula* to near-future ocean warming and acidification, *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), 1180-1190.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012, Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure, *Environmental science & technology*, 46(20), 11327-11335.

Wallace, R.L., Taylor, W.K., 2002, *Phylum Annelida*, Invertebrate zoology: A laboratory manual, In: Snively S. (ed), Chapter 11, 6th ed., Upper Saddle River, 167.

Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., Na, G., 2019, The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 110-7.

Wang, Y., Li, L., Hu, M., Lu, W., 2015, Physiological energetics of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to seawater acidification and thermal stress, *Science of the Total Environment*, 514, 261-272.

Wang, Z., An, C., Chen, X., Lee, K., Zhang, B., Feng, Q., 2021, Disposable masks release microplastics to the aqueous environment with exacerbation by natural weathering, *Journal of hazardous materials*, 417, 126036.,

- Wangensteen, O., Turon, X., García-Cisneros, A., Recasens, M., Romero, J., & Palacín, C., 2011, A wolf in sheep's clothing: carnivory in dominant sea urchins in the Mediterranean, *Marine Ecology Progress Series*, 441, 117–128.
- Weis, J., 2014, Respiration and Metabolism, *Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution*, 65-95.
- Welladsen, H. M., Southgate, P. C., Heimann, K., 2010, The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on shell characteristics of *Pinctadafucata* (Bivalvia: Pteriidae), *Molluscan Research*, 30: 125–130
- Weltje, L., Heidenreich, H., Zhu, W., Wolterbeek, H.T., Korhammer, S., de Goeij, J.J.M., Markert, B., 2002, Lanthanide concentrations in freshwater plants and molluscs, related to those in surface water, pore water and sediment, *Science of The Total Environment*, 286, 191–214.
- Wood, S.A., 1990, The aqueous geochemistry of the rare-earth elements and yttrium: 1. Review of available low-temperature data for inorganic complexes and the inorganic REE speciation of natural waters, *Chemical Geology*, 82 (0), 159–186.
- Wright, S.L., Kelly, F.J., 2017, Plastic and human health: a micro issue? *Environmental Science & Technology*, 51 (12), 6634–6647.
- Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013, The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review, *Environmental Pollution*, 178, 483-492.
- Wu, J., Chen, A., Peng, S., Wei, Z., Liu, G., 2013, Identification and application of amino acids as chelators in phytoremediation of rare earth elements lanthanum and yttrium, *Plant and soil*, 373, 329-338.
- Wu, Y., & Zhou, Q., 2013, Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure, *Environmental toxicology and chemistry*, 32(1), 165-173.
- Zeebe, R. E., Ridgwell, A., 2011, *Ocean acidification*, In: Gattuso, J. P., Hansson, L. (Eds.), Chapter 2, Oxford university press, New York, ISBN: 978-0-19-959108-4, 21-23.
- Zhang, P., Yan, Z., Lu, G., Ji, Y., 2019, Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*, *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 17010-17020.
- Zhang, Y., Zhang, Y. B., Feng, Y., & Yang, X.J., 2010, Reduce the plastic debris: A model research on the great Pacific ocean garbage patch. *Advanced Materials Research*, 113–116, 59– 63.
- Zhao, L., Liu, L., 2018, Assessing the impact of lanthanum on the bivalve *Corbicula fluminea* in the Rhine River, *Science of the Total Environment*, 640–641, 830–839. |

6. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Berna ŞAHİN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	-
Web Adresi	-

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	16.07.2020

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji Programı

Makale ve Bildiriler	
Belivermiş M., Kılıç Ö., Gezginci-Oktayoglu S., Sezer N., Demiralp S., Şahin B., Dupont S. (2023). Physiological and gene expression responses of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> to low pH and low dissolved oxygen. <i>Marine Pollution Bulletin</i> 187, 114602.	