



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**

**KEKAMUZ ÖNLEYİCİ (ANTIFOULING)  
BOYALARDA BULUNAN BAZI BİYOSİDAL MADDELERİN  
EPITHELIOMA PAPULOSUM CYPRINI (EPC)  
BALIK HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

**Orhan TOKUR**

Danışman  
**Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY**

SAMSUN  
2020



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



KEKAMUZ ÖNLEYİCİ (ANTIFOULING)  
BOYALARDA BULUNAN BAZI BİYOSİDAL MADDELERİN  
EPITHELIOMA PAPULOSUM CYPRINI (EPC)  
BALIK HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

**Orhan TOKUR**

Danışman

**Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY**

Bu tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.VET.1904.18.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2020

## TEZ KABUL VE ONAYI



## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklarda gösterilenlerden oluştuğunu, enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

... / 12 / 2020

Orhan TOKUR

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı:** Kekamoz önleyici (antifouling) boyalarda bulunan bazı biyosidal maddelerin Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) balık hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 04.11.2020 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 4

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

... / 12 / 2020

Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY  
(Danışman)

## ÖZET

### KEKAMOZ ÖNLEYİCİ (ANTIFOULING) BOYALARDA BULUNAN BAZI BİYOSİDAL MADDELERİN EPİTHELIOMA PAPULOSUM CYPRİNİ (EPC) BALIK HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ.

Orhan TOKUR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Farmakoloji-Toksikolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2020

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY

Tekne, gemi gibi taşıtların su ile temas eden yüzeylerinde kabuklu deniz canlıları, makroalgler ve bakteriler gibi organizmaların yerleşerek kolonize olmaları kekamoz (biofouling) olarak tanımlanmaktadır. Kekamoz oluşumu nedeniyle su taşıtlarının hidrodinamik özellikleri zarar görmekte, yakıt tüketimi ve CO<sub>2</sub> salınımı artmakta; kekamoz vasıtasıyla yeni bölgelere taşınan istilacı organizmalar biyoçeşitliliğe zarar vermektedir. Kekamoz önleyici (antifouling) boyalar gemilerin karinasına uygulanarak istenmeyen organizmaları yok etmekte ve tutunmalarını engellemektedir. Ancak boyaların içeriğinde bulunan biyosidal maddeler hedef dışı canlılara zarar verip ekosistemi tehdit etmektedir. Bu tez çalışmasının amacı kekamoz önleyici boyalarda yardımcı biyosidal madde olarak kullanılan 4,5-Dikloro-2-oktilisothiazol-3(2H)-on (DCOIT), diklofluanid ve zineb bileşiklerinin hücresel düzeyde *in vitro* sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, toksikodinamik etkileşimlerinin ve proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla bileşikler sazan epidermal hücre hattı olan EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) hücrelerine, bireysel ve karma halde 10<sup>-3</sup> ila 10<sup>-7</sup> molar arasındaki konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Gerçekleştirilen WST-8 sitotoksosite testine göre DCOIT, diklofluanid ve zineb bileşiklerinin 24 saatlik inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) değerleri sırasıyla 1.03 mg/L, 6.24 mg/L, 52.43 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bileşiklerin aditif, sinerjistik ya da antagonist etkileşimler yönünden değerlendirilmesi amacıyla CompuSyn programı kullanılmıştır. Bileşiklerin *in vitro* toksik potansiyel sıralaması DCOIT>diklofluanid>zineb olarak tespit edilmiş, ayrıca DCOIT+diklofluanid kombinasyonunda güçlü sinerjizma saptanmıştır. Proliferasyon testi sonucunda DCOIT ve dichlofluanid bileşikleri kombinasyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyonu azalttığı (%45 - %66) tespit edilmiş ancak aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak sucül ortamda DCOIT'in olası birikiminin akuatik canlılar açısından büyük risk arz ettiği; zineb'in ise incelenen diğer bileşiklere nispeten daha az riskli olduğu düşünülmüştür. Son yıllarda geliştirilen ultrasonik cihazlar, nano-kaplamalar, foul-release ve sol-gel kaplamalar gibi biyosidal madde içermeyen çeşitli kekamoz önleyici sistemlerin ya da hedef dışı toksisite ve biyoakümülyasyon potansiyelleri düşük olan biyosidal maddelerin kullanılmasının, ekolojik sorunları önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Antifouling, DCOIT, diklofluanid, proliferasyon, sitotoksosite, zineb

## ABSTRACT

### EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF SOME BIOCIDAL COMPOUNDS PRESENT IN ANTIFOULING PAINTS ON EPITHELIOMA PAPULOSUM CYPRINI FISH CELL LINE

Orhan TOKUR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology

Master, December/2020

Supervisor: Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY

Biofouling is characterized as the colonization and accumulation of bacteria, macroalgae, barnacles, etc. on the water-contacting surfaces of vessels. Hydrodynamic properties are negatively affected by biofouling, which results in higher fuel consumption as well as higher CO<sub>2</sub> emissions. Furthermore, invasive species are introduced to new regions through biofouling and damages biodiversity. To prevent biofouling and avoid the growth of unwanted organisms, antifouling paints are applied to the hull of vessels. Biocides in these paints, however, destroy both fouling species and non-target marine species. Owing to their adverse effects on non-target species, some antifouling biocides such as tributyltin, diuron and Irgarol 1051 have been banned globally and others are still being assessed. This thesis aims to evaluate cytotoxic effects of some antifouling biocides (4,5-Dichloro-2-octylisothiazol-3(2H)-one (DCOIT), dichlofluanid and zineb) to determine their toxicodynamic interactions and their inhibitory effects on cell proliferation *in vitro*. For this purpose, biocides were applied to EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) cells, a common carp epidermal cell line, at concentrations ranging from 10<sup>-3</sup> to 10<sup>-7</sup> moles both individually and in combination. As a result of the WST-8 tests, 24-hours inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) values of DCOIT, dichlofluanid and zineb were determined as 1.03 mg/L, 6.24 mg/L, 52.43 mg/L, respectively. The order of *in vitro* inhibitory potencies of biocides was found to be as DCOIT>dichlofluanid>zineb. Additive, synergistic and antagonistic interactions of the biocides were calculated by CompuSyn software. Strong synergism in the combination of DCOIT+dichlofluanid was detected. As a result of the proliferation tests, it was found that the combination of DCOIT and dichlofluanid decreased proliferation (45% - 66%) compared to the control group, though, the difference was not found statistically significant. It has been concluded that the possible accumulation of DCOIT in the aquatic environment could pose a major threat to marine organisms. Zineb, however, was found to be safer compared to other biocides tested. In conclusion, to minimize environmental concerns, biocides with less non-target toxicity and lower bioaccumulation potential or non-toxic antifouling systems such as ultrasound devices, nano-coatings, foul-release and sol-gel coatings should be encouraged.

**Keywords:** Antifouling, cytotoxicity, DCOIT, dichlofluanid, proliferation, zineb

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, projelendirilmesi ve yürütülmesi aşamalarında destek, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her konuda yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY'a, ayrıca tezime olan katkılarından ötürü tez izleme komitemde yer alan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Oğuzhan YAVUZ ve Prof. Dr. Süleyman Sırrı BİLGE'ye en içten şükranlarımı sunarım.

Tezimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim kıymetli hocalarım Doç. Dr. Yavuz Kürşad DAŞ, Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ ve Doç. Dr. Enes ATMACA'ya desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Tezimi maddi olarak destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversite Proje Yönetim Ofisi ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Tezimin her aşamasında beni destekleyen değerli eşim Kadriye TOKUR'a ayrıca teşekkür ederim.

Orhan TOKUR

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>12</b>
1.1. Denizyolu Taşımacılığı .....	12
1.2. Denizyolu Taşımacılığının Çevresel Etkileri .....	13
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>17</b>
2.1. Kekamoz (Biofouling).....	17
2.1.1. Kekamoza Neden Olan Organizmalar.....	20
2.1.2. İstilacı (Alien) Organizmalar .....	22
2.2. Kekamoz (Fouling) İle Mücadele - Antifouling .....	24
2.2.1. Kekamoz Önleyici (Antifouling) Boyalar.....	26
2.2.2. Kekamoz Önleyici Boyaların Etki Şekilleri ve Sınıflandırılması .....	27
2.2.3. Kekamoz Önleyici Biyosidal Bileşikler ve Zararları .....	29
2.3. Araştırmada İncelenen Biyosidal Maddeler ve Kimyasal Özellikleri.....	36
2.3.1. DCOIT.....	36
2.3.2. Diklofluanid .....	37
2.3.3. Zineb.....	38
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>40</b>
3.1. Kullanılan Standart Maddeler .....	40
3.2. Kullanılan Cihaz, Malzeme ve Kimyasal Maddeler .....	41
3.2.1. Kullanılan Cihazlar .....	41
3.2.2. Kullanılan Sarf ve Cam Malzemeler.....	42
3.2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	43
3.3. Kullanılan Hücre Hattı ve Kültür Metodu.....	43
3.3.1. Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma İşlemleri.....	44
3.4. Sitotoksisite Testi .....	47
3.5. Proliferasyon Testi .....	51
3.6. İstatistiksel Analizler.....	52
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>53</b>
4.1. Sitotoksisite Testi .....	53
4.1.1. DCOIT.....	56
4.1.2. Diklofluanid .....	60
4.1.3. Zineb.....	64
4.1.4. Kombinasyon Sitotoksisite Testi.....	67
4.2. Toksikodinamik Etkileşimler .....	71

4.3. Proliferasyon Testi .....	75
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>79</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>81</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AFS	: Gemilerdeki Zararlı Organik Tutunma Önleyici Sistemlerin Kontrolü Sözleşmesi
ATP	: Adenozin trifosfat
DCOIT	: 4,5-Dikloro-2-oktilisotiyazol-3(2H)-on
DIDT	: 6-dihidro-3H-imidazo (2,1-c)-1,2,4-ditiazol-3-tiyon
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECHA	: Avrupa Kimyasallar Ajansı
EDI	: Etilen diisotiyosiyanat
US- EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EPC	: Epithelioma Papulosum Cyprini
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC	: İnhibitör konsantrasyon
IMO	: Uluslararası Denizcilik Örgütü
LC	: Öldürücü konsantrasyon
MEM	: Minimum Essential's Medyum
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
P-gp	: P-glikoprotein
PMS	: 1-Metoksifenazin metosülfat
SPC	: Kendiliğinden aşınan kopolimer
TBT	: Tribütülin
TCMTB	: (Benzotiyazol-2-tiyometil tiyosiyanat
TOC	: Toplam organik karbon
TPBP	: Trifenilboran piridin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Konteyner Gemisi.....	12
Şekil 2.1. Deniz ve okyanuslarda kekamoz (biofouling) oluşum aşamaları.....	17
Şekil 2.2. Yumuşak ve sert kekamoza neden olan bazı organizmalar.....	18
Şekil 2.3. Bazı su taşıtlarında kekamoz oluşumu.....	19
Şekil 2.4. Bazı yapılarda kekamoz oluşumu.....	20
Şekil 2.5. Bazı istilacı türler.....	24
Şekil 2.6. Karinada bakır kaplama örnekleri.....	25
Şekil 2.7. Kekamoz önleyici boya uygulaması.....	26
Şekil 2.8. Katı ve ablatif boyaların biyosidal salınım mekanizmaları.....	28
Şekil 2.9. Katı, ablatif ve SPC tip boyaların ortalama koruyuculuk süreleri.....	28
Şekil 2.10. Ülkemizde piyasada bulunan bir kekamoz önleyici boya.....	34
Şekil 3.1. EPC hücreleri mikroskopik görüntüleri.....	44
Şekil 3.2. Hücre vasatı eklenmesi.....	45
Şekil 3.3. Tripan mavisi ile hücre sayımı.....	46
Şekil 3.4. -80 derin dondurucu ve kriyoviyaller.....	47
Şekil 3.5. WST-8 Formazan dönüşümü.....	48
Şekil 3.6. Stok ve alt dilüsyonların hazırlanması.....	48
Şekil 3.7. Örnek 96 kuyucuklu mikrolaka dizaynı.....	49
Şekil 3.8. Mikrolaka kuyucuklarında vasat değişimi.....	50
Şekil 3.9. Örnek sitotoksisite testi sonucu.....	50
Şekil 3.10. Canlı hücre görüntüleme cihazı.....	52
Şekil 4.1. 96 saatlik sitotoksisite testi log-konsantrasyon - hücre canlılığı grafiği.....	54
Şekil 4.2. Ölü EPC hücreleri mikroskop görüntüsü (20x).....	55
Şekil 4.3. Zineb çözünürlük sorunu.....	65
Şekil 4.4. EPC hücrelerinde morfolojik bozukluklar.....	67
Şekil 4.5. Kombinasyon sitotoksisite testi log-kons.-hücre canlılığı grafiği.....	70
Şekil 4.6. Ortalama etki (Fa) – Konsantrasyon (doz) grafiği.....	72
Şekil 4.7. Medyan etki (Log Fa/Fu) – log-Konsantrasyon (Log(D) grafiği.....	72
Şekil 4.8. Kombinasyon indeksi – ortalama etki grafiği.....	73



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Okyanus ve denizlerde kirlenmeye sebep olan ana etkenler .....	15
Tablo 2.1. Kekamoz oluşturan bazı organizmalar .....	21
Tablo 2.2. Dünya çapında en sık görülen istilacı organizmalar.....	23
Tablo 2.3. Kekamoz önleyici biyosidal maddelerin sucul canlılara etkileri.....	30
Tablo 2.4. DCOIT bileşiği kimyasal özellikleri .....	37
Tablo 2.5. Diklofluanid bileşiği kimyasal özellikleri .....	38
Tablo 2.6. Zineb bileşiği kimyasal özellikleri .....	39
Tablo 3.1. Kullanılan standart maddeler.....	40
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar.....	41
Tablo 3.3. Kullanılan sarf ve cam malzemeler .....	42
Tablo 3.4. Kullanılan kimyasal maddeler.....	43
Tablo 4.1. DCOIT, diklofluanid ve zineb bileşiklerinin IC <sub>50</sub> değerleri (mg/L).....	55
Tablo 4.2. Çeşitli çalışmalarda hesaplanan DCOIT LC <sub>50</sub> değerleri .....	58
Tablo 4.3. Çeşitli çalışmalarda hesaplanan Diklofluanid LC <sub>50</sub> değerleri .....	62
Tablo 4.4. Bileşiklerin gruplar arası karşılaştırılması (24 saat).....	68
Tablo 4.5. Bileşiklerin gruplar arası karşılaştırılması (96 saat).....	68
Tablo 4.6. Bileşik kombinasyonlarının gruplar arası karşılaştırılması (96 saat) .....	71
Tablo 4.7. Kombinasyon indeksi – Ortalama etki tablosu.....	74
Tablo 4.8. Kombinasyon gruplarının 96 saatlik proliferasyon testi sonuçları.....	77

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Denizyolu Taşımacılığı

Okyanus ve denizler dünya yüzey alanının yaklaşık dörtte üçünü kaplamaktadır. Bu nedenle denizyolu, uluslararası ulaşım ve taşımacılıkta oldukça önemli bir yere sahiptir. Miktar ve hacimce büyük olan yüklerin uzun mesafelere düşük maliyetle taşınabilmesi sayesinde denizyolu taşımacılığı, uluslararası ticaret hacminin %90'dan fazlasına sahip olmuştur (Aras ve Gere, 2010; Karadeniz ve Kılıç, 2015; Şendur, 2015). Ülkemiz dış ticaret 2019 yılı verileri, ithalat ve ihracatın %60'dan fazlasının denizyolu aracılığıyla gerçekleştirildiğine işaret etmektedir (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2020). Dünya çapında 50.000'i aşkın ticari gemi ve 4,6 milyonu aşkın balıkçı gemisi olduğu tahmin edilmektedir (FAO, 2018; ICS, 2019; Statista, 2019). Ticari gemiler; kuru yük gemileri (hububat, ahşap vs), sıvı yük gemileri (petrol, kimyasal vs), konteyner gemileri (Şekil 1.1.) gibi çeşitli gemilerden oluşmaktadır. Ayrıca yolcu gemileri, araştırma gemileri, balıkçı tekneleri, özel yat ve tekneler, savaş gemileri vb. çok sayıda araç bu sayıya eklendiğinde, okyanus ve denizlerdeki taşıt sayısının büyük rakamlara ulaştığı anlaşılmaktadır (Çelik, 2019; Maritime Connector, 2019).



Şekil 1.1. Konteyner Gemisi (Maritime Connector, 2019)

Deniz ve okyanuslarda birçok alanda faaliyet gösteren gemi ve tekne gibi taşıtların, bu fonksiyonlarını ekonomik ve hızlı bir biçimde gerçekleştirmeleri sektörün geleceği açısından oldukça önemli yer tutmaktadır.

Denizyolu taşımacılığında taşınan ürünün türü ve fiziksel özellikleri, sigorta ve personel giderleri, taşınacak mesafe, elleçleme giderleri, kullanılmayan taşıma kapasitesi, vergi ve harçlar gibi çeşitli masraflar taşıma maliyetini doğrudan etkilemektedir. Yakıt maliyeti ise denizyolu taşımacılığının en önemli giderleri arasında yer almaktadır (Saban ve Gülerçin, 2009; UN, 2017b). Birim mesafe kat etmek için harcanan yakıt miktarı arttıkça taşıma maliyeti artmakta ve ekonomik denge bozulmaktadır. Bu nedenle yakıt tüketimini artıracak unsurların asgari düzeye indirilmesi ya da kontrol edilmesi kaçınılmaz hale gelmektedir. Tez çalışmasının ana konusunu oluşturan kekamoz süreci, özellikle yakıt tüketimi ve buna bağlı CO2 emisyonu problemlerini de ilgilendirmektedir.

## **1.2. Denizyolu Taşımacılığının Çevresel Etkileri**

Su, canlıların yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için gerekli en temel bileşendir (Markovic and Nikolic, 2014). Dünyanın toplam yüzey alanı 510.072 milyon kilometrekare iken bunun %70'den fazlasını (361.132 milyon kilometrekare) sular oluşturmaktadır. Su alanı içerisinde ise okyanus ve denizler ortalama olarak %96'lık bir paya sahiptir. Tatlı su kaynakları sadece %3'lük paya sahipken bunun içerisinde göl ve nehirler sadece %1'lik bir alanı teşkil etmektedir (UN, 2017; USGS, 2010).

Su alanları insanlar tarafından tarımsal sulama, içme suyu, kültür balıkçılığı ya da avcılık gibi gıda sağlama faaliyetlerinin yanı sıra taşımacılık, enerji üretimi gibi amaçlarla da kullanılmaktadır. Su alanları içerisinde en büyük paya sahip okyanuslar 500.000'den fazla sayıda canlı türüne ev sahipliği yapmaktadır. Ayrıca küresel ısınma sorununun baş nedeni olan karbon emisyonunun %50'ye yakın kısmı okyanuslar tarafından absorbe edilmektedir (Reddy et al., 2008; UN, 2017). Deniz, okyanus ve göllerde yaşayan fitoplanktonlar, karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve güneş ışığını kullanarak dünya oksijen ihtiyacının yarısını karşılamaktadır (Lin et al., 2003).

Endüstriyel faaliyetler, kimyasal maddeler, çöp ve plastik atıklar gibi insan faaliyetleri nedeniyle oluşan milyonlarca ton atık madde, sürekli olarak sulara karışmaktadır. Başta içme suları olmak üzere deniz, okyanus, göl gibi birçok sucul sistem fiziksel, mikrobiyolojik ya da kimyasal maddeler tarafından sürekli olarak kirletilmekte ve bu nedenle suda yaşayan canlılar zarar görmektedir (Markovic and Nikolic, 2014; Reddy et al., 2008; Tucker et al., 2008). Okyanuslardaki kirliliğinin %80'den fazlasının karasal alanda yapılan faaliyetlerden köken aldığı tahmin

edilmektedir (Sherrington, 2016).

Endüstriyel faaliyetlerin temel kaynaklarından biri olan petrol ve petrol türevi maddeler, en önemli akuatik kirleticiler arasında yer almaktadır (Markovic and Nikolic, 2014). Açık denizlerde şu ana kadar yaşanmış en büyük petrol sızıntısı 2010 yılında Meksika Körfezinde gerçekleşmiş; Deepwater Horizon adlı petrol sondaj platformunda meydana gelen kaza nedeniyle 795.000 ton petrol suya karışmış ve 149.000 kilometrekare alan petrol ile kaplanmıştır (Berenshtein et al., 2020; MacDonald et al., 2015). Ülkemizde ise 1994 ve 1997 yıllarında İstanbul Boğazı ve Tuzla Tersanesi'nde yaşanan kazalarda 20.000 tondan fazla petrol denize karışmıştır (Erik, 2015). Deniz ve okyanuslarda görev yapan petrol tankerleri, her yıl üç bin milyon tona yakın petrol taşımaktadır. Bu taşıtlardan sürekli olarak küçük petrol sızıntıları meydana gelmekte ve mikroskobik alglerden deniz memelilerine kadar birçok deniz canlısı bu durumdan etkilenmektedir (UN, 2017). Su kaynaklarının kirlenmesine neden olan diğer etkenler arasında ağır metaller (Petra et al., 2020), poliklorlu bifeniller (PCB) ve organik klorlu maddeler (OC) (Aksoy vd., 2012) bulunmaktadır. Biyolojik degradasyon, oksidasyon ya da hidroliz gibi mekanizmalarla yıkımlanmaya karşı dirençli olan bu maddeler ise doğada yıllarca bozunmadan kalabilir ve biyoakümülyasyon yolu ile canlılarda birikebilirler. Başta endokrin ve reproduktif sistem olmak üzere birçok yaşamsal faaliyete zarar veren bu maddelerin sucül ekosistemde neden olduğu hasarların boyutu birçok araştırma ile ortaya konulmuştur (Sobhanardakani et al., 2018; Sonne et al., 2020; Wang et al., 2018). Yıkımlanmaya karşı çok dirençli olan bir diğer kirletici madde türü ise plastiklerdir. Dünyada her yıl 380 milyon tondan fazla plastik üretilmekte ve yine her yıl 8 milyon tondan fazla plastik atığın okyanuslara karıştığı tahmin edilmektedir (Jambeck et al., 2015).

Yer altı sularına ya da yağmur suları ile nehir, göl ve deniz sularına karışan tarım ilaçları özellikle fotosentetik türler olan fitoplanktonlara zarar vermektedir (Smedbol et al., 2018; Szöcs et al., 2017). Ayrıca kekamoz önleyici (antifouling) boyalar liman ve tersane gibi gemi bakım ve onarım faaliyetlerinin gerçekleştirildiği alanlarda yoğun birikim göstererek çevrede yaşayan sucül canlılara çeşitli zararlar vermektedir (Bighiu et al., 2017; Matthiessen, 2019; Heuvel-Greve et al., 2016). Okyanus ve denizlerde kirlenmeye yol açan ana etkenler Tablo 1.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 1.1. Okyanus ve denizlerde kirlenmeye sebep olan ana etkenler (Laws, 2018; Nikinmaa, 2014)

Madde	Kaynak
Petrol	Petrol platformlarında ya da petrol taşımacılığı esnasında yaşanan kazalar veya sızıntılar Petrol rafinelerinin atık su deşarjı
Metal ve metalloidler	Madencilik, dökümhane, evsel atıklar (bakır, çinko, demir, kadmiyum, arsenik, kurşun, cıva)
Gübre	Evsel atıklar, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliği (nitrat, amonyum nitrojen, fosfat)
Radyoaktif bileşikler	Nükleer enerji santrali kazaları, uranyum madenciliği
Farmasötik maddeler ve temizlik maddeleri	Başta antibiyotikler olmak üzere ilaç ve yardımcı maddeleri, sabun ve dezenfektan maddeler
Halojenli bileşikler	PCB'ler, OK'lar, dioksinler, furanlar ve organik bromlu bileşikler
Pestisitler	İnsektisit, herbisit, fungusit, kekamoz önleyici biyositler vb. maddeler
Plastikler	Her yıl 8 milyon tondan fazla plastiğin sulara geçtiği tahmin edilmektedir. Özellikle mikroplastikler ( $\approx 5$ mm boyutundaki plastik parçaları) ve plastikleştirici maddeler (fitalatlar, bisfenol A vb.) önemli zararlara neden olmaktadır.

Deniz ve okyanuslarda meydana gelen kazalar ve ana kirlenme faktörlerinin dışında deniz yolu ulaşım ve taşımacılık faaliyetlerinden kaynaklanan çok sayıda etken, suların kirlenmesine neden olmaktadır. Personel atıkları, kirli suların deşarjı ve kanalizasyon atıkları, egzoz gazının meydana getirdiği hava kirliliği gibi etkenlere ek olarak kekamoz önleyici boyalardan kaynaklanan biyosidal salınımı ve balast tankları aracılığıyla taşınan istilacı organizmalar büyük problem teşkil etmektedir (David et al., 2015; Hewitt, 2002). Gemilerde yükün eşit dağılımını sağlamak için alınan tonlarca su ile beraber çok sayıda organizma balast tanklarına girebilmektedir. Böylece binlerce mil seyahat eden gemi, yükünü boşaltdıktan sonra, tanklarda depolanan suyu ve beraberinde bulunan organizmaları yeni bölgelere boşaltmaktadır (Briski et al., 2010; David et al., 2015). Bu organizmalardan mücadele gücü yüksek bazı türler istilacı olarak davranıp yeni yerleştikleri bölgelerdeki ekolojik çeşitliliği tehdit edebilmektedir (Vilà et al., 2010). Bu organizmalara karşı, gemi karinalarına uygulanan kekamoz önleyici boyalardan çok sayıda toksik biyosidal madde

salınmakta; boya içeriğinde bulunan demir, bakır, çinko ve arsenik gibi ağır metaller suya karışmaktadır (Amara et al., 2018; Flach et al., 2017).

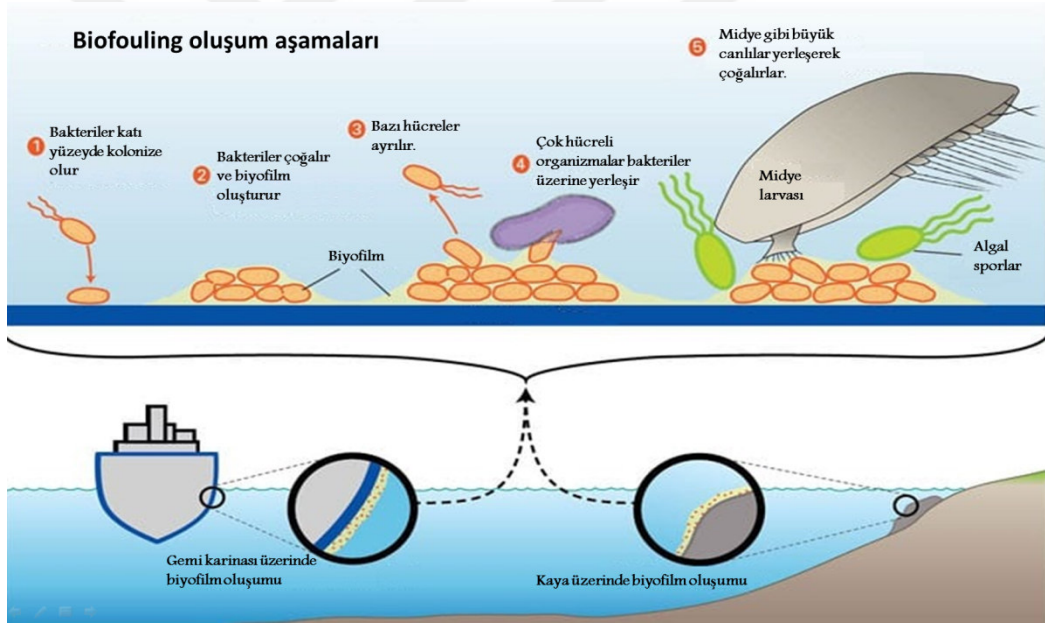
Su kaynaklarının korunması, canlıların yaşamını sürdürebilmesi için en önemli ihtiyaçlardan biri olmasının yanı sıra tarımsal ve endüstriyel faaliyetlerin devamlılığı için oldukça gereklidir (Gutierrez and Mutharasan, 2020; Mauter et al., 2018). FAO (2011), temiz su kaynaklarına erişimin yetersizliği ile ülkelerin yoksulluk seviyesi arasında doğrudan ilişki bulunduğunu bildirmiştir. Bu nedenlerle suların ve suda yaşayan canlıların korunması, sürdürülebilir bir gelecek açısından oldukça önemlidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kekamoz (Biofouling)

Tekne, gemi gibi taşıtların su ile temas eden yüzeylerinde kabuklu deniz canlıları, makroalgler ve bakteriler gibi organizmaların yerleşerek kolonize olmaları kekamoz (biofouling) olarak tanımlanmaktadır. Kekamoz oluşumu nedeniyle su taşıtlarının hidrodinamik özellikleri zarar görmekte, gemi tabanında su ile sürtünme derecesi fazlalaşarak yakıt tüketiminde doğrudan artış meydana gelmektedir. Yakıt tüketimindeki artış, birim yol kat etmek için gereken maliyet artışına, dolaylı olarak ise CO<sub>2</sub> salınımı artışına ve küresel ısınma sorunun ilerlemesine neden olmaktadır (Callow and Callow, 2002; Davidson et al., 2016; IMO, 2019). Ayrıca, kekamoz ile gemilere tutunan bazı organizmalar, geminin seyahat ettiği yeni bölgelerde çoğalarak istilacı tür olarak davranabilmektedir.



Şekil 2.1. Deniz ve okyanuslarda kekamoz (biofouling) oluşum aşamaları, Winner (2012)'den Türkçe'ye çevrilerek uyarlanmıştır

Kekamoz süreci çok aşamalı olarak şekillenmektedir (Şekil 2.1). İlk olarak suda çözülmüş organik materyaller, suya bırakılan obje üzerine absorbe olur. Daha sonra çeşitli mikroorganizmalar (tek hücreli algler, siyanobakteriler vb.) organik materyal üzerinde kolonize olurlar. Mikroorganizmalar çoğalarak slime (glikokaliks) olarak adlandırılan yapışkan bir tabaka oluşturur ve birkaç saat içerisinde yüzeyde biyofilm katmanı meydana getirirler. Böylece büyük organizmaların tutunup çoğalabileceği yüzey oluşarak ilk aşama tamamlanır. Mikro kekamoz (mikrofoiling)

olarak da anılan bu aşama sonrası makro kekamoz (makro fouling) süreci başlar. Makro kekamoz süreci coğrafi bölge, sucul biota ve sezon (yaz/kış) gibi değişkenlere bağlı olarak hızlı ya da yavaş, yoğun ya da hafif kekamoz şeklinde gerçekleşir. Kekamoza sebep olan canlılar sert ya da yumuşak karakterde olabilir. Sert kekamoza sebep olan organizmalar istridye ve midye gibi kabuklu canlılar iken yumuşak kekamoza sebep olanlar mercan, deniz süngeri, denizşakayığı gibi canlılardır (Şekil 2.2.) (Callow and Callow, 2002).



Şekil 2.2. Yumuşak ve sert kekamoza neden olan bazı organizmalar. a. *Bivalvia spp.* (midye) b. *Balanus spp.* (kaya midyesi) c. *Porifera spp.* (deniz süngeri) d. *Anthozoa spp.* (mercan) (Anonymus, 2016; Medium, 2017; NMS, 2018; NPS, 2018)

Kekamoz, gemi karinasının yanı sıra kuyruk dümeni, pervane, pervane mil kovanı, balast tankları gibi geminin çeşitli bölgelerinde ve farklı ekipmanlarında meydana gelebilmektedir (Davidson et al., 2016). Ayrıca iskele ayakları, membran biyoreaktör sistemleri gibi çeşitli su arıtma sistemleri, açık deniz petrol platformları, balık kafesleri, şamandıralar gibi su ile ilişkili birçok yapıyı etkileyebilmektedir. Bu

yapılarda oluşan kekamoz nedeniyle özellikle metal ekipman koroze olarak paslanıp büyük maddi hasarlar meydana gelmektedir. Gemilerin karinasında oluşan kekamoz, sürtünmeyi artırarak yakıt tüketimini olumsuz yönde etkilemektedir. Gemi karinasında meydana gelen her 100 µm'lik kalınlığın, yakıt tüketiminde %6 artışa neden olduğu hesaplanmıştır (Konstantinou, 2006; Townsin and Dey, 1987; Voulvoulis et al., 1999). Kekamoza karşı korunma bulunmayan bir gemi karinasında, 6 ay içerisinde metrekarede 150 kilograma yakın kekamoz meydana gelebilmektedir. Büyük bir petrol tankerinin ortalama olarak 40.000 metrekare su altı alanı vardır ve burada oluşabilecek kekamoz ağırlığının 6.000 tona eşdeğer olduğu ortaya çıkmaktadır (Bray and Langston, 2006). Bu bağlamda 6.000 tonluk ekstra yükün getireceği yakıt maliyeti düşünüldüğünde, kekamoz sorununun sebep olduğu ekonomik maliyet daha iyi anlaşılabilir. Yoğun miktarda kekamoz oluşmuş bazı yapı, ekipman ve tekne fotoğrafları Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bazı su taşıtlarında kekamoz oluşumu a. Tekne tabanında alg kaynaklı yumuşak kekamoz (Anonymus, 2018a) b. Pervane ve dümen üzerinde kaya midyesi kaynaklı sert kekamoz (Arnst, 2017) c. Gemi karinasında kekamoz (Anonymus, 2013)



Şekil 2.4. Bazı yapılarda kekamoza oluşumu a. Su altı ekipmanlarında zamanla oluşan kekamoza (Schilling, 2015) b. İskele ayaklarında midye kaynaklı sert kekamoza oluşumu

### 2.1.1. Kekamoza Neden Olan Organizmalar

Okyanus, deniz ve diğer sucul sistemlerde kekamoza neden olan 4000'den fazla tür tanımlanmıştır. Bu canlılar özellikle besin yönünden zengin kıyı ve kıyıya yakın bölgelerde yaşarlar. Kekamoza oluşumunda ilk basamak bakteriler (örn; *Pseudomonas putrefaciens*, *Vibrio alginolyticus*) ve diyatomlar (örn; *Achnantes brevipipes*, *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia pusilla*) tarafından şekillendirilmektedir. Bu canlılar biyofilm meydana getirip makroskobik türlerin tutunması için gerekli zemini hazırlarlar. Biyofilm oluşumuna bazı protoza türleri de katkı yaparlar (Rosenhahn and Sendra, 2012; Yebra et al., 2004). Kekamoza neden olan makroskobik canlılar genel olarak eklem bacaklılar (*Artropoda*), yumuşakçalar (*Mollusca*), deniz halkalı solucanları (*Polychaeta*), yosunumsu canlılar (*Bryozoa*), tulumlular (*Tunicate*) ve makroalglerdir. Bu canlılar yumuşak ya da sert kekamoza neden olmaktadır. Kekamoza oluşumuna neden olan bazı organizmalar Tablo 2.1.'de belirtilmiştir.

Yumuşak kekamoza neden olan türler arasında algler ilk sırada gelmektedir. Kekamoza oluşmuş alanların neredeyse tümünde alglere rastlanılmaktadır. Algler içerisinde ise *Enteromorpha sp.* (yeşil alg) ve *Ectocarpus sp.* (kahverengi alg) türleri

öne çıkmaktadır. Bu iki tür de dünya çapında geniş yayılım göstermekte ve çok çeşitli çevresel koşullara uyum sağlayarak yaşamını sürdürmektedir (Chaudhari, 2017; Jacobson et al., 1993; Jacobson and Willingham, 2000).

Sert kekamoza neden olan türler arasında ise *Cirripedia* sınıfındaki türler (kaya midyesi gibi) ya da *Bivalvia* sınıfındaki türler (istridye gibi) daha yaygındır. Bu canlılar sert yapıları nedeniyle hidrodinamik dengeye büyük zarar verir ve tutundukları bölgeden güçlükle ayrılabilir (Rosenhahn and Sendra, 2012).

Tablo 2.1. Kekamoz oluşturan bazı organizmalar (Ayers and Hutchins, 1952; Dürr and Thomason, 2009; Railkin, 2003)

Alem&Şube	Alt Şube&Sınıf	Tür
<i>Bacteria</i>		<i>Achromobacter aquamarinus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacterium albolactis</i> , <i>Bacterium mycoides</i> , <i>Chlamydothrix ochracea</i> , <i>Flavobacterium amocontactus</i> , <i>Pseudomonas coenobios</i> , <i>Sarcina alba</i>
<i>Fungi</i>		<i>Amphisphaeria maritima</i> , <i>Halophiobolus longirostris</i> , <i>Helicoma maritimum</i> , <i>Lentecospora submarina</i> , <i>Peritrichospora integra</i> , <i>Phoma navium</i>
<i>Bacillariophyceae</i> (diyatom)		<i>Achnanthes</i> sp., <i>Amphora</i> sp., <i>Diatoma</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Licmophora</i> sp. ( <i>Achnanthes longipes</i> , <i>Amphora bigibba</i> , <i>Diatoma hyalinum</i> , <i>Navicula arenaria</i> , <i>Licmophora californica</i> )
<i>Protozoa</i>	<i>Mastigophora</i> <i>Sarcodina</i> <i>Ciliata</i>	<i>Amphimonas globosa</i> <i>Actinosphaerium</i> sp. <i>Cothurnia maritima</i>
<i>Arthropoda</i> (eklem bacaklılar)	<i>Crustacea</i>  <i>Amphipoda</i>	<i>Balanus</i> sp. "kaya midyesi" <i>Balanus amaryllis</i> , <i>Balanus crenatus</i> , <i>Balanus eburneus</i>  <i>Aegina phasma</i> , <i>Allorchestes angustus</i> , <i>Caprella aequilibra</i> , <i>Jassa falcata</i> , <i>Stenothoe gallensis</i>
	<i>Pelecypods</i> (midye ve istridyegiller)	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus obscurus</i> , <i>Pecten circularis</i> , <i>Ostrea parasitica</i> , <i>Trapezium japonicum</i>
<i>Mollusca</i> (yumuşakçalar)	<i>Amphineura</i> (kitonlar)	<i>Acanthochiton rubrolineata</i> , <i>Chaetopleura apiculata</i> , <i>Ischnochiton compta</i>
	<i>Gastropods</i> (karındanbacaklılar)	<i>Ancula cristata</i> , <i>Dendrodoris nigra</i> , <i>Doto coronata</i> , <i>Galvina exigua</i> , <i>Polycera quadrilineata</i>
	<i>Polychaeta</i> (deniz solucanları)	<i>Amphitrite johnstoni</i> , <i>Arenicola marina</i> , <i>Capitellides giardi</i> , <i>Eupomatus dianthus</i> , <i>Hydroides norvegica</i> , <i>Pomatoceros triqueter</i>

Tablo 2.1. Kekamoz oluşturan bazı organizmalar (devamı)

Bryozoa		<i>Acanthodesia denticulata, Bugula avicularia, Bugula neritina, Callopora craticula, Crisia eburnea, Membranipora denticulata, Plumatella fungosa</i>
	Hydrozoa (polip)	<i>Dynamena pumila, Gonothyrea loveni</i>
Coelenterata	Actiniaria (denizşakayığı)	<i>Actinia mesembryanthemum, Aiptasia diaphana, Metridium dianthus, Sagartia luciae, Alcyonium digitatum, Caryophyllia arcuata, Cladocera arbuscula</i>
	Cnidaria (mercan)	
Chordata	Tunicate	<i>Styela montereyensis, Molgula, Ciona, Amaroucium, Didemnum, Botrylloides</i>
Parazoa	Porifera (süngerler)	<i>Grantia, Leucosoleni, Haliclona sp. H. tubifera</i>
Echinodermata	Asteriodae	<i>Asteracanthium rubens, Asterias littoralis, Asterias rubens, Henricia sanguinolenta, Leptasterias mulleri</i>
	Myxophyceae (mavi-yeşil alg)	<i>Bonnemaisonia asparagoides, Calothrix aeruginea, Dermocarpa leibleiniae, Gomontia polyrhiza, Rydrocoelum lyngbyaceum, Trichodesmium sp.</i>
	Chlorophyceae (yeşil alg)	<i>Acetabularia crenulata, Cladophora sp., Enteromorpha sp., Halicystis sp., Ulothrix sp., Ulva sp.</i>
Alga	Rhodophyceae (kırmızı alg)	<i>Acrochaetium sp., Bangia sp., Ceramium sp., Dasya sp., Dumontia sp., Gelidium sp., Halosaccion sp., Nitophyllum sp., Rhodochorton sp.</i>
	Phaeophyceae (kahverengi alg)	<i>Ascophyllum nodosum, Chorda filum, Dictyopteris sp., Ectocarpus sp., Fvicus sp., Laminaria sp., Myrionema sp., Sargassum enerve, Sargassum polyceratum, U ndaria pinnatafida</i>

### 2.1.2. İstilacı (Alien) Organizmalar

Kıtalar arası taşımacılık ve ticaret yapan gemiler, çeşitli okyanuslardan ve biyosistemlerden geçerek, seyahat ettikleri bölgelerde bulunan bazı canlıları beraberlerinde taşıyabilmektedir. Yeni bölgelere taşınan canlılar burada bulunan yerel sucul bitkilere ve sucul canlılara (endemik türlere) zarar vererek, doğal ekosistemi tehdit edebilmektedir. İstilacı olarak nitelendirilen bu canlıların mücadele güçleri yüksek olduğu için zamanla bölgedeki biyoçeşitliliğe zarar verebilir ve dolaylı yoldan ekolojik ve ekonomik problemlere yol açabilirler. İstilacı organizmalar gemilere balast suları yoluyla ya da gemi karinalarına kekamoz

(biofouling) sürecinde yapışarak yeni bölgelere taşınmaktadır. Çeşitli bakteri, alg ve omurgasız deniz canlıları (denizanası vb.), deniz yosunları, bazı balık ve yengeç türleri gibi çok sayıda farklı canlı, istilacı organizma olarak davranabilmektedir (IMO, 2019; Jackson, 2008). Dünyada yaygın olarak rastlanılan istilacı türler Tablo 2.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Dünya çapında en sık görülen istilacı organizmalar (IMO, 2020a).

İstilacı Organizma	Köken aldığı bölge	Yayıldığı bölgeler
Asya kürek yengeci <i>Charybdis japonica</i>	Kuzey-batı Pasifik Denizi ve doğu Asya kıyıları	Yeni Zelanda Akdeniz (İtalya) (Froggia, 2012)
Tulumlu <i>Colonial tunicate</i>	Kuzey-batı Pasifik Denizi	Kuzey-batı ve Kuzey-doğu Atlantik, Kuzey-doğu Pasifik, Yeni Zelanda Güney Kore (Pyo and Shin, 2011)
Kuzey Pasifik Deniz Yıldızı <i>Asterias amurensis</i>	Kuzey-batı Pasifik	Kuzey-doğu Pasifik Güney Avustralya
Yeşil Dudaklı Midye <i>Perna viridis</i>	Basra körfezi, Filipinler, Doğu Asya kıyıları	Karayipler Güney Atlantik, Güney Pasifik Avustralya
Siyah çizgili midye <i>Mytilopsis sallei</i>	Kuzey-batı ve Doğu Atlantik Karayipler	Doğu Asya kıyıları Kuzey-batı ve Güney Pasifik
Deniz halkalı solucanı <i>Sabella spallanzanii</i>	Kuzey-doğu Atlantik Akdeniz	Güney-batı Atlantik, Kuzey-batı Pasifik Güney Avustralya, Yeni Zelanda
Kaya midyesi <i>Amphibalanus improvisus</i>	Kuzey-batı ve kuzey-doğu Atlantik	Güney-batı Atlantik, Kuzey-batı pasifik Doğu Asya kıyıları Karadeniz, Baltık Denizi, Hazar Denizi Avustralya, Yeni Zelanda, Karayipler
Wakame Deniz Yosunu <i>Undaria pinnatifida</i>	Kuzey-batı Pasifik	Kuzey-doğu ve güney-batı Atlantik kuzey-batı Pasifik, Akdeniz, güney-doğu Avustralya, Yeni Zelanda
Kıyı yengeci <i>Carcinus maenas</i>	Kuzey-doğu Atlantik Baltık Denizi	Kuzey-batı ve güney-batı Atlantik, Kuzey-doğu ve güney Pasifik Doğu Asya, Güney-doğu Avustralya Doğu ve batı Afrika, Akdeniz

Ülkemiz Karadeniz kıyılarına istilacı tür olarak yerleşen *Mnemiopsis leidyi* (taraklı medüz), Akdeniz dâhil dünyanın çeşitli yerlerine yayılan *Undaria pinnatifida* (Wakame deniz yosunu) ve ayrıca yine dünyada geniş dağılım gösteren *Mytilus*

*galloprovincialis* (Akdeniz midyesi), *Eriocheir sinensis* (Kıllı yengeç), *Dreissena polymorpha* (zebra midyesi) gibi türler, uluslararası sınıflandırmalara göre en zararlı 100 istilacı tür listesinde yer almaktadır (Jackson, 2008; Lowe et al., 2000). Bazı istilacı türler Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Bazı istilacı türler, a: *Undaria pinnatifida* (Wakame deniz yosunu) b: *Mnemiopsis leidyi* (taraklı medüz) c: *Dreissena polymorpha* (zebra midyesi) (Henderson, 2019; Shields, 2019; Zeavida, 2019)

## 2.2. Kekamoz (Fouling) İle Mücadele - Antifouling

Gemi ve teknelerde kekamoz ile mücadeleye dair ilk kayıtlar milattan önceki yıllara dayanmaktadır. Fenikeliler, ahşap botlarını korumak için gemi karinalarında kurşun ve bakır levhalar (Şekil 2.6.) kullanmışlar, Avrupa'da çeşitli devletler gemileri yağlarla ya da zift ve katranla kaplamış, Yunanlar ve Romalılar da benzer yöntemlerden yararlanmışlardır. 1800'lerde gemilerin demirden yapılmaya başlanması ile birlikte bakır levhaların demir üzerinde ciddi korozyona yol açtığı tespit edilmiştir. Bu dönemde bakıra alternatif bir madde olmamasından dolayı gemilerde kimi zaman demir üzerine tahta kaplama tercih edilmiştir (Almeida et al., 2007; Yebra et al., 2004).



Şekil 2.6. Karinada bakır kaplama örnekleri, a. Bakır kaplama temsili (USS-Constitution-Museum, 2015), b. Eski bir gemide bakır kaplama rekonstrüksiyonu (Anonymus, 2015)

19. yüzyılın ortalarında bakır, arsenik ve cıva gibi toksik maddeler içeren ve “kekamoz önleyici” boya olarak nitelenebilecek çok sayıda bileşik üretilmiştir. Ancak, şellak, katran, bezir yağı ve çeşitli reçine türevleri gibi bağlayıcılarla uygulanan bu ilkel boya çeşitlerinin etkileri beklenilenin altında kalmıştır (Laidlaw, 1952).

Kekamoz önleyici boyalar, kekamozdan korunmak istenen yüzeye sürülerek salınımlı bir tabaka oluşturmaktadır. Boyada bulunan toksik maddeler suyun çözücü ya da aşındırıcı etkisiyle zaman içerisinde bağlayıcıdan ayrılmaktadır. Suya geçen bu maddeler kekamoza neden olan organizmaların yüzeye tutunmasını önlemekte ya da ilgili organizmaları öldürmektedir. Böylece karina yüzeyini korumaktadır. 2. Dünya Savaşı sonrası petrol ürünü ve reçine türevi bağlayıcıların kullanılmaya başlanması ile kekamoz önleyici boyaların etki kapasiteleri ve koruma süreleri nispeten artmıştır (Dafforn et al., 2011; Yebra et al., 2004). Ancak başta bakır olmak üzere kekamoz önleyici boyalara katılan toksik maddelerin birçoğunun koruyuculuk süresinin kısa olması, teknelerin sık sık kuruya alınarak temizlik ve tekrar kaplama işleminden geçirilmesini gerektirmiştir (Arai et al., 2009). Tribütlin’in (TBT) kekamoz oluşumunu engelleyici etkisi 1960’li yıllarda belirlenmiş, gerek etki spektrumu

gerekse koruyuculuk süresi bakımından diğer bileşikleri geride bırakarak gemicilik alanında en çok tercih edilen biyosidal madde haline gelmiştir (Konstantinou, 2006). TBT, başlangıçta konvansiyonel ya da serbest salımlı olarak adlandırılan formlarda boyalara eklenerek kullanılmış ve etkisinin ortalama olarak 2 yıl devam ettiği tespit edilmiştir. Daha sonra self-polishing copolymer (SPC) olarak adlandırılan özel bir yapı geliştirilmiş ve koruyuculuk süresi ortalama olarak 5 yıla çıkarılmıştır (Dafforn et al., 2011; Lewis, 1998). Ancak uzun bir süre sonra TBT'nin çevrede yol açtığı ekolojik problemler anlaşılmış ve yasaklanana kadar dünya çapında en sık kullanılan kekamoz önleyici madde olmuştur. TBT'nin yanı sıra bakır, kurşun, arsenik gibi ağır metaller ve hatta DDT'nin dahi aynı amaçla kullanıldığı bilinmektedir (Lin et al., 2009).

### 2.2.1. Kekamoz Önleyici (Antifouling) Boyalar

Kekamoza neden olan organizmalar gemi karinasına yapışıp çoğalarak, zararlı etkilere yol açmaktadır. Kekamoz önleyici boyalar ise gemi karinasına uygulanmakta (Şekil 2.7.) ve içeriğinde bulunan biyosidal maddeler çözünerek kekamoza neden olan organizmaları öldürmektedir.



Şekil 2.7. Kekamoz önleyici boya uygulaması, Anonymus (2018b)

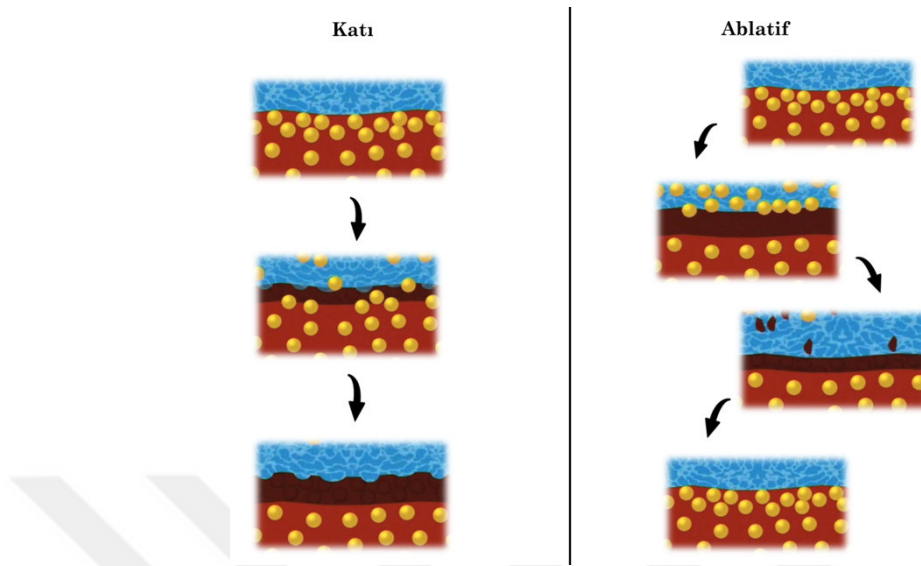
### 2.2.2. Kekamoz Önleyici Boyaların Etki Şekilleri ve Sınıflandırılması

Kekamoz önleyici boyaların optimum etkinlik gösterebilmesi ile ilgili olarak biyosidal maddenin bağlayıcıdan salınım hızı oldukça önemlidir. Eğer salınım hızlı gerçekleşirse boyanın koruma süresi kısalmır, yavaş gerçekleşirse organizmaların karınaya yapışmasına engel olamaz. Kekamoza neden olan organizmalar bir kez yapıştığı zaman genellikle hızlı biçimde üreyip çoğalmakta ve oluşan kekamoz katmanı ancak fiziksel yöntemlerle (kazıma, ovalama vb.) temizlenebilmektedir (Seidel, 2012).

Çözünme özelliklerine göre katı ve ablatif olmak üzere iki temel boya türü bulunmaktadır. Katı (konvansiyonel, hard) boyalar suda çözünmeyen oldukça poröz bir yapıya sahiptir. Polyvinyl chloride (PVC), rosin (sentetik reçine) veya kauçuk gibi oldukça katı bağlayıcılar üzerine eklenen bakır oksit ( $Cu_2O$ ) ve yardımcı (booster) biyosidal maddelerden oluşur (Arai et al., 2009). Su, poröz yapıdan içeri sızar ve biyosidal maddeler suya diffüze olurlar. Katı boyalarda boya yüzeyi taze iken biyosidal madde salınımı yüksek düzeyde gerçekleşir ancak zaman geçtikçe salınan biyosidal madde miktarı azalır ve bu maddeler boya tabakası altında hapsolarak çözünmez biçimde kalabilir. Ayrıca boya tabakası çözünmediği için karına yüzeyinde sabit kalabilir. Bir sonraki boyama işleminin sağlıklı biçimde yapılabilmesi için bu tabakanın basınçlı su kullanılarak temizlenmesi gerekmektedir. Ayrıca tekne ya da geminin karaya çekilmesi ve boya dış katmanının hava ile teması, biyosidal maddelerin zamanla oksidasyonuna ve boyanın etkinliğini yitirmesine yol açmaktadır. Katı boyaların kullanımı, aşınma ve sürtünmeye karşı dayanıklı olması nedeniyle sürat teknelerinde tercih edilmektedir (Faßbender et al., 2019).

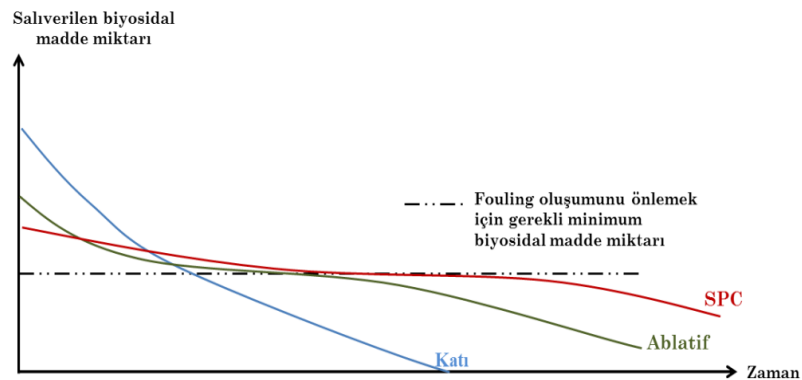
Diğer boya tipi olan ablatif, yani kendiliğinden aşınan boyaların çeşitli türleri mevcuttur. Yumuşak niteliktedirler ve katı boyalara kıyasla daha az biyosidal madde içerirler ancak koruma güçleri daha fazladır. Katı boyalara benzer biçimde poröz yapıları vardır. Fakat ablatif boyaların üst katmanı su tarafından yavaş yavaş aşındırılabilir yapıdadır ve bu sayede altta bulunan taze biyosidal tabakasının açığa çıkması sağlanır. Ablatif boyalar genellikle kekamoz aktivitesinin yüksek olduğu bölgelerde tercih edilirler ve koruma süreleri, kullanılan boya katına paralel olarak artmaktadır. Tekne veya gemiler hareket halinde iken katı ve ablatif boyalar koruyucu özellik gösterirler ancak sabit durduklarında (liman, marina gibi yerlerde), suyun aşındırıcı ve diffüze edici aktivitesi sonlandığından biyosidal salınımı durabilir

ve kekamoz oluşumu görülebilir (Almeida et al., 2007; Seidel, 2012; Yebra et al., 2004). Katı ve ablatif boyaların salınım mekanizmaları Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Katı ve ablatif boyaların biyosidal salınım mekanizmaları (Interlux, 2010)

Katı boyalarda bağlayıcı tabaka suda dağılmazken ablatif boyalarda bağlayıcı tabaka su ile aşınarak altta bulunan yeni biyosidal tabakasının açığa çıkmasını sağlar. Ablatif boyaların özel bir çeşidi olan self-polishing (kendiliğinden aşınan, SPC) boyalar ise hidrofobik yüzeyleri sayesinde suyun difüzyonuna izin vermezler. Boya yüzeyinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon neticesinde biyosidal madde salınımı oluşur. Böylece gemi hareket ederken ya da dururken fark etmeksizin tam bir koruma sağlanabilir (Kwon et al., 2019). Katı, ablatif ve SPC tip boyaların ortalama koruyuculuk süreleri Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Katı, ablatif ve SPC tip boyaların ortalama koruyuculuk süreleri (Interlux, 2010).

Katı boyalar taze iken yüksek salınım oranı sağlamakta ancak kısa sürede

kekamozu önlemek için gerekli minimum biyosidal konsantrasyonun altına düşmekte, ablatif boyalar ve özellikle SPC boyalar ise stabil bir salınım oluşturarak daha uzun süre koruma sağlamaktadır

### 2.2.3. Kekamoz Önleyici Biyosidal Bileşikler ve Zararları

Dünya çapında bakır, bakır piriton, çinko piriton, trifenilboran piridin (TPBP), tribüttilin (TBT), diuron, 4,5-dikloro-2-oktil-izotiyazolon (DCOIT, Sea Nine 211), Irgarol 1051, klorothalonil, diklofluanid, tolifluanid, bakır tiyosiyanat, ziram, zineb, trikloforenil maleimide, tiram, tralopril, dikloro difenil trikloretan (DDT), kapsaisin gibi çok sayıda kimyasal madde kekamozu önlemek amacıyla kullanılmış veya kullanılmaktadır (Thomas and Brooks, 2010). Bakır gibi genel etkili maddeler kekamoz önleyici boyaların temelini oluştururken DCOIT, diklofluanid, zineb, Irgarol 1051 gibi performansı ve koruyuculuğu artırmak için eklenenler, yardımcı (booster) biyosidal maddeler olarak adlandırılmaktadır (Konstantinou and Albanis, 2004; Thomas et al., 2002).

Günümüzde kullanılan kekamoz önleyici boyaların birçoğu bakır oksit ( $Cu_2O$ ) ya da bakır tiyosiyanat ( $CuSCN$ ) içermektedir. Bakır içeren yapı deniz suyu ile temas ettiğinde serbest bakır ( $Cu^{+2}$ ) açığa çıkar. Serbest bakır, kekamoz yapan organizmalarda reaktif oksijen türlerinin seviyelerini artırıp oksidatif hasar oluşturarak etkisini gösterir (Dupraz et al., 2018; Gaetke et al., 2014). Bakır, eski çağlarda karina üzerinde kaplama suretiyle kullanılmış ancak modern gemilerin demir yüzeyinde korozyona yol açması nedeniyle zamanla kaplama şeklindeki kullanım terk edilmiş ve günümüzde kekamoz önleyici boyalara eklenerek kullanılmaya başlanmıştır. Kekamoz önleyici olarak kullanılan biyosidal maddelerin etki şekilleri Tablo 2.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kekamoz önleyici biyosidal maddelerin sucul canlılara etkileri

<b>Kekamoz Önleyici Madde</b>	<b>Kekamoz Önleyici Etki</b>	<b>Toksik Etkiler</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Bakır-oksit</b>	<p>Bakterisit, fungusit ve algisit olarak geniş spektrumlu etki (alg, deniz kurdu, kaya midyesi vb.)<sup>1</sup></p> <p>Özellikle biyofilm oluşturan mikroorganizmalar üzerinde fotosentezi inhibe edici etkisi bulunmaktadır<sup>2</sup></p> <p>Bazı alg türleri (Enteromorpha spp, Ectocarpus spp, Achnanthes spp) dirençli, bu nedenle yardımcı biyosidallerle birlikte kullanılmaktadır<sup>1</sup></p> <p>Sülfidril (-SH) grubu içeren enzimlerin inhibisyonu (örn; ATPaz enzimi)<sup>3</sup></p>	<p>Solungaçlarda Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompası inhibisyonu-osmoregülasyonun bozulması<sup>4</sup></p> <p>Oksidatif stres<sup>5</sup></p> <p>İmmünespresyon<sup>6</sup></p> <p>Larval toksisite<sup>7</sup></p>	<p>(Voulvoulis et al., 2002)<sup>1</sup></p> <p>(McElroy et al., 2017)<sup>2</sup></p> <p>(Katranitsas et al., 2003)<sup>3</sup></p> <p>(Blanchard and Grosell, 2005)<sup>4</sup></p> <p>(Perić and Burić, 2019)<sup>5</sup></p> <p>(Cima and Ballarin, 2012)<sup>6</sup></p> <p>(Amara et al., 2018)<sup>7</sup></p>
<b>Bakır-piritiyon</b>	<p>Algisit, bakterisit ve fungusit</p> <p>Hücre membran transport fonksiyonu inhibisyonu<sup>2</sup></p>	<p>Oksidatif stres<sup>3</sup></p> <p>Solungaç dejenerasyonu<sup>4</sup></p> <p>Asetilkolin esteraz enzimi inhibisyonu (metaboliti)<sup>5</sup></p>	<p>(ECHA, 2014)<sup>1</sup></p> <p>(Ermolayeva and Sanders, 1995)<sup>2</sup></p> <p>(Almond and Trombetta, 2016)<sup>3</sup></p> <p>(Borg and Trombetta, 2010)<sup>4</sup></p> <p>(Mochida et al., 2009)<sup>5</sup></p>
<b>Chlorothalonil</b>	<p>Fungisit<sup>1</sup></p> <p>Glikoliz inhibisyonu<sup>2</sup></p> <p>-SH grubu içeren enzimlere bağlanarak enzim etkinliğini inhibe etme<sup>3</sup></p>	<p>İmmünespresyon ve apoptoz<sup>4</sup></p> <p>Oksidatif stres<sup>5,6</sup></p> <p>Larval malformasyon<sup>8</sup></p> <p>Genotoksisite<sup>8</sup></p> <p>Embriyotoksisite<sup>9</sup></p>	<p>(Guardiola et al., 2012)<sup>1</sup></p> <p>(Long and Siegel, 1975)<sup>2</sup></p> <p>(O'Malley, 2010)<sup>3</sup></p> <p>(Cima et al., 2008)<sup>4</sup></p> <p>(da Silveira Guerreiro et al., 2020)<sup>5</sup></p> <p>(da Silva Barreto et al., 2018)<sup>6</sup></p> <p>(Gallo and Tosti, 2015)<sup>7</sup></p> <p>(Lopes et al., 2020)<sup>8</sup></p> <p>(Amara et al., 2018)<sup>9</sup></p>
<b>Çinko-piritiyon</b>	<p>Bakterisit ve fungusit<sup>1</sup></p> <p>Oksidatif fosforilasyon ve lizozomal aktivitenin inhibisyonu<sup>2</sup></p>	<p>Asetilkolin esteraz enzimi inhibisyonu (metaboliti aracılığıyla)<sup>3</sup></p> <p>Embriyotoksisite<sup>4</sup></p> <p>Teratojen<sup>5</sup></p> <p>Apoptoz<sup>6</sup></p>	<p>(Maraldo and Dahllöf, 2004)<sup>1</sup></p> <p>(Cima and Ballarin, 2015)<sup>2</sup></p> <p>(Mochida et al., 2009)<sup>3</sup></p> <p>(Bellas et al., 2005)<sup>4</sup></p> <p>(Goka, 1999)<sup>5</sup></p>

			(Mann and Fraker, 2005)
--	--	--	-------------------------

Tablo 2.3. Kekamoz önleyici biyosidal maddelerin sucul canlılara etkileri (devamı)

<b>DCOIT</b>	Yumuşak ve sert kekamozla karşı geniş spektrumlu etki <sup>1</sup> İmmünespresyon ve apoptoz <sup>1</sup>	Endokrin hormon seviyelerini artırma/azaltma <sup>2</sup> Hücrenel sinyal iletimini bozma <sup>3</sup> Kolinergic nörotransmisyonu engelleme (hareket kabiliyetinde azalma) <sup>4</sup> Hepatopankreatik toksisite/karaciğerde trigliserit birikimi/ solungaçlarda melatonin birikimi <sup>5</sup> Oksidatif stres <sup>6</sup> İntrasellüler Ca <sup>+2</sup> salınımında artış/nörotoksisite <sup>7</sup> Tiyol içeren enzimlere bağlanarak inhibisyon <sup>8</sup>	(Cima et al., 2008) <sup>1</sup> (Chen et al., 2016) <sup>2</sup> (Chen et al., 2014) <sup>3</sup> (Su et al., 2018) <sup>4</sup> (Su et al., 2019) <sup>5</sup> (Arning et al., 2009) <sup>6</sup> (Wakita et al., 2017) <sup>7</sup> (Devilla et al., 2005) <sup>8</sup>
<b>Diklofluamid</b>	Fungisit <sup>1</sup> -SH grubu içeren enzimlere bağlanarak enzim etkinliğini inhibe etme <sup>3</sup>	İmmünespresyon <sup>3</sup> Embriyotoksisite, larval toksisite <sup>4</sup> Oksidatif stres <sup>5</sup>	(ECHA, 2016) (Amara et al., 2018) <sup>1</sup> (Cima and Varello, 2020) <sup>3</sup> (Bellas, 2006) <sup>4</sup> (Suzuki et al., 2004) <sup>5</sup>
<b>Diuron</b>	Herbisit, algasit fotosentez inhibitörü (fotosistem-II) <sup>1,2,3,4</sup>	Embriyotoksik, genotoksik <sup>5</sup> Oksidatif stres <sup>5</sup> İmmünespresyon <sup>6</sup>	(Voulvoulis et al., 1999) <sup>1</sup> (Backhaus et al., 2004) <sup>2</sup> (Perschbacher and Ludwig, 2004) <sup>3</sup> (Amara et al., 2018) <sup>4</sup> (Akcha et al., 2012) <sup>5</sup> (Menin et al., 2008) <sup>6</sup>
<b>Irgarol 1051</b>	Herbisit, özellikle tatlı ve tuzlu alglerine (makroalg ve mikroalg) karşı çok etkili <sup>2</sup> Fotosentez inhibitörü (fotosistem-II) <sup>2</sup>	İmmünespresyon <sup>3</sup>	(Voulvoulis et al., 1999) <sup>1</sup> (Toth et al., 1996) <sup>2</sup> (Cima and Ballarin, 2012) <sup>3</sup>
<b>TCMS piridin</b>	Fungisit <sup>1</sup>	DNA hasarı, hücre membran hasarı <sup>2</sup> Oksidatif stres ve imünespresyon <sup>2</sup>	(Pynaert and Speleers, 2005) <sup>1</sup> (Menin et al., 2008) <sup>2</sup>
<b>Zineb</b>	Fungisit <sup>1</sup>	Apoptoz <sup>2</sup>	(Andrioli et al., 2012) <sup>1</sup> (Jia and Misra, 2007) <sup>2</sup>

Tribütiltin (TBT) adlı organik kalay bileşiğinin 1960'lı yıllarda kekamoz önleyici özelliklerinin ortaya konulması ve patentinin alınması ile birlikte bakırın popülaritesi azalmıştır. 1974'te TBT'nin kendiliğinden aşınan boya yapısının geliştirilmesi ile etki süresi ve koruyuculuğu oldukça artmış, dünya çapında en sık tercih edilen kekamoz önleyici biyosidal madde haline gelmiştir (Yebara et al., 2004). Bakteri, mantar, yumuşakça ve kabuklu canlıları kapsayan geniş bir etki yelpazesine sahip olan TBT (Sekizawa et al., 2013), ATP sentezinin inhibe edilmesi ve osmotik dengenin bozulması, oksidatif strese yol açma ve alglerde fotosentez inhibitörü etkileri ile kekamoz önleyici özellik göstermektedir (Chen and Qian, 2017; Qian et al., 2013). TBT su fazında iken daha az toksik metabolitleri olan dibütiltin ve monobütiltin'e parçalanabilir. TBT, su çözünürlüğünün çok zayıf olması nedeniyle sudaki parçacıklara tutunmaya ve sedimentte birikmeye eğilimlidir. Deniz suyu gibi tuzlu sularda, su molekülleri ve iyonlar arasında güçlü iyonik bağlar kurulmaktadır. Böylece TBT gibi lipofilik bileşiklerin çözünürlüğü azalmaktadır. İlgili durum neticesinde biyomagnifikasyon riski büyümektedir (Antizar-Ladislao, 2008). TBT sedimente geçtiğinde ise, özellikle anerobik şartlar altında yıkılma hızı oldukça yavaşlayarak yıllarca parçalanmadan kalabilmektedir (Sousa et al., 2014). TBT'nin yıkılma hızı su sıcaklığı ve pH değeri, tuzluluk oranı, sezon, mikrobiyota vb. birçok değişkene bağlıdır. Deniz suyunda 5 - 128 gün, sedimentte ise 4 aydan 19 yıla kadar yarılanma ömrüne sahip olabildiği belirtilmiştir (Alzieu, 1998; Berto et al., 2007). TBT'nin zararlı etkileri ilk kez Fransa'nın Atlantik sahilinde yer alan istridye üretim işletmelerinde ortaya çıkmıştır. Bu işletmelerde bulunan istridyelerde büyüme geriliği ve üreme problemleri gözlenmiş; ilgili işletmeler 1970'lerin sonunda ve 1980'lerin ilk yıllarında büyük maddi zarara uğramıştır (Sousa et al., 2014). İstridye çiftliklerindeki üretimde gözlenen büyük düşüşler sonrası istridyelerin larval gelişiminde anomaliler ve kabuk deformasyonları da tespit edilmiş ve sonrasında yapılan incelemelerde bu durum bölgedeki TBT seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Alzieu et al., 1986). TBT kontaminasyonu ile ilgili olarak kısa bir süre sonra dişi gastropodlarda erkek cinsiyet organlarının gelişimi, "imposeks" denilen bozukluk tanımlanmıştır (Gibbs and Bryan, 1986). İlgili bozukluk neticesinde dişilerde öncelikle rudimenter penis ve vas deferens gelişmekte, daha sonra ovidukt'un tıkanması ile yumurtlama engellenmekte ve ölüm şekillenmektedir. 2 ng/L konsantrasyonda TBT maruziyetinin dahi kabuk deformasyonlarına ve imposeks'e yol açabildiği çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Chagot et al., 1990;

Oberdörster and McClellan-Green, 2002). Dünya çapında yoğun biçimde kullanılan TBT, birçok bölgede birikerek hedef dışı sucul organizmalar üzerinde çok sayıda istenmeyen etkiye yol açmıştır (Sousa et al., 2014). Özellikle iç sularda ve marinalarda uzun zaman geçiren gezi tekneleri ve yatların, TBT kontaminasyonuna en büyük katkıyı yaptığı düşünülmüş ve ilk etapta bazı ülkeler tarafından 25 metreden kısa teknelerde TBT kullanımı yasaklanmıştır (Alzieu et al., 1986). TBT yasak ve kısıtlamalarını 1987’de İngiltere, 1988’de Amerika Birleşik Devletleri (ABD), 1989’da Kanada, Avustralya ve Avrupa Birliği takip etmiştir (Champ, 2000). Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO) tarafından 2003 yılında hazırlanan ve 2008 yılında yürürlüğe giren “Gemilerdeki Zararlı Organik Tutunma Önleyici Sistemlerin Kontrolü (AFS)” sözleşmesi ile 1 Ocak 2008 itibariyle sözleşmeye imza atan ülkelere ait tüm gemi ve teknelerde TBT kullanımı yasaklanmıştır. Mayıs 2020 tarihi itibariyle dünya ticari filosunun toplam %99,04’üne sahip olan 165 ülkenin sözleşmeye katıldığı bildirilmiştir (IMO, 2020b). Ülkemizde ise ilgili sözleşme 2018 yılında onaylanarak yürürlüğe girmiştir (Antizar-Ladislao, 2008; Resmi-Gazete, 2018). Sözleşmeye katılan bazı ülkelerde organik kalaylı bileşiklerin yasadışı yollarla halen kullanıldığı ve bu durumun daha çok amatör balıkçı ve gezi teknelerinde suistimal edildiği belirtilmektedir (Castro et al., 2018).

Gemicilik endüstrisinin kekamoz önleyici sistemlerden beklentisi kekamoza neden olan organizmaların larvalarının uzaklaştırılması, bakteriyel ve mikroalgal biyofilm oluşumunun önlenmesi ve özellikle sert kekamoza (hard fouling) neden olan kabuklu canlıların karınaya tutunmasının engellenmesidir (Cima et al., 2001). Bu nedenlerle TBT yasağını takiben kekamoza yönelik bakır kullanımı yeniden artış göstermiştir. Ancak *Enteromorpha* gibi sıkça kekamoza yol açan bazı organizmalarda bakıra karşı direnç saptanması ve bakırın kekamoz önleyici etkisinin yetersiz kalması nedeniyle yardımcı (booster) olarak adlandırılan çeşitli biyosidal maddeler, bakırla birlikte kekamoz önleyici boyalara eklenerek kullanılmaya başlanmıştır (Chambers et al., 2006; Konstantinou, 2006). Bu kombinasyonlarda bakır genellikle bakır oksit ( $Cu_2O$ ) formunda bulunmakta ve toksisitenin artırılması ya da boyadan ayrılma sürecinin kolaylaştırılması amacıyla formülasyona çinko da eklenebilmektedir (Guardiola et al., 2012). Örnek olarak ülkemizde kullanılan bir boya ve içeriği Şekil 2.10.’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Ülkemizde piyasada bulunan bakır oksit, zineb ve diuron içeren kekamoz önleyici boya

Günümüzde kekamoz önleyici boyaların içerisinde kullanılabilen, ortalama olarak 18 farklı yardımcı biyosidal madde bulunmaktadır. Bunların bir kısmı hedef dışı canlılara olan etkileri nedeniyle birçok ülke tarafından yasaklanmıştır. Yardımcı biyosidal maddelerin birçoğu daha önce herbisit, fungusit ya da bakterisit olarak kullanılmış veya kullanımı devam eden maddelerdir (Chen and Qian, 2017). Klorothalonil, diklofluanid, Irgarol 1051, TCMS piridin, tiyosiyanatmetiltiyobenzotiyazol (TCMTB), diuron, 4,5-dikloro-2-oktil-2H-isotiyazol-3-on (DCOIT, Sea Nine 211), çinko piritiyon, bakır piritiyon ve zineb sıkça kullanılan yardımcı biyosidal maddelerdendir (Dafforn et al., 2011).

Irgarol 1051 s-triazin herbisit grubunda yer alan ve fotosentez inhibitörü olarak etki gösteren bir maddedir. Kekamoza neden olan tatlı ve tuzlu su algleri üzerinde etkili olmasının yanı sıra mercan ve deniz çayırı gibi hedef dışı canlıları da etkilemektedir. Yarılma ömrü ortalama olarak 273 gün olarak belirtilen Irgarol 1051'in parçalanma ürünleri olan M1, M2 ve M3 de oldukça toksiktir (Hall Jr et al., 1999; Zhang et al., 2019). Diuron benzer şekilde fotosentez inhibitörü olarak etkiyen bir maddedir. Yarı ömrü fotodegradasyon ile 9-38 gün sürerken, biyodegradasyon ile 602 ila 814 güne kadar uzayabilmektedir (Balakrishnan et al., 2012; Hall Jr et al., 1999). Irgarol 1051, s-triazin grubunun en lipofilik üyesidir. Dolayısıyla sedimentte yoğun birikme eğilimi gösterir. Diuron ise daha çok suda çözülmüş halde bulunur ve

sedimentte birikme eğilimi zayıftır. Irgarol 1051 ve diuron'un parçalanma yarı ömürleri uzun ve kalıcılıkları yüksektir. Bu bileşikler deniz suyu değişiminin zayıf olduğu bölgelerde artan miktarlarda birikerek, bölgede yaşayan hedef dışı canlılara zarar verebilmektedirler (Kappock et al., 2005; Konstantinou and Albanis, 2004). Bu nedenlerle diuron ve Irgarol 1051 Avrupa'da birçok ülkede yasaklanmıştır (Dupraz et al., 2018). Piritiyon bileşikleri (bakır piritiyon ve çinko piritiyon) geniş bir antimikrobiyel etkinliğe sahiptir. Bakterisit, fungusit ve algasit olarak etki gösterirler. Piritiyon'un metallere yaptığı tüm tuzlar benzer şekilde etki göstermektedir (Kappock et al., 2005). Diklofluanid, çinko piritiyon, ziram ve zineb gibi bileşikler esasen fungusit özelliktedir ve çok çeşitli organizmalara karşı etki gösterebilmektedir (Voulvoulis et al., 1999). Klorothalonil, mitokondriyel kalsiyum dengesini bozmakta, immunsupresyonu ve oksidatif stresi ciddi derecede artırarak apoptoza sebebiyet vermektedir (Qian et al., 2013). TBT yasağını takiben kullanılmaya başlanan bazı yardımcı biyosidal maddelerin hedef dışı canlılara olan zararı ve çevredeki yüksek kalıcılıkları tespit edilmiş, diuron ve Irgarol 1051 başta olmak üzere birçok maddenin kullanımı kontrol altına alınmıştır. Örneğin, İngiltere'de birçok yardımcı biyosidal madde incelenmiş, diklofluanid, DCOIT, çinko piritiyon ve zineb haricindeki maddelerin kullanımı kısıtlanmış ya da yasaklanmıştır (Dafforn et al., 2011; Thomas, 2009).

Kekamoz önleyici biyosidal maddeler, tekne ve gemilerin toplu olarak bulunduğu liman ve marina gibi alanlarda ya da sıkça tercih edilen güzergâhlarda birikerek yüksek konsantrasyonlara ulaşabilirler (Abreu et al., 2020; Koning et al., 2020; Muller-Karanossos et al., 2020; Thomas et al., 2000). Belirtilen ortamlarda karışım halinde bulunan bu maddeler, birbirleri ile toksikodinamik etkileşimlere girerek çevredeki canlılara tehlike saçabilmektedir (Fernández-Alba et al., 2002; Kousaftis and Aoyama, 2007; Soroldoni et al., 2017; Wang et al., 2011). Gemicilik alanında daha etkili ve daha ekonomik kekamoz önleyici sistemlere olan ihtiyaç oldukça fazladır. Ancak ekolojik dengenin korunması için kekamoz önleyici bileşiklerin kullanıma sunulmadan önce toksisite testlerinin tamamlanması, hedef dışı canlılardaki etkilerinin belirlenmesi gereklidir (Chen et al., 2010; Karlsson et al., 2004). Bu anlamda büyük önem taşıyan toksisite testleri, temel olarak *in vitro* toksisite testleri ile başlamaktadır. *In vitro* toksisite testleri ile kimyasal maddelerin hücresel düzeydeki toksik etki mekanizmaları aydınlatılmaktadır. Çok sayıda kimyasal madde bu testler aracılığıyla eş zamanlı olarak değerlendirilip birbirleri ile

olan etkileşimleri incelenebilmektedir (Meriç vd., 2008; Park et al., 2019; Tokur ve Aksoy, 2017).

Bu tez çalışmasının amacı, kekamoz önleyici boyalarda yardımcı biyosidal madde olarak kullanılan üç farklı bileşiğin (DCOIT, diklofluanid ve zineb) hücresel düzeyde sitotoksik etkilerinin incelenmesi; hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkilerinin karşılaştırılması; bileşiklerin karma halde bulduklarında oluşabilecek toksikodinamik etkileşimlerin ortaya çıkarılmasıdır. Böylece, elde edilecek veriler ışığında, bilimsel literatürde bileşiklere ait mevcut toksikolojik bilgilerin artırılması amaçlanmıştır.

### **2.3. Araştırmada İncelenen Biyosidal Maddeler ve Kimyasal Özellikleri**

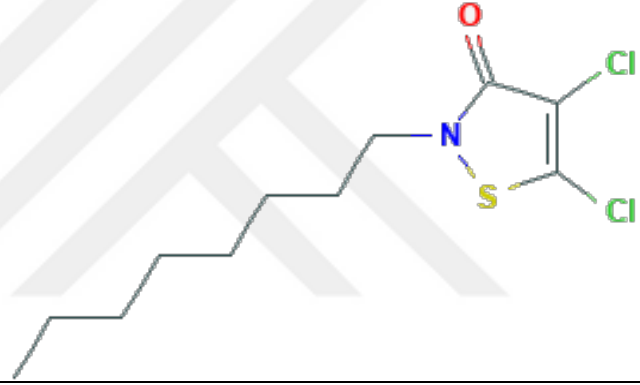
#### **2.3.1. DCOIT**

DCOIT (ticari adıyla Sea-Nine 211™), hücre içinde tiyol grupları ile bağ yapıp tiyol içeren enzimleri inhibe eden ve protein sentezini inhibe eden bir bileşiktir (CPA, 2010; Leuret et al., 2009). Deniz suyunda kısa sürede biyotik olarak yıkımlanabilmekte ve yarılanma ömrünün 24 saatten az olduğu belirtilmektedir. Bu özelliği ile EPA tarafından Yeşil Kimya ödülü verilmesine rağmen (EPA, 1996) İngiltere, Fransa, İsveç, Hollanda'da 25 metreden kısa teknelerde kullanımı yasaklanmıştır (Price and Readman, 2013). DCOIT bileşiğinin kimyasal özellikleri Tablo 2.4.'te belirtilmiştir.

Tablo 2.4. DCOIT bileşigi kimyasal özellikleri

		Kaynak
<b>Adı</b>	DCOIT	
<b>Kimyasal adı</b>	4,5-dichloro-2-octyl-1,2-thiazol-3-one	
<b>Kimyasal Formülü</b>	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NOS	(O'Neil, 2013)
<b>Cas Numarası</b>	64359-81-5	(PubChem, 2020b)
<b>Molekül ağırlığı</b>	282.23 g/mol	
<b>Erime Noktası</b>	40-46 °C	
<b>Kaynama Noktası</b>	300 °C'de dekompozison gerçekleşiyor*	

**Kimyasal Yapısı**  
(2 boyutlu)

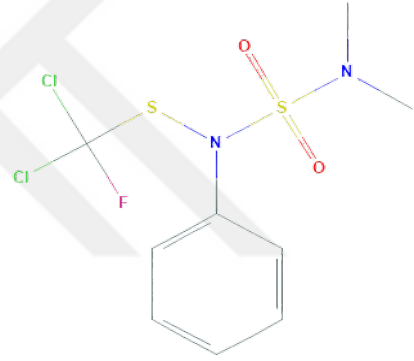


\* Bileşigin kaynama noktası 300 °C üzerindedir ancak belirtilen sıcaklıkta dekompozite olması nedeniyle kaynama noktası tam olarak hesaplanamamıştır.

### 2.3.2. Diklofluanid

Diklofluanid fungusit özellikte bir sülfamid bileşigidir (PubChem, 2019). Tiyol içeren enzimleri inhibe edip mitokondrilerden Ca<sup>+2</sup> salıverilmesine yol açmaktadır. Ayrıca alglerde bulunan ve düşük CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında dahi etkin fotosentez yapılmasını sağlayan karbondioksit konsantrasyon mekanizmasını bozmaktadır. Böylece dolaylı yoldan fotosentezi engellediği öne sürülmektedir (Johansson et al., 2012). Diklofluanid bileşiginin kimyasal özellikleri Tablo 2.5.'te belirtilmiştir.

Tablo 2.5. Diklofluanid bileşiği kimyasal özellikleri

		Kaynak
<b>Bileşik Adı</b>	Diklofluanid	
<b>Kimyasal adı</b>	N-[dichloro(fluoro)methyl]sulfanyl-N-(dimethylsulfamoyl)aniline	
<b>Kimyasal Formülü</b>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
<b>Cas Numarası</b>	1085-98-9	(PubChem, 2020a)
<b>Molekül ağırlığı</b>	333.2 g/mol	
<b>Erime Noktası</b>	106 °C	
<b>Kaynama Noktası</b>	Dekompozisyon*	
<b>Kimyasal Yapısı (2 boyutlu)</b>		

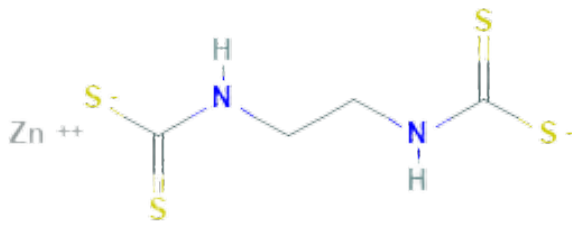
\* Bileşik yüksek sıcaklıklarda dekompoze olduğu için belirlenememiştir.

### 2.3.3. Zineb

Zineb, tarımsal fungusit olarak kullanılan bir bileşiktir. ABD ve AB tarafından tarımsal amaçlı kullanımı kısıtlanarak günümüzde kekamoz önleyici boyalarda yardımcı biyosidal madde olarak kullanımına izin verilmiştir (ECHA, 2019; PubChem, 2020c). Kekamoza neden olan organizmalarda, tiyol gruplarına (tiyol içeren enzim ve proteinlere) bağlanarak genel bir etki gösterdiği belirtilmektedir (ECHA, 2013; Soloneski et al., 2015). Hunter and Evans (1990), *Amphora coffeaeformis* türü alglerde, toksik konsantrasyonda uygulanan zineb'in 2 saate kadar respirasyon ve fotosentez aktivitesini, 5 saate kadar ise alglerin büyümesini etkilemediğini tespit etmiştir. Hunter and Evans (1990) ise belirtilen sürenin, zineb bileşiminin parçalanma ürünleri olan 5,6-dihydro-3H-imidazo (2,1-c)-1,2,4-dithiazole-3-thione (DIDT) ve ethylene diisothiocyanate (EDI) oluşumu için gerekli zaman olarak belirtmiş ve toksik etkilerin bu metabolitler aracılığıyla gerçekleştiğine

işaret etmiştir. Zineb bileşiği deniz suyunda öncelikle hidroliz ile yıkımlanmaktadır. Yarılanma ömrü pH 7’de ortalama 96 saat, pH 8’de ise ortalama 17 gün olarak tespit edilmiştir (Hellio and Yebra, 2009; PubChem, 2020c). Zineb bileşiğinin kimyasal özellikleri Tablo 2.6.’da belirtilmiştir.

Tablo 2.6. Zineb bileşiği kimyasal özellikleri

		Kaynak
<b>Bileşik Adı</b>	Zineb	
<b>Kimyasal adı</b>	Zinc ethylenebisthiocarbamate	
<b>Kimyasal Formülü</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Zn	
<b>Cas Numarası</b>	9006-42-2	(PubChem, 2020c)
<b>Molekül ağırlığı</b>	275.8	(IARC, 2020)
<b>Erime Noktası</b>	157 °C (dekompozisyon)	
<b>Kaynama Noktası</b>	Dekompozisyon*	
<b>IARC Grubu</b>	3	
<b>Kimyasal Yapısı (2 boyutlu)</b>		

\* Bileşik yüksek sıcaklıklarda dekompoze olduğu için belirlenmemiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Standart Maddeler

Tablo 3.1. Kullanılan standart maddeler

Adı	Özelliği
<b>Zineb, “Zinc ammoniate ethylenebisdithiocarbamate-polyethylenethiuram disulfide”</b>	Sigma-Aldrich, 45707, Cas No: 12122-67-7, %98,2 saflıkta Almanya
<b>DCOIT “4,5-dichloro-2-octyl-1,2-thiazol-3-one”</b>	Sigma-Aldrich, CDS003259, Cas No: 64359-81-5, %99,8 saflıkta Almanya
<b>Dichlofluanid “N-Dichlorofluoromethylthio-N',N'-dimethyl-N-phenylsulfamide”</b>	Sigma-Aldrich, 45433, Cas No: 1085-98-9, %99,8 saflıkta, Almanya

## 3.2. Kullanılan Cihaz, Malzeme ve Kimyasal Maddeler

### 3.2.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Bilgisi ve Model Numarası
Biyogüvenlik Kabini	Nüve, MN 120, Türkiye
Buzdolabı	Bosch, KGN57V / 20N, Almanya
Canlı Hücre Analiz ve Görüntüleme Sistemi	Nano Entek, Julı-BR, Güney Kore
Çalkalayıcı	Velp Scientifica, Zx3 Vortex, İtalya
Çoklu Çalkalayıcı	Jeio Tech, VM – 96B, Güney Kore
Derin Dondurucu - 80 °C	Nüve, DF 490, Türkiye
Derin Dondurucu -18° C	Profilo, DF 3200, Türkiye
Hassas Terazı	Shimadzu, AUW 220 D, Japonya
Invert Mikroskop	Zeiss, Axio, Almanya
İnkübatör	Nüve, EN 500, Türkiye
Mikropipet	Isolab, Almanya
Mikroskop	Zeiss, Primo Star, Almanya
Otoklav	Nüve, OT 40L, Türkiye
Şarjlı Pipet Pompası	Isolab, Almanya
Santrifüj	Nüve, NF 415, Türkiye
Soğutmalı Santrifüj	Nüve, NF 800 R, Türkiye
Mikroplaka Okuyucu	Rayto, RT-6000, Çin
Su Banyosu	Nüve, NB 20, Türkiye
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, SIMPLICITY 185, Almanya
Ultrasonik Banyo	Daihan, Wise Clean/WUC-A03H, Güney Kore

### 3.2.2. Kullanılan Sarf ve Cam Malzemeler

Tablo 3.3. Kullanılan sarf ve cam malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Üretici Bilgisi
Beher (50 mL)	Isolab, Almanya
Cam tüp (10, 20 mL)	Isolab, Almanya
Flask (75 cm <sup>2</sup> hücre büyütme alanı, steril)	Corning, ABD
Kriyoviyal (1,5 mL, steril)	Isolab, Almanya
Mezür	Isolab, Almanya
Mikroplala (96 kuyucuklu, steril)	Corning, ABD
Parafilm (100 mm genişlik)	Isolab, Almanya
Pipet Uçları (10, 100, 1000 µL, steril)	Isolab, Almanya
Pipetleme Rezervuarı (30 mL, steril)	Isolab, Almanya
Plaka (6 kuyucuklu, steril)	Corning, ABD
Santrifüj Tüpü (1,5 mL)	Axygen, Meksika
Santrifüj Tüpü (15 mL, steril)	Labsolute, Almanya
Santrifüj Tüpü (50 mL, steril)	Labsolute, Almanya
Serolojik Pipet (2, 5, 10, 25 mL hacimli, steril)	Clearline, Biosigma, İtalya
Spatül (makro ve mikro kaşıklı)	Isolab, Almanya
Şırınga (10 mL)	Ayset, Türkiye
Thoma Lamı	Isolab, Almanya

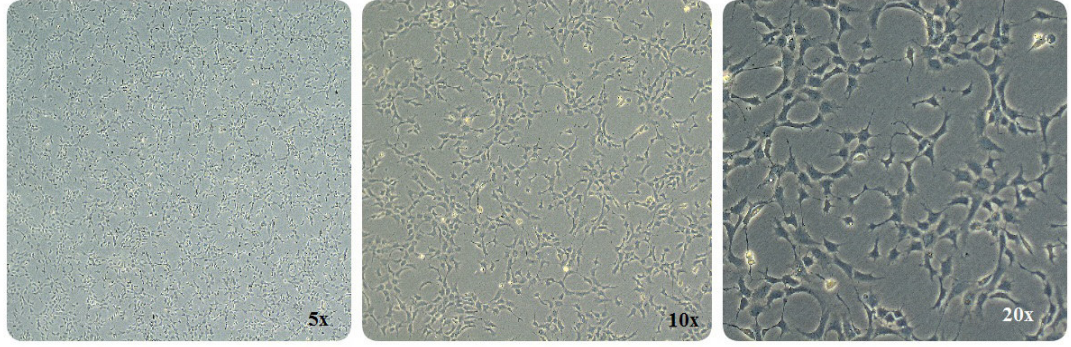
### 3.2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Bilgisi ve Ürün Numarası
Amfoterisin B	Gibco, ABD 5290026
Dimetil-Sülfoksit	Merck, Almanya 1.16743.1000, saflık >%99
Fötal Dana Serumu	Gibco, ABD 10270-106
Hepes Buffer	Biological Industries, ABD 03-025-1B
Hücre Sayım Kiti (Sitotoksosite Kiti, WST-8)	Sigma, Almanya Cell Counting Kit-8, 96992
Leibovitz's L-15 Hücre Vasatı	Gibco, ABD 11415-049
L-glutamin	Gibco, ABD 25030-024
MEM-Eagle Esansiyel Olmayan Amino Asitler	Biological Industries, ABD 01-340-1B
Penisilin-Streptomisin	Gibco, ABD 15140-122
Sodyum Pirüvat	Biological Industries, ABD 03-042-1B
Tripan Mavisi	Biological Industries, ABD 03-102-1B
Tripsin-EDTA	Gibco, ABD 25200-056

### 3.3. Kullanılan Hücre Hattı ve Kültür Metodu

*Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) hücre hattı, sazan çiçeği hastalığının etiolojisini araştıran Fijan ve Sulimanovic adlı araştırmacılar tarafından Yugoslavya'da 1969 yılında oluşturulmuştur. *Cyprinus carpio* (sazan) türü bir balığın, herpes virüs nedeniyle derisinde oluşan hiperplastik bir lezyondan köken alan EPC, epitelyal morfolojide (Şekil 3.1.), adherent özellikte bir devamlı hücre hattıdır (Fijan et al., 1983).



Şekil 3.1. EPC hücreleri mikroskobik görüntüleri

1970 ve 1980’li yıllarda Avrupa ve ABD’ye transfer edilen EPC hücre hattının sekans analizinde, hücrelerin *Pimephales promelas* (yassı kafalı golyan balığı, fathead minnow) kökenli FHM hücre hattı ile kontamine olduğu anlaşılmıştır (Winton et al., 2010). Bu nedenle hücre hattı koleksiyonlarında *Pimephales promelas* orjinli olduğu belirtilmektedir. EPC hücreleri, poikilotermik hücreler olması dolayısıyla geniş bir sıcaklık aralığında (7.5-33 °C) yaşamını sürdürebilmektedir. 30 °C’de ortalama olarak iki günde bir bölünme gerçekleştirmektedir (Fijan et al., 1983). Virolojik çalışmalar başta olmak üzere, gen ekspresyon çalışmaları ve *in vitro* toksisite çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Elia et al., 2018; Jos et al., 2009; Seo et al., 2014; Winton et al., 2010). Tez çalışmasında kullanılan EPC hücre hattı (pasaj no:59) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Virolojisi Anabilim Dalı hücre koleksiyonundan sağlandı.

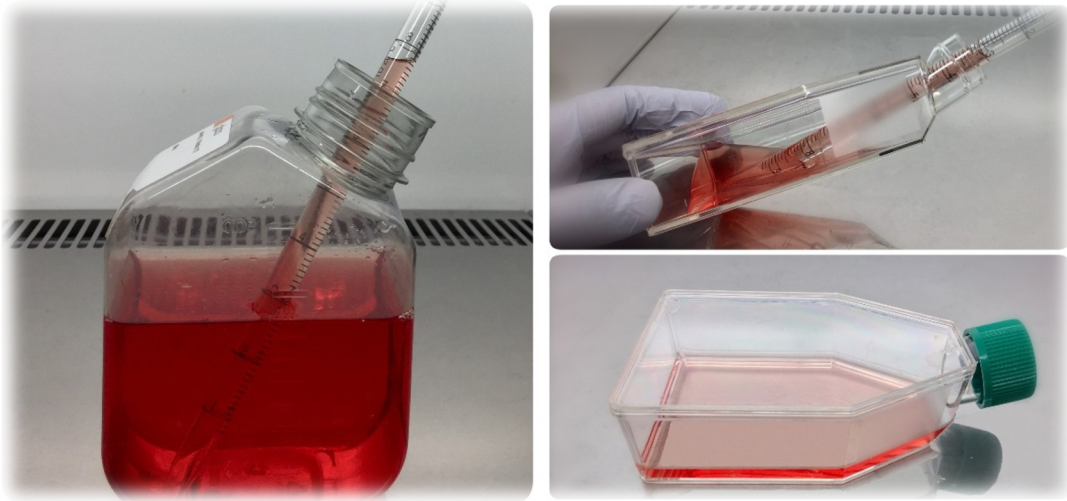
American Type Culture Collection (ATCC, 2016a) tarafından EPC hücre hattının kültüre edilmesi için önerilen Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM), pH’nın CO<sub>2</sub> ile dengelendiği sistemlerde kullanılmaktadır. CO<sub>2</sub> kullanılmayan kültür atmosferinde ise pH dengesini sağlamak üzere Leibovitz’s L-15 vasatı formülize edilmiştir (ATCC, 2016b). Çalışmada kullanılan EPC hücreleri, CO<sub>2</sub> içermeyen kültür atmosferinde, Leibovitz’s L-15 hücre vasatı kullanılarak 25 °C’de inkübe edildi. L-15 vasatına % 10 fetal dana serumu, % 1 sodyum pirüvat, % 1 esansiyel olmayan amino asitler, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 amfoterisin, % 1 L-glutamine, % 1 HEPES buffer eklenerek hücre vasatı tamamlandı.

### 3.3.1. Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma İşlemleri

Hücrelerin çözdürülmesi, pasajlanması ve dondurulması ile ilgili tüm işlemler Peters (2004) tarafından belirtilen protokollere uygun şekilde biyogüvenlik kabini içerisinde steril şartlarda gerçekleştirildi.

Donmuş halde gelen hücre stoğunun çözündürülmesi amacıyla öncelikle hücre kültürü flaskı içerisine, uygun miktarda L-15 vasatından eklendi. Kriyoviyal, derin dondurucudan çıkarılarak su banyosunda (25 °C) hızlı bir şekilde çözündürüldü. Kriyoviyal içerisindeki buz katmanı eridiği anda su banyosundan çıkarıldı ve dış yüzeyi % 70 etanol ile dekontamine edildi. Kriyoviyal içeriği, ilk adımda hazırlanan flask içerisine aktarıldı, pipetleme yapılarak hücrelerin homojen biçimde dağılması sağlandı. Daha sonra inkübatör içerisinde 25 °C’de inkübe edildi. Yirmi dört saat sonra hücreler adhezyon yönünden kontrol edilerek vasat değişikliği yapıldı ve çözündürme işlemi tamamlandı.

Ortalama olarak % 90 konfluense ulaşan hücrelerin pasajlanması amacıyla flask içerisindeki vasat boşaltıldı, hücre yüzeyleri PBS ile yıkanarak debris ve artık maddeler uzaklaştırıldı. Hücrelerin flask tabanından ayrılması için Tripsin-EDTA (% 0,25) solüsyonu eklenerek birkaç dakika inkübe edildi. Daha sonra bir miktar vasat eklenerek pipetleme yapıldı ve flask tabanından ayrılan hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı. Karışım aspire edilerek santrifüj tüpüne alındı, 500 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, dipte çökelmiş hücre peleti üzerine vasat eklendi. Bu karışım 1:6 oranında bölünerek yeni bir flaska aktarıldı ve üzerine vasat ilave edildi (Şekil 3.2.).

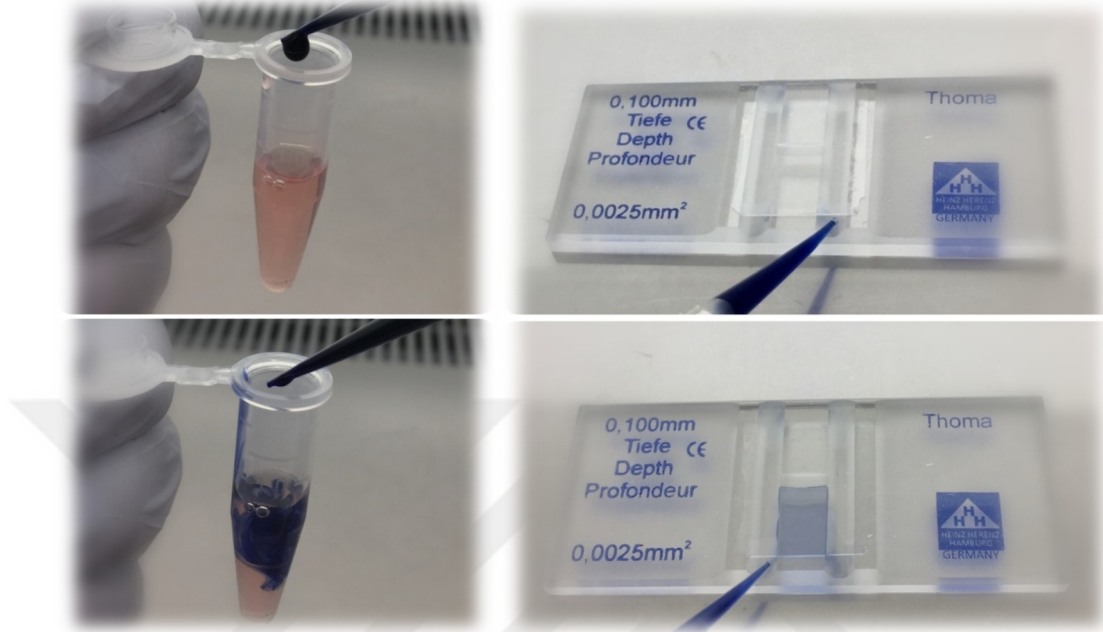


Şekil 3.2. Hücre vasatı eklenmesi

Pipetleme yapılarak hücrelerin flask tabanına homojen olarak yayılması sağlandı, hücreler 25 °C’de inkübe edilerek pasajlama işlemi tamamlandı.

Hücrelerin dondurulması amacıyla % 50 hücre vasatı, % 40 fetal dana serumu, % 10 dimetil sülfoksit içeren dondurma vasatı hazırlandı. Hücreler pasajlama

işleminde yapılan şekilde flask tabanından ayrılarak santrifüj edildi. Hücre peleti 10 mL vasat ile sulandırılarak thoma lamı ile canlı/ölü/toplam hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Tripan mavisi ile hücre sayımı

Tripan mavisi ile hücre sayımında hücre süspansiyonu ve tripan mavisi karışımı thoma lamına aktarılarak, 16 büyük karedeki ortalama hücre sayısı hesaplandı. Dilüsyon faktörleri (2 ve  $10^4$ ) ile çarpılarak toplam hücre sayısı hesaplandı (Abcam, 2019).

Sayım sonrası hücreler, 1.000.000 hücre/100  $\mu$ l vasat olacak biçimde dilüe edildi. Kriyoviyal içerisine, 100  $\mu$ l hücre-vasat karışımı (1.000.000 hücre) ve 900  $\mu$ l dondurma vasatından eklendi. Kriyoviyal 2 saat süre ile  $-20$   $^{\circ}$ C derin dondurucuda bekletildi, daha sonra  $-80$   $^{\circ}$ C derin dondurucuya (Şekil 3.4.) konularak dondurma işlemi tamamlandı.

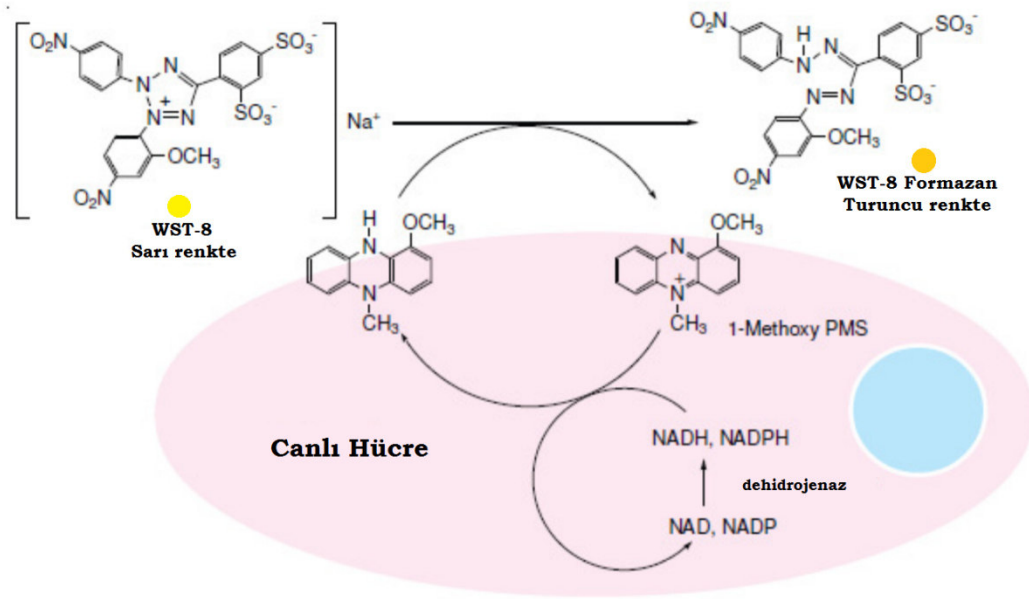


Şekil 3.4. -80 derin dondurucu ve kriyoviyaller

### 3.4. Sitotoksosite Testi

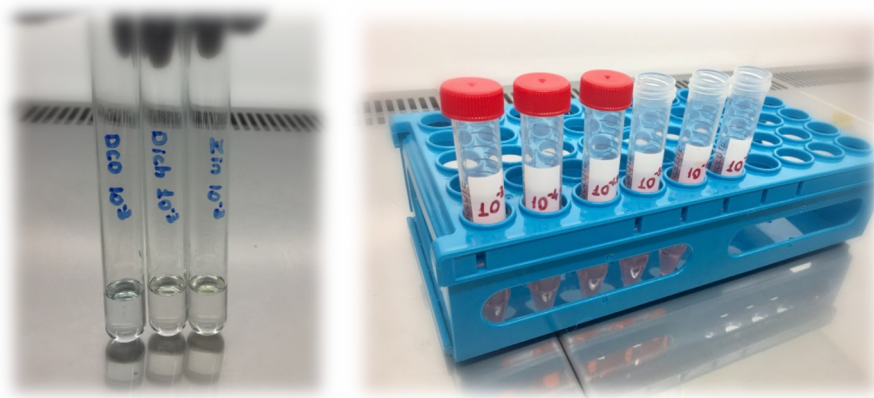
Sitotoksosite testi kolorimetrik ayırım prensibine göre gerçekleştirildi. Sitotoksosite testi için kullanılan CCK-8 (Cell Counting Kit – 8, Sigma, 96992) içeriğinde WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu] tetrazolyum tuzu ve elektron taşıyıcı ara molekül olarak 1-metoksifenazın metosülfat (1-Metoksi PMS) bulunmaktadır. Test prensibine göre; WST-8 bileşiği polar karakteri nedeniyle hücre içine giremez. 1-Methoxy PMS ise hücreye girebilir ve canlı hücrede bulunan dehidrojenaz enzimi aktivitesi sonucu H<sup>+</sup> kazanarak indirgenir. Daha sonra hücreden çıkarak hidrojenini WST-8'e aktarır ve WST-8'in indirgenmesini sağlar. İndirgenen WST-8 (formazan) açık sarı renkten turuncu renge dönüşür (Şekil 3.5.) ve canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak turuncu renk koyulaşır (Şekil 3.9.). Daha sonra Mikroplaka Okuyucu ile 450 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapılır. Böylece canlı/ölü hücre ayırımı gerçekleştirilerek test edilen maddelerin sitotoksik konsantrasyonları hesaplanabilir. WST-8 polar yapıda olması nedeniyle, başka bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin aksine suda çözünebilir, ayrıca kendisi gibi polar yapıda olan XTT, MTS, WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha hassas sonuç vermektedir

(Chamchoy et al., 2019; Sigma-Aldrich, 2019).



Şekil 3.5. WST-8 Formazan dönüşümü (Sigma-Aldrich, 2019)'den Türkçe'ye çevrilerek uyarlanmıştır

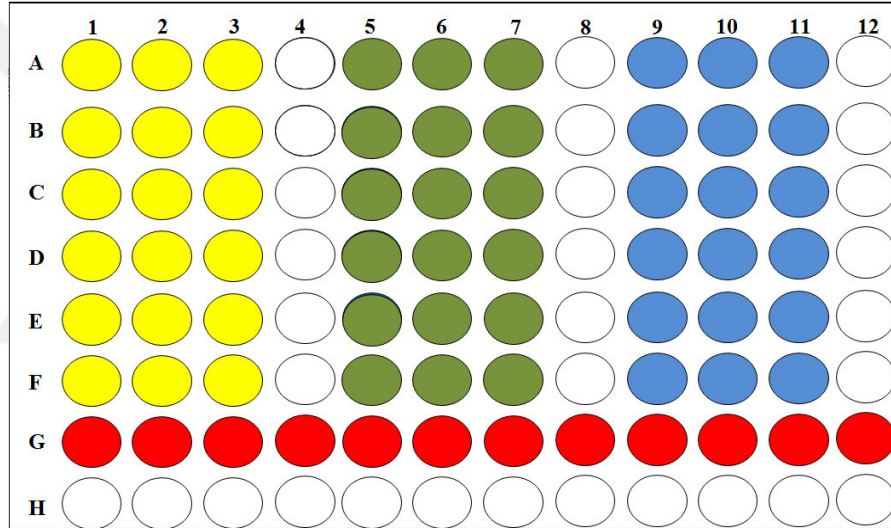
Test edilecek maddelerin stok konsantrasyonları steril dimetil sülfoksit (DMSO) ile laminer biyogüvenlik kabini içerisinde steril şartlarda hazırlandı. Test edilecek konsantrasyonlar,  $10^{-2}$  ile  $10^{-10}$  molar arasındaki konsantrasyonlar ile yapılan pilot deneme sonucunda belirlendi. Daha sonra stok konsantrasyon ( $10^{-2}$  M) hücre vasatı ile dilüe edilerek altı farklı alt konsantrasyon ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4}/2$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  molar) hazırlandı (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Stok ve alt dilüsyonların hazırlanması

Bileşiklerin bireysel (DCOIT, diklofluanid, zineb), ikili (DCOIT + diklofluanid, DCOIT + zineb, diklofluanid + zineb) ve üçlü (DCOIT + diklofluanid +

zineb) kombinasyonları test edildi. DCOIT, diklofluanid ve zineb bireysel halde  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-4}/2$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda, çözücü olarak kullanılan DMSO % 0,1 oranında uygulandı. Ayrıca aditif, sinerjist ya da antagonist etkileşimlerin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizlerde, ikili kombinasyonlarda her bir konsantrasyon değeri ikiye bölünerek (örn;  $10^{-3}$  M zineb + diklofluanid kombinasyonunda,  $10^{-3}/2$  M zineb ve  $10^{-3}/2$  M diklofluanid olarak); üçlü kombinasyonda ise üçe bölünerek uygulandı. Uygulama öncesinde hücrelerin içinde olduğu vasat tamamen kaldırılarak incelenen madde/maddeleri içeren 100 µL vasat eklendi. Test 96 kuyucuklu steril hücre kültürü mikrolakasında, 24 ve 96 saat olmak üzere iki farklı maruziyet periyodunda gerçekleştirildi. Örnek plaka dizaynı Şekil 3.7.'de gösterilmiştir.

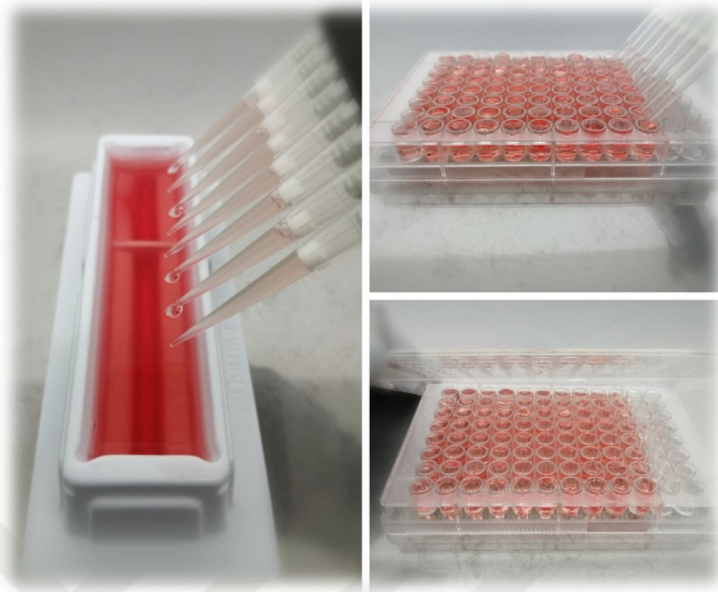


Şekil 3.7. Örnek 96 kuyucuklu mikrolaka dizaynı

Şekil 3.7.'deki plaka dizaynında renksiz kuyucuklar haricindeki tüm kuyucuklarda eşit sayıda hücre ve vasat bulunmaktadır. Plakada 1,2 ve 3 numaralı sütunlar (sarı renkli) DCOIT, 5,6 ve 7 (yeşil renkli) diklofluanid, 9,10 ve 11 (mavi renkli) numaralı sütunlar zineb bileşiğinin analizi amacıyla kullanıldı. Bileşikler A satırından F satırına kadar artan konsantrasyonlarda uygulandı. G satırı (kırmızı renkli) kontrol olarak kullanıldı (blank "G1-G2", %0,1 DMSO içeren "G3-G4-G5-G6, sadece hücre+vasat içeren G7-G8-G9-G10-G11).

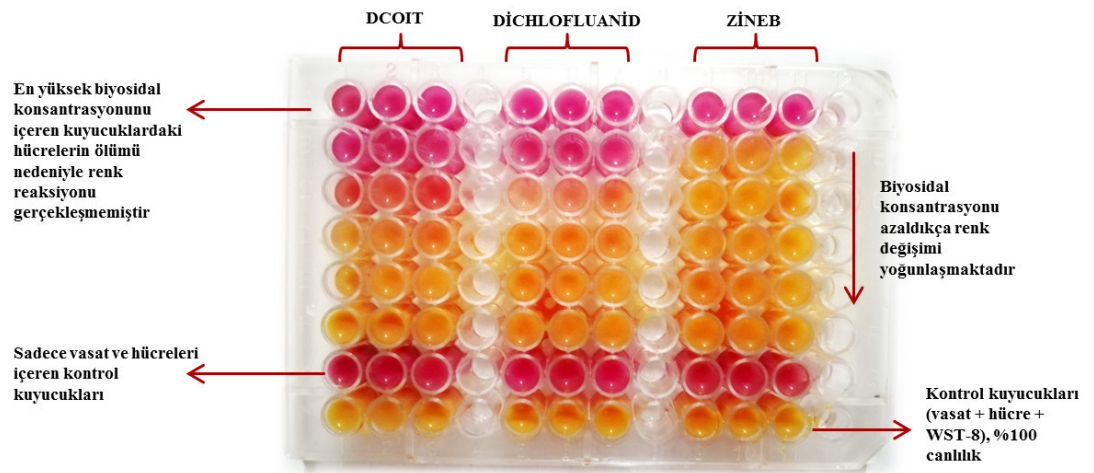
Testin gerçekleştirileceği kuyucuklara 100 µL vasat içerisinde  $3 \times 10^4$  adet hücre eklendi ve plaka 25° C'de inkübe edildi. 24 saat sonra tüm kuyucuklardaki hücrelerin homojen dağılımı kontrol edildi. Kuyucuklardaki vasat uzaklaştırılarak

farklı konsantrasyonlarda test maddelerini içeren test vasatı (100 µL) eklendi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Mikroplaka kuyucuklarında vasat değişimi

Maruziyet periyodu sonunda test vasatı uzaklaştırılarak taze vasat eklendi (100 µL) ve hücreler 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası testin gerçekleştirildiği her kuyucuğa CCK-8 hücre sayım kiti eklenerek (10 µL) 1-4 saat arası inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresince 1-2-3 ve 4. saatlerde Mikroplaka Okuyucu ile 450 nanometre dalga boyunda absorban ölçümleri yapıldı. Formazan oluşumu değerlendirilerek en uygun inkübasyon süresinin 3 saat olduğu belirlendi. Örnek sitotoksosite testi sonucu Şekil 3.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Örnek sitotoksosite testi sonucu

% 50 inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) belirlenmesi amacıyla aşağıdaki formülden yararlanılarak canlılık ve ölüm yüzdeleri hesaplandı (Absorbans değeri “abs.” olarak kısaltılmıştır).

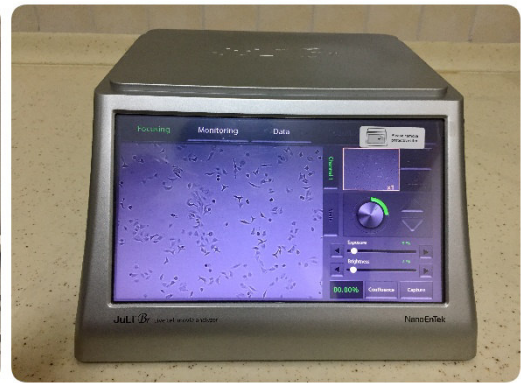
$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Seçilen Kuyucuğun Abs. Değeri}}{\text{Kılavuz Kuyucuğun Abs. Değeri}} \times 100$$

$$\% \text{ Ölüm} = \frac{\text{Kılavuz Kuyucuğun Abs. Değeri} - \text{Seçilen Kuyucuğun Abs. Değeri}}{\text{Kılavuz Kuyucuğun Abs. Değeri}} \times 100$$

### 3.5. Proliferasyon Testi

Proliferasyon testi, hücrelerin belirli zaman aralığında proliferasyon oranlarını ölçerek gerçekleştirilen bir in vitro test çeşididir. Bu testte, biyosidal bileşiklerin IC<sub>10</sub> konsantrasyonları kullanıldı. Böylece çok düşük konsantrasyonda bulunan bileşiklerin, hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlandı. Proliferasyon testi için seçilen konsantrasyonlar (IC<sub>10</sub>), sitotoksikite testleri ile belirlendi.

Testin gerçekleştirilmesi amacıyla öncelikle 6 kuyucuklu mikrolakada seçilen bir kuyucuğa 1,5 mL vasat içerisinde 1x10<sup>6</sup> adet hücre konularak 48 saat inkübe edildi (ortalama olarak 48 saatlik süre sonrası hücreler logaritmik üreme fazına geçmektedir). İnkübasyon sonrası vasat değişimi yapıldı ve DCOIT + diklofluanid, DCOIT + zineb, diklofluanid + zineb, DCOIT + diklofluanid + zineb kombinasyonlarını içeren test vasatları ayrı ayrı denemelerde olmak üzere IC<sub>10</sub> konsantrasyon değerinde, 1.5 mL vasat içerisinde uygulandı. JULI-BR canlı hücre görüntüleme sistemine yerleştirilen plaka üzerinde ortalama % 40 konfluens içeren ve hücrelerin homojen olarak dağıldığı bir bölge seçildi. Daha sonra cihaz 2 dakikada 1 fotoğraf kaydedecek şekilde programlanarak 96 saatlik maruziyet periyodu başlatıldı.



Şekil 3.10. Canlı hücre görüntüleme cihazı

Maruziyet periyodu süresince cihazın görüntüleme bölmesi inkübatör içinde, ekran ve kayıt ekipmanı ise inkübatör dışında konumlandırıldı (Şekil 3.10.). Böylece hücreler sıcaklık değişimden etkilenmeden, 25 °C sabit sıcaklıkta inkübe edildi. Maruziyet süresince vasat değişimi yapılmadı. 96 saatlik maruziyet periyodu sonunda, başlangıç ve son konfluens değerleri elde edildi.

### 3.6. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Statistics 22.0 paket programı kullanıldı. Probit-regresyon analizi ile her bir bileşik ve bileşik kombinasyonu için IC<sub>50</sub> (IC<sub>1</sub>-IC<sub>99</sub>) değerleri hesaplandı. Veriler 24 ve 96 saatlik, bireysel ve kombinasyon şeklinde gruplandırılarak, ayrı ayrı olmak üzere kendi içerisinde analiz edildi. Sayısal değişkenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenlere ait varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi; Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilerek Bonferroni düzeltilmeli çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

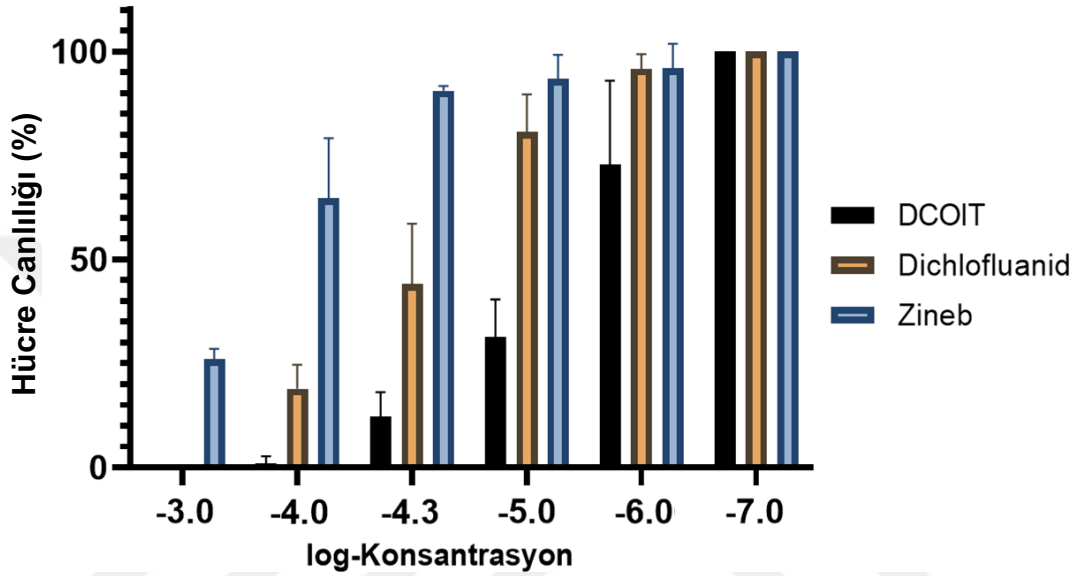
Bileşiklerin aditif, antagonist ve sinerjistik etkileşimler yönünden değerlendirilmesi amacıyla CompuSyn® Software (ComboSyn INC) programı kullanıldı. Ayrıca % ölüm – konsantrasyon, % canlılık – konsantrasyon grafiklerinin oluşturulması amacıyla Graphpad Prism 8 programından faydalanıldı.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sitotoksisite Testi

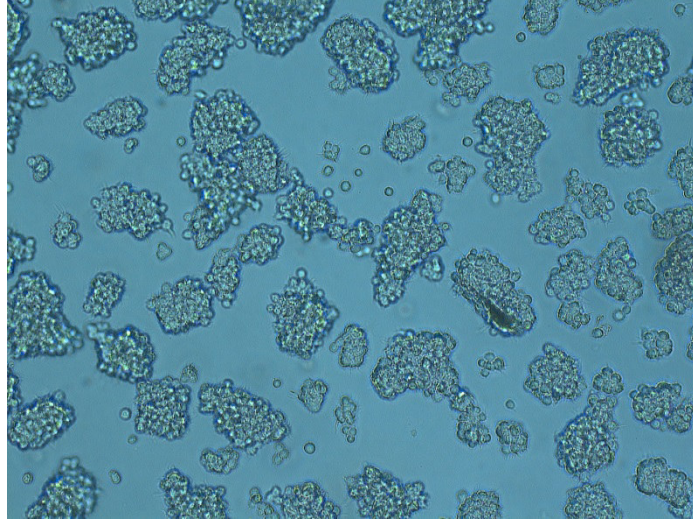
Sitotoksisite testleri, bir maddenin hücresel düzeydeki biyolojik davranışının anlaşılması ve temel toksisite düzeyinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen prelinik testlerdir. Antioksidan maddelerin ve ilaç adaylarının değerlendirilmesi, kimyasal maddelerin tehlike düzeyinin saptanması gibi çok çeşitli alanlarda temel bilgi sunan bu testler, *in vivo* denemeler için gerekli deney hayvanı sayısının da dolaylı yoldan azaltılmasına katkıda bulunurlar. Fizikokimyasal ve fizyolojik çevrenin kontrol edilebilmesi sayesinde sitotoksisite testlerinin tekrarlanabilirlik oranı da oldukça yüksektir (Flores et al., 2016; OECD, 2015; Specian et al., 2016). Bu çalışmada incelenen diklofluanid ve zineb bileşikleri zira mücadelede fungusit olarak kullanılmaktadır. DCOIT ise sadece kekamoz önleyici amaçla kullanılan bir bileşiktir. TBT, Irgarol, diuron gibi güçlü maddelerin yasaklanması nedeniyle gemicilik endüstrisinde etkili ve ekonomik kekamoz önleyici bileşiklere büyük bir ihtiyaç doğmuştur. Bu durum, DCOIT (Sea Nine 211), diklofluanid, zineb, tiram, diuron, ziram, maneb vb. birçok yardımcı biyosidal maddenin kekamoza karşı kullanılmasını sağlamıştır. İlgili bileşikler, başta fotosentetik türler olmak üzere kekamoza neden olan canlıları yok ederek kekamozu önlemede önemli derecede başarı göstermiştir. Ancak bu bileşiklerin etki alanının karadan suya geçişi ile birlikte çevresel açıdan yeni problemler ortaya çıkmıştır (Evans et al., 2000). Doğada, TBT ya da diklorodifeniltrikloretan (DDT) örneklerinde olduğu gibi kalıcı bir yıkıma sebep olmadan önce, ilgili bileşiklere dair su ve sediment yarılanma ömrü, aerobik ve anerobik yıkımlanma ürünleri, biyoakümülyasyon, hedef dışı toksisite, endokrinolojik sistem başta olmak üzere vücut sistemlerine etkileri, kronik maruziyet sonucu oluşabilecek etkiler, subletal etkiler gibi belirlenmesi gereken çok sayıda parametre bulunmaktadır. Belirtilen parametrelere dair çok sayıda çalışma gerek sahada, gerek model organizmalar kullanılarak laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmektedir. Tez çalışmasında model olarak kullanılan *Epithelioma Papulosum Cyprini* hücre hattı, *Pimephales promelas* türü bir balık derisinde bulunan hiperplastik lezyonlardan elde edilmiş, 15-33 °C arasında çoğalabilen, epitelyal morfolojide hücrelerdir (ATCC, 2016a; Fijan et al., 1983). Daha çok virolojik çalışmalarda kullanılan EPC hücreleri, sitotoksisite çalışmalarında da sıkça tercih edilmeye başlanmıştır (Pehlivan vd.,

2018; Shuilleabhain et al., 2004; Tan vd., 2008). Balık kökenli olması ve deniz suyu sıcaklığına yakın sıcaklıktaki üreme şartları, ilgili hücre hattının özellikle akuatik kirleticilerin klinik öncesi analizleri için uygun olmasını sağlamaktadır. Tez çalışmasında gerçekleştirilen 24 saatlik (akut) ve 96 saatlik (kronik) sitotoksosite testleri ile elde edilen veriler sonucunda, incelenen bileşiklerin toksisite potansiyellerini karşılaştırmak mümkün olmuştur (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. 96 saatlik sitotoksosite testi log-konsantrasyon - hücre canlılığı grafiği

Analizler neticesinde DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Biyosidal maddelerin yüksek konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardaki hücreler çoğunlukla plaka tabanından ayrılarak ölmüş (Şekil 4.2.) ve bu nedenle formazan oluşturamamıştır. Ancak bazı kuyucuklarda hücrelerin plaka tabanına bağlı bulunmalarına rağmen formazan oluşturamadığı, bu durumun hücrenin yaşamsal olarak önemli enzimlerinin inhibe olması ve metabolik aktivitesinin sınırlanmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Bu nedenle sitotoksosite testi sonuçlarının letal konsantrasyon (LC) yerine inhibitör konsantrasyon (IC) olarak aktarılması uygun görülmüştür. Ancak aynı ya da benzer testleri kullanan birçok çalışmada, LC teriminin kullanıldığı tespit edilmiş, bu durumda anlam birliği oluşturmak için bazı tablolarda tez sonuçları LC terimi ile aktarılmıştır.



Şekil 4.2. Ölü EPC hücreleri mikroskop görüntüsü (20x)

Bileşiklerin bireysel, ikili ve üçlü kombinasyonlarına ait 24 ve 96 saatlik sitotoksosite testleri sonucu probit-regresyon analizi ile elde edilen  $IC_{50}$  değerleri Tablo 4.1.'de yer almaktadır.

Tablo 4.1. DCOIT, diklofluanid ve zineb bileşiklerinin  $IC_{50}$  değerleri (mg/L)

	Maruziyet Periyodu	
	$IC_{50}$ (24 saat)	$IC_{50}$ (96 saat)
<i>Bireysel</i>		
<b>DCOIT</b>	1,03 mg/L	0,89 mg/L
<b>Diklofluanid</b>	6,24 mg/L	8,44 mg/L
<b>Zineb</b>	52,43 mg/L	89,24 mg/L
<i>Kombinasyon</i>		
<b>DCOIT + Diklofluanid</b>	-	0,46 mg/L – 0,54 mg/L
<b>DCOIT + Zineb</b>	-	1,34 mg/L – 1,31 mg/L
<b>Diklofluanid + Zineb</b>	-	12,72 mg/L – 10,53 mg/L
<b>DCOIT + Diklofluanid + Zineb</b>	-	1,30 mg/L – 1,53 mg/L – 1,27 mg/L

#### 4.1.1. DCOIT

DCOIT, Rohm&Haas şirketi tarafından kekamoz önleyici amaçla geliştirilen ve “Sea Nine 211” ticari adıyla piyasaya sürülen bir maddedir (Amara et al., 2018). Doğada hızla yıkımlanması nedeniyle, çevresel zarara yol açma riski düşük bir bileşik olarak nitelendirilir (Chen and Lam, 2017). Yarılanma ömrü birkaç saat ile 2 hafta arasında olan DCOIT, özellikle mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak yıkımlanmaktadır. Sudaki pH değeri ve tuzluluk oranı, sıcaklık, mevsim, güneş ışığı varlığı gibi çok sayıda parametre yarılanma ömrüne direkt etki göstermekte ve farklı çalışmalarda tespit edilen varyatif değerler bu farklılardan ileri gelmektedir. Ancak TBT, Irgarol 1051 gibi çok daha kalıcı bileşiklere kıyasla DCOIT’in yarılanma ömrünün çok daha kısa olması, çevresel toksisite riskini azaltmaktadır (Chen and Lam, 2017; Goetz, 2019; Hellio and Yebra, 2009). Buna rağmen, çeşitli çalışmalarda DCOIT bileşiğinin toksik etki şiddetinin Irgarol 1051 ve diuron gibi bileşiklere kıyasla aynı ya da daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Moon et al., 2019).

Elektrofilik bir bileşik olan DCOIT, hücre membranından diffüze olup tiyol taşıyan enzim ve proteinlere ya da glutasyon (GSH) gibi küçük biyomoleküllere zarar vermektedir (Arning et al., 2009). GSH, elektron donörü olarak görev yapan önemli bir antioksidan ve detoksifiye edici bileşiktir. DCOIT tarafından oksidize edilerek glutasyon disülfid’e (GS<sub>2</sub>G) çevrilmekte ve bu nedenle hücrenin reaktif oksijen bileşiklerine karşı savunma gücü zayıflamaktadır (Cima et al., 2001). Buna ek olarak, Saitoh et al. (2015) tarafından DCOIT’in katalaz aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiş ve oksidatif stres indüklenen hücrelerde DCOIT’in sinerjistik etki ile ölüm oranını artırdığı, aynı durumun TBT varlığında gözlenmediği belirtilmiştir. DCOIT, sinir sistemi hücrelerinde hücre içi kalsiyum depolarına etki ederek nöronal aktarım için gerekli minimum potansiyeli düşürmekte ve bu nedenle nörotoksisiteye yol açabilmektedir (Wakita et al., 2017). Ayrıca, mitokondride süksinat dehidrojenaz enzimini baskılayarak ATP üretimini inhibe ettiği gösterilmiş (Bragadin et al., 2005) ve benzer mekanizma ile fotosentez işlemini durdurabileceği belirtilmiştir. DCOIT maruziyeti (508 µg/L) neticesinde kahverengi alglerin (*Saccharina latissima*) oksijen üretiminin kademeli olarak azaldığı ve birkaç saat içerisinde belirgin derecede inhibisyon (%77) olduğu tespit edilmiştir. Ancak DCOIT maruziyeti sonlandırıldıktan sonra fotosentez aktivitesinin zamanla yükselerek normal değerlere ulaştığı bildirilmiştir (Johansson et al., 2012). DCOIT bileşiğinin çoğunlukla mikromolar konsantrasyonda olmak üzere, farklı maruziyet periyotlarında (birkaç

saat-birkaç hafta) gerçekleştirilen çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* toksisite çalışması mevcuttur. Bu çalışmaların birçoğu, DCOIT bileşiğinin toksik etki mekanizmasından ziyade toksik etkinin ortaya çıktığı konsantrasyonları belirlemek üzere gerçekleştirilmiştir. Eom et al. (2019), *Perinereis aibuhitensis* türü deniz halkalı solucanlarında 24 saat, 96 saat ve 14 günlük DCOIT bileşiği LC<sub>50</sub> değerlerini sırasıyla 268 µg/L, 142 µg/L ve 55 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Su et al. (2019), beyaz pasifik karideslerinde (*Litopenaeus vannamei*) 28 gün (kronik) DCOIT maruziyeti sonucu, 15 µg/L konsantrasyonda toksik etkilerin görülmeye başlandığını tespit ederken 30 µg/L ve üzeri konsantrasyonda, karideslerin yaşamlarını sürdüremediklerini belirtmiştir. Ayrıca, özellikle 30 µg/L DCOIT'e maruz kalanlar başta olmak üzere bazı karideslerin solungaçlarında melanin birikimi saptandığı belirtilmiştir. Solungaçlar, su canlılarının en önemli organlarından biridir ve solungaç anatomisindeki bozukluklar, canlının fizyolojisindeki değişiklikleri beraberinde getirmektedir (Ramaglia et al., 2018). Bu nedenle özellikle solungaç morfoloji ve histolojisinde oluşan bozukluklar çevresel toksisite riskine işaret edebilmektedir (Su et al., 2019). Subletal konsantrasyonlarda ise, DCOIT'in lipit peroksidasyon, oksidatif stres ve kolinerjik sistemde asetilkolin esteraz inhibisyonuna neden olarak toksisite gösterdiği bilinmektedir (Do et al., 2018; Eom et al., 2019). Ayrıca hipotalamus ve hipofize etki ederek testosteron ve östradiol hormonları konsantrasyonunda artışa (Chen et al., 2016); G proteinine bağlı reseptörlerin  $\alpha$  alt ünitesine bağlanarak aktivasyonun engellenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Chen et al., 2017). DCOIT bileşiği ile çok sayıda farklı canlı ve hücre kültürü toksisite çalışmaları sonucu elde edilen EC<sub>50</sub> ve LC<sub>50</sub> değerleri Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Çeşitli çalışmalarda hesaplanan DCOIT LC<sub>50</sub> değerleri

Canlı Türü/Hücre Hattı	Maruziyet Süresi	Konsantrasyon	Kaynak
<i>Tigriopus japonicus</i>	24 saat	LC <sub>50</sub> : 23 µg/L	(Onduka et al., 2013)
<i>Crassostrea gigas</i>	24 saat	LC <sub>50</sub> : 17 µg/L	(Tsunemasa and Okamura, 2011)
<i>Penaeus japonicus</i>	96 saat	LC <sub>50</sub> : 12,6 µg/L	(Yamada, 2006)
<i>Pagrus major</i>	96 saat	LC <sub>50</sub> : 5,1 µg/L	(Mochida et al., 2010)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	96 saat	LC <sub>50</sub> : 4,7 µg/L	
<i>Perinereis aibuhitensis</i>	24 saat	LC <sub>50</sub> : 286 µg/L	(Eom et al., 2019)
<i>Neomysis awatschensis</i>	96 saat	LC <sub>50</sub> : 6,09 µg/L (genç) LC <sub>50</sub> : 11,27 µg/L (yetişkin)	(Do et al., 2018)
<i>Botryllus schlosseri</i>	60 dakika	LC <sub>50</sub> : 7,05 mg/L	(Cima et al., 2008)
<i>Acartia tonsa</i>	48 saat	LC <sub>50</sub> : 16,08 µg/L	(Wendt et al., 2016)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	72 saat	EC <sub>50</sub> : 0.003 mg/L <sup>a</sup>	(Fernández-Alba et al., 2002)
<i>Daphnia magna</i>	48 saat	EC <sub>50</sub> : 0.004 mg/L <sup>b</sup>	
<i>Vibrio fischeri</i>	15 dk	EC <sub>50</sub> : 0.012 mg/L <sup>c</sup>	
<i>Sebastes schlegeli</i>	96 saat	LC <sub>50</sub> : 184 µg/L	(Park et al., 2006)
<i>Monosorophium acherusicum</i>		LC <sub>50</sub> : 49 µg/L	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	48 saat	LC <sub>50</sub> : 107,2 µg/L	(Arning et al., 2009)
<i>Vibrio fischeri</i>		LC <sub>50</sub> : 121,3 µg/L	
HEPG2 hücre hattı		LC <sub>50</sub> : 4,51 mg/L	
EPC hücre hattı	24 saat	LC <sub>50</sub> : 1,03 mg/L*	Bu çalışmada elde edilen sonuç
	96 saat	LC <sub>50</sub> : 0,89 mg/L*	

\* Çalışmada belirlenen IC<sub>50</sub> değeri, diğer çalışmalarla karşılaştırabilmek amacıyla LC<sub>50</sub> olarak aktarılmıştır

<sup>a</sup> Kontrol grubuna oranla proliferasyonda %50 azalma

<sup>b</sup> Kontrol grubuna oranla motilite ve yüzme aktivitesinde %50 azalma

<sup>c</sup> Kontrol grubuna oranla hücresel metabolizmada %50 azalma

Arning et al. (2009), 48 saat boyunca DCOIT'e maruz bıraktıkları yeşil alglerde (*Scenedesmus vacuolatus*) 0.38 µM EC<sub>50</sub>, bakterilerde (*Vibrio fischeri*) 0.43 µM EC<sub>50</sub>, HEPG2 hücrelerinde 16 µM EC<sub>50</sub> değerlerini saptamışlardır. Tez çalışmasında elde edilen sitotoksik konsantrasyon (1,03 mg/L) ve Arning et al. (2009) tarafından HEPG2 hücrelerinde elde edilen sitotoksik konsantrasyon (4.51 mg/L) birbirine yakındır. Ancak DCOIT'in *in vivo* denemelerde belirlenen LC<sub>50</sub>

konsantrasyonları 4-5 µg/L'den 300 µg/L değerine kadar ulaşırken; hücre kültürü denemeleri ile arasında ortalama olarak 10 kattan fazla fark bulunmaktadır. *In vivo* çalışmalar ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları arasında, sistem çeşitliliği, ortam şartları, metabolizma, fizyolojik ve biyokimyasal etkileşim gibi çok sayıda temel fark bulunmaktadır. Bu farklar neticesinde, toksisitesi incelenen madde için model olarak belirlenen hücre hattı, deney hayvanlarına göre daha duyarlı ya da daha az duyarlı olabilmektedir. Bunun yanı sıra farklı hücre hatları arasında aynı kimyasal ajana karşı verilen cevap da değişebilmektedir (Holovská et al., 2007). Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* doz çevrimi ile ilgili bazı kaynaklarda çeşitli öneriler yer almasına karşın bu çevrimin bilimsel literatürde henüz mümkün görülmediği bildirilmektedir (Ekwall et al., 1990; ICCVAM, 2001). Fonseca et al. (2020), kahverengi midyeleri (*Perna perna*) 0.1 µg/L ve 10 µg/L olarak iki farklı konsantrasyonda 96 saat boyunca DCOIT'e maruz bıraktıkları çalışmada, mortalite gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ancak her iki konsantrasyonda da *in vivo* toplam hemosit sayısı ve *in vitro* hemosit canlılığında düşüş saptandığı belirtmişlerdir. Saitoh et al. (2015), hidrojen peroksit ile oksidatif stres indükledikleri hücrelerde DCOIT toksisitesinin arttığını belirterek bu durumu DCOIT'in katalaz enzimi aktivitesini inhibe etmesi ile ilişkilendirmişlerdir. Aynı şartlarda uygulanan TBT'nin ise oksidatif stresle sinerjistik bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında 24 saatlik maruziyet periyodu sonucunda DCOIT'in IC<sub>50</sub> değeri 1,03 mg/L olarak belirlenmiştir. 96 saatlik maruziyet periyodu sonucunda ise toksisite artarak 0,89 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu anlamda DCOIT'in EPC hücreleri üzerinde yol açtığı toksisitenin, şiddeti zamanla artan nitelikte olduğu görülmektedir. Hücrelerde hücre zarı bütünlüğünün bozulması, lizozom ya da mitokondrinin hasar görmesi gibi nedenler genellikle hücrelerin kısa sürede ölmesine neden olur (Ganjam et al., 2019; Van Houten et al., 2016; Wang et al., 2018). Ancak ribozomun zarar görmesi (protein sentezinin engellenmesi) veya enerji metabolizmasının bozulması, oksidatif stres, enzimatik aktivitenin aksaması gibi etkilere bağlı hücre ölümü ise genellikle daha uzun sürede gerçekleşir (Gabe et al., 2020; Saitoh et al., 2015; Su et al., 2018). Bu nedenle toksik etkisi zamanla artan DCOIT'in, EPC hücrelerine belirtilen mekanizmalarla etki ettiği düşünülmüştür. WST-8 testi sitotoksosite testi olarak anılmasına rağmen çalışma prensibi olarak hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmektedir (Chamchoy et al., 2019; Xie et al., 2018). DCOIT'in ilk 24 saatte EPC hücreleri üzerinde oluşturduğu akut toksik

etkiler, birçok hücrenin ölümüne ya da metabolizmasının durmasına yol açmış ve formazan dönüşümü sınırlanmıştır. 96 saatlik DCOIT maruziyetinde ise, ilk 24 saatte metabolik faaliyetlerini koruyabilen hücrelerin bir kısmı daha işlevini kaybetmiştir. Bu nedenle, deniz suyunda yarılanma ömrü 24 saatten az olarak belirtilen DCOIT'in (Figueiredo et al., 2020), kültür ortamında kimyasal yapısını daha uzun süre koruduğu düşünülmüştür.

#### 4.1.2. Diklofluanid

Diklofluanid (N-dichlorofluoromethylthio-N',N'-dimethyl-N-phenylsulfamide) kekamoz önleyici yardımcı biyosidal madde olarak kullanımının yanı sıra zirai mücadelede fungusit olarak kullanılmaktadır (Amara et al., 2018; Vaquero-Fernández et al., 2009). Gün ışığı altında yarılanma ömrü (fotodegradasyon) deniz suyunda 53, nehir suyunda 59 ve göl suyunda 83 saat olarak bildirilmiştir (Sakkas et al., 2001). Hidrolitik veya biyolojik yarılanma ömrünün ise deniz suyunda 1.2 ila 3 saat arasında olduğu belirtilmiştir. Diklofluanid yıkımlandığında kendisine göre çok daha stabil ve nispeten daha az toksik bir metabolitine (N-dimetil-N-fenil-sülfamid, DMSA) dönüşmektedir (Hamwijk et al., 2005). Oldukça hızlı yıkımlanması nedeniyle suda yapılan kalıntı çalışmalarında genellikle tespit edilememekte, DMSA tespit edilmesi ise diklofluanid varlığına işaret etmektedir (Schouten et al., 2005; Thomas and Brooks, 2010).

Heil et al. (1991), tarafından yapılan *in vitro* analizlerde diklofluanid'in genotoksik ve insanlar için muhtemel karsinojenik etkilere sahip olabileceği tespit edilmiştir. Ancak Avrupa Kimyasallar Ajansı (ECHA) tarafından yapılan *in vivo* denemeler bu durumun aksine işaret etmektedir. Tekrarlanan oral uygulamalar sonrası fare ve ratlarda en belirgin etki olarak florozis gözlenmiş ve bu bozukluğun LOAEL değeri olarak sırayla 50,1 ve 9,4 mg/kg/gün tespit edilmiştir. Florozis, diklofluanid'in metabolizması sırasında açığa çıkan florür ile ilişkilendirilmiş ve ilerleyen süreçte osteosklerozis'e yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca diklofluanid nedeniyle köpeklerde kronik nöropati şekillenmiş ancak kaynağı tam olarak tespit edilememiştir. Bunun haricinde fertilitite ile ilgili, üreme organlarında ya da endokrin sistemde diklofluanid'in yol açtığı önemli bir bozukluk saptanmamış, *in vivo* olarak genotoksik etki gözlenmediği belirtilmiştir (ECHA, 2016).

Oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROS), çoklu doymamış yağ asitlerine ve hücre zarındaki lipitlere zarar vererek lipid peroksidasyona neden olmaktadır (Ito et al., 2019). ROS oluşumu ve oksidatif stres

diklofluanid'in toksik etki mekanizmalarından biri olarak bilinmektedir. Suzuki et al. (2004) tarafından, diklofluanid'in izole rat hepatositlerinde 250 – 1000 µM dozda, lipit peroksidasyon belirteci olan fosfatidilkolin hidroperoksit seviyesini 20 kata kadar artırdığı bildirilmiştir. Bir yeşil alg türü olan *Chlamydomonas reinhardtii*'nin 10 µM'a kadar diklofluanid maruziyeti sonucu, 24 saatte ROS üretiminde artış gözlenmediği ve dolayısıyla diklofluanid'in oksidatif strese ve tespit edilebilir toksisiteye yol açmadığı bildirilmiştir (Almeida et al., 2017; de Almeida et al., 2017). Tez çalışmasında elde edilen 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri (6,24 mg/L) ortalama olarak 18 mikromolara karşılık gelmekte ve bu konsantrasyonda test edilen hücrelerin yarısının ölümüne yol açmaktadır. Diklofluanid toksisitesi ilgili çalışmalar model organizmaların farkı gözetilmeksizin değerlendirildiğinde, diklofluanid'in hücresel düzeyde oksidatif stres meydana getirebilmesinin ancak belirli bir eşik konsantrasyonu aşması ile mümkün olduğu ortaya çıkmaktadır. Tez çalışmasında diklofluanid'in 24 ve 96 saatlik IC<sub>50</sub> değerlerinin birbirine yakın bulunması, ilgili bileşiğin enzim inhibisyonu ya da protein sentezinin engellenmesi gibi spesifik ve şiddeti maruziyet süresi ile artacak bir etkiden çok, oksidatif stres gibi akut-genel bir etki ile toksisiteye yol açtığına işaret etmektedir. Organizmanın ve dolayısıyla hücrelerin metabolik kapasitesi de toksikokinetik ve toksikodinamik değişimleri beraberinde getirmektedir. Bununla ilgili olarak Suzuki et al. (2004), diklofluanid'in CYP-450 enzimleri tarafından aktif metabolitlerine dönüştürüldüğünü ileri sürmüş hücrelere nonselektif CYP-450 inhibitörü verildiğinde diklofluanid'in yol açtığı sitotoksitenin azaldığını belirlemişlerdir. Diklofluanid bileşiği ile çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* toksisite çalışmaları sonucu elde edilen EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> ve IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 4.3.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Çeşitli çalışmalarda ve tez çalışmasında hesaplanan Diklofluanid LC<sub>50</sub> değerleri

Canlı Türü/Hücre Hattı	Maruziyet Süresi	Konsantrasyon	Kaynak
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (yeşil alg)	24 saat	EC <sub>50</sub> : 25,3 µg/L <sup>a</sup>	(de Almeida et al., 2017)
	48 saat	EC <sub>50</sub> : 31,9 µg/L <sup>a</sup>	
	72 saat	EC <sub>50</sub> : 37,6 µg/L <sup>a</sup>	
<i>Vibrio fischeri</i> (bakteri)	15 dakika	EC <sub>50</sub> : 0,087 mg/L <sup>b</sup>	(Fernández-Alba et al., 2002)
<i>Daphnia magna</i> (su piresi)	48 saat	EC <sub>50</sub> : 1.05 mg/L <sup>b</sup>	
<i>Selenastrum capricornutum</i> (yeşil alg)	72 saat	LC <sub>50</sub> : 0.133 mg/L <sup>a</sup>	
<i>Nitzschia pungens</i> (fitoplankton, mikroalg)	96 saat	EC <sub>50</sub> : 377 µg/L <sup>a</sup>	(Jung et al., 2017)
<i>Artemia</i> larvaları (zooplankton, mikroalg)	48 saat	LC <sub>50</sub> : 154 mg/L	
<i>Mytilus edulis</i> (midye)	48 saat	EC <sub>50</sub> : 81 µg/L <sup>d</sup>	(Bellas, 2006)
<i>Paracentrotus lividus</i> (deniz kestanesi)	48 saat	EC <sub>50</sub> : 627 µg/L <sup>e</sup>	
<i>Ciona intestinalis</i>	48 saat	EC <sub>50</sub> : 128 µg/L <sup>f</sup>	
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	50 saat	EC <sub>50</sub> : 47,9 µg/L <sup>d</sup>	(Xu et al., 2011)
MBDK hücre hattı	72 saat	IC <sub>50</sub> : 44,9 mg/L	(Holovská et al., 2007)
RK13 hücre hattı		IC <sub>50</sub> : 9,1 mg/L	
PK15 hücre hattı		IC <sub>50</sub> : 102,9 mg/L	
BEPC hücre hattı		IC <sub>50</sub> : 49,2 mg/L	
3T3 hücre hattı	48 saat	LC <sub>50</sub> : 56,7 µg/L	(Bazes et al., 2006)
Vero hücre hattı		LC <sub>50</sub> : 56,7 µg/L	
EPC hücre hattı	24 saat	LC <sub>50</sub> : 6,24 mg/L*	Bu çalışmada elde edilen sonuç
	96 saat	LC <sub>50</sub> : 8,44 mg/L*	

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonunda % 50 azalma

<sup>b</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla hücre metabolizma faaliyetlerinde % 50 azalma

<sup>c</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla motilite ve hareket kabiliyetlerinde % 50 azalma

<sup>d</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla embriyonik gelişimde % 50 azalma

<sup>e</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla embriyonik gelişim ve larval büyümede % 50 azalma

<sup>f</sup> EC<sub>50</sub>: Kontrol grubuna oranla larval yerleşimde % 50 azalma

Tez çalışmasında diklofluanid'in 24 ve 96 saatlik maruziyet periyotları arasında IC<sub>50</sub> değerinin yükseldiği belirlenmiştir. Diklofluanid'in yarılanma ömrünün kısa olması, maruziyet periyodunun uzaması ile azalan toksisitesini açıklayan bir

etkendir. Benzer şekilde de Almeida et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, maruziyet zamanının uzaması ile birlikte diklofluanid toksisitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda diklofluanid'in esas etki mekanizması olan reaktif oksijen türlerinin artışı ile akut olarak hücrelerin metabolizmasına etki ettiği, ancak maruziyet süresi ilerledikçe hücrelerin enzimatik işlevleri ve antioksidan kapasitesini tekrar kazanması ile toksik etkinin zayıfladığı düşünülmüştür. Ayrıca, Fukunaga et al. (2015), primer rat timik lenfositlerine 1 µM ve 10 µM diklofluanid uygulamış ve 120 dakikalık sürede sitotoksikite gözlenmediğini belirtmiştir. 120 dakikalık maruziyet, perakut zehirliliği yüksek olan bileşiklerin etkilerini gözlemlemek için yeterli olabilir ancak diklofluanid gibi spesifik olmayan etki mekanizması ile toksisite gösteren bileşikler için oldukça yetersizdir. Pistl et al. (2003), merinos koyunu kanından izole ettikleri lökositleri *in vitro* ortamda  $10^{-1}$  M ile  $10^{-6}$  M arası konsantrasyonda diklofluanid'e maruz bırakmış, lenfositlerin mitojenik ve fagositik aktivitesinde  $10^{-3}$  M konsantrasyona kadar büyük bir düşüş saptayarak immun sistemi zayıflattıklarını bildirmişlerdir. Ancak diklofluanid'in perifer kanda  $10^{-3}$  M gibi oldukça yüksek bir değere ulaşması ve bu büyüklükte bir maruziyet olası görülmemektedir. P-glikoprotein (P-gp), akuatik canlılarda da bulunabilen ve hücre membranında küçük polipeptidlerden büyük moleküllere kadar çok sayıda maddeyi taşıyan transportör proteindir. Denizkestanesi (*Stronglyocentrotus intermedius*) embriyolarında, çeşitli bileşiklerin (bakır piritiyon, DCOIT, diklofluanid, tolifluanid) P-gp tarafından hücre dışına taşınma olasılığının araştırıldığı bir çalışmada, embriyo DCOIT veya diklofluanid'e maruz bırakılarak sitotoksikitesi değerlendirilmiş, verapamil (P-gp inhibitörü) eklenmesi ile sitotoksikitenin arttığı tespit edilerek belirtilen ajanların P-gp substratı olduğu bildirilmiştir. Verapamil varlığında ya da yokluğunda sitotoksik konsantrasyonları değişmeyen bakır piritiyon ve tolifluanid'in ise P-gp ile taşınmadığı saptanmıştır (Xu et al., 2011).

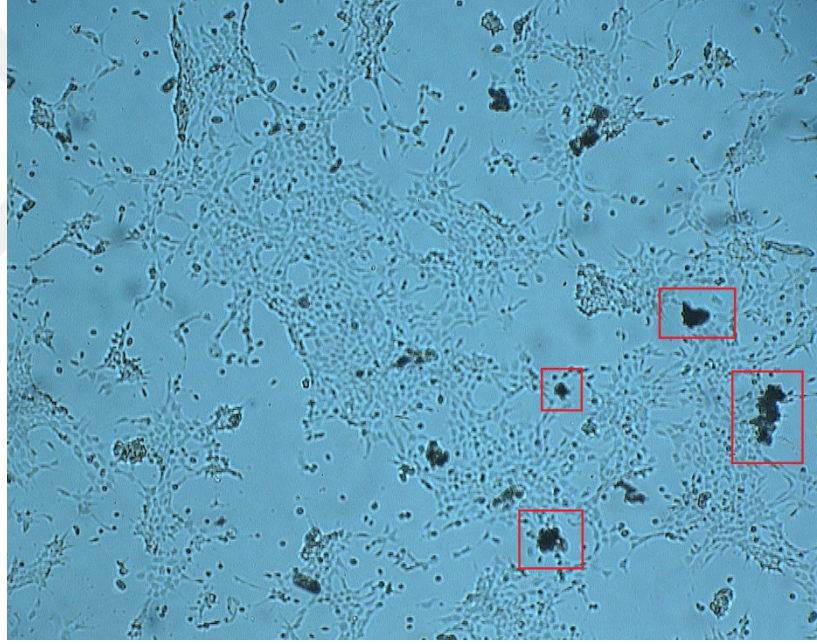
*In vivo* çalışmalarda diklofluanid'in hücre metabolizma faaliyetleri, fotosentez aktivitesi, motilite ve hareket kabiliyeti, larval büyüme ve yerleşim, embriyonik gelişim vb. birçok süreçte zararlı etkileri saptanmıştır. Bu etkiler genellikle mikromolar düzeyinde ortaya çıkarken *in vitro* hücre kültürü denemelerinde  $IC_{50}/LC_{50}$  değeri genellikle milimolar düzeyinde belirlenmiştir (Tablo 4.4.). *In vivo* denemelerde, toksik maddenin canlı tarafından alımı, emilimi, metabolize edilmesi, vücutta dağılımı ve spesifik bir organ/doku üzerinde etkisini göstermesi mümkün iken *in vitro* denemelerde bu gibi karmaşık mekanizmalar bulunmamaktadır.

Dolayısıyla örnek olarak; *in vivo* denemede nöroreseptör aracılı toksik etki gösteren bir madde, hücre kültüründe çok daha farklı bir mekanizma ile yüksek ya düşük konsantrasyonda toksisiteye yol açabilmektedir (OECD, 2010).

#### 4.1.3. Zineb

Zineb, zirai mücadelede fungusit olarak kullanılan bir maddedir. TBT yasağı sonrasında yardımcı biyosidal madde olarak kekamoz önleyici amaçla da kullanılmaya başlanmıştır. Ancak zirai amaçla kullanımı geçtiğimiz yıllarda ülkemiz de dâhil olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde ve ABD’de yasaklanmıştır. Diklofluanid ve DCOIT bileşiklerine nazaran, zineb’in akuatik toksisitesi ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışma sayısı çok daha azdır. *In vitro* hücrel toksisite çalışmaları ile ilgili olarak, zineb konsantrasyonlarının oldukça geniş ve farklı aralıklarda kullanıldığı, genel olarak oksidatif stres parametrelerinin incelendiği ve sonuçların değişken olduğu tespit edilmiştir. Soloneski et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada, insan B ve T lenfositlerinde 50 mg/L üzeri konsantrasyonda zineb maruziyeti neticesinde sitotoksosite görülmeye başlandığı belirtilirken; Hoffman and Hardej (2012), CCD-18Co, HT-29, Caco-2 hücrelerini 24 saat zineb’e maruz bırakmış, 800 µM’a (220,6 mg/L) kadar sitotoksosite gözlenmediğini ve canlılığın etkilenmediğini bildirmiştir. Ali et al. (2018), HaCaT hücrelerini 24 saat süresince 1-40 mg/L konsantrasyonlarda zineb’e maruz bırakmış, hücre canlılığın 10 mg/L konsantrasyondan itibaren önemli derecede azaldığını, 40 mg/L dozda ise %70'lere varan canlılık kaybı gerçekleştiğini; Kanemoto-Kataoka et al. (2015), primer rat lenfositlerinin 3 saat süre ile 3 µM (0,82 mg/L) konsantrasyonda zineb’e maruz bırakıldığında, hücre içi Zn<sup>+2</sup> miktarının arttığını ve bu nedenle hücrelerde apoptoz meydana geldiğini tespit etmiştir. Ali et al. (2018), benzer şekilde HaCaT hücrelerinde zineb maruziyeti nedeniyle apoptoz meydana geldiğini bildirmiştir. Grosicka-Maciąg et al., (2012; 2013) tarafından yapılan çalışmalarda 200 µM (55,1 mg/L) konsantrasyonda zineb’in, V79 hücreleri üzerinde oksidatif stres ve apoptoza yol açtığı, topoizomerez I ve katalaz aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, Jia and Misra (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada nöroblastoma (SH-SY5Y) hücrelerinin 16 saat boyunca 100 µM (27,5 mg/L) zineb maruziyeti sonrası morfolojik olarak homojenliklerini kaybettiği ve aksonlarının kısaldığı bildirilmiştir. Whalen et al. (2003), insan kanından saflaştırıldıkları natural killer (NK) hücrelerini 6 gün 10 µM (2,75 mg/L) zineb’e maruz bırakmış ancak hücrelerin canlılık değerlerinde azalma tespit etmemiştir. Aynı konsantrasyonda yapılan 24 ve 48 saatlik

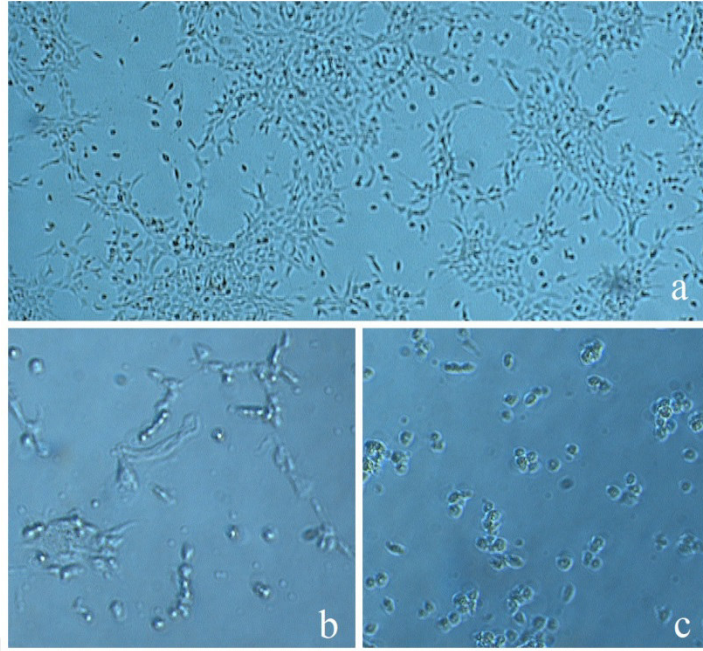
denemelerde zineb'in immunotoksik potansiyelini inceleyen araştırmacılar, NK hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik potansiyelinin zineb tarafından etkilenmediğini belirtmişlerdir. Karbamat grubunun diğer üyeleri olan maneb, metiram, ziram ve triazin herbisitlerinden atrazinin de değerlendirildiği çalışmada belirtilen yönlerde toksik potansiyeli en düşük olarak zineb tespit edilmiştir. Tez çalışmasında ise zineb'in 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 10<sup>-3,721</sup> M (52,43 mg/L), 96 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 10<sup>-3,490</sup> M (89,24 mg/L) olarak tespit edilmiştir. Zineb bileşiği polimerik yapısı nedeniyle DMSO, ksilen, metil izobütül keton, metil izoamil keton, 1-metoksi-3-propanol gibi organik çözücülerde ve suda 10 mg/L'nin altındaki miktarlarda çözünebilmektedir (Keith & Walters, 2019; PubChem, 2020c). Yapılan denemelerde zineb'in, hücre vasatında 10<sup>-3</sup> M üzeri konsantrasyonlarda bulunduğunda vasat ile homojen olarak karışmadığı görülmüştür (şekil 4.3.).



şekil 4.3. Zineb özünürlük sorunu

Zineb bileşiğinin log Kow değeri (su-oktanol partiyon katsayısı) 1.30 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle biyoakümülyasyon ya da biyokonsantrasyon gibi mekanizmalarla akuatik canlılarda birikme riski oldukça zayıftır (ECHA, 2013, 2014b). Aynı şekilde suda çözünürlüğü de çok zayıf olan zineb'in pasif difüzyon mekanizması ile hücre içine alınması olası görülmemektedir. Tez çalışmasında zineb için belirlenen IC<sub>50</sub> değerinin 50-90 mg/L gibi oldukça yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkması bu durum ile açıklanabilir. Bir maddenin, aktif transport dışındaki

yollarla hücre zarındaki lipit tabakasını geçebilmek için iyi derecede yağ ve bir miktar su çözünürlüğüne sahip olması gereklidir. Zineb bileşiği fizikokimyasal özellikleri nedeniyle hücre zarını yeterli derecede geçememekte ve ancak yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye yol açabilmektedir. Bu bağlamda Hoffman and Hardej (2012), üç farklı hücre hattında benzer sonuçlara ulaşarak zineb için 200 mg/L'ye kadar sitotoksite gözlenmediğini bildirmişlerdir. Kanemoto-Kataoka et al. (2015) ise primer lenfositler kullandıkları çalışmalarında çok daha düşük bir değer olan 0,82 mg/L'de apoptoz ve hücre ölümü gözlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmalar arasındaki bu fark ise hücrelerin orijini ile açıklanabilir (EPC/deri epitelyal, CCD-18Co/kolon fibroblastik, HT-29 ve Caco-2/kolon epitelyal hücrelerdir). Nitekim bazı lenfositlerin fagositoz yapabildiği ortaya konulmuştur (Li et al., 2006; Martínez-Riaño et al., 2018; Zhu et al., 2016). Bu nedenle zineb bileşiğinin lenfositlere pasif difüzyondan ziyade fagositoz gibi aktif yollarla alındığı ve böylece çok daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksiteye yol açabildiği söylenebilir. Ayrıca  $Zn^{+2}$ 'nin lenfositlerde hücre içi haberleşmede önemli bir iyon olarak kullanılması ve zineb maruziyeti neticesinde hücre içinde  $Zn^{+2}$  seviyesinde oluşan artış, buna ek olarak primer hücrelerin devamlı hücrelere nispeten toksik ajanlara karşı daha hassas oluşu sitotoksik etkiyi artıran diğer etkenler olarak sıralanabilir (Kanemoto-Kataoka et al., 2015). Jia and Misra (2007) tarafından yapılan çalışmada, zineb maruziyeti nedeniyle nöroblastoma hücrelerinde morfolojik bütünlüğün bozulduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde tez çalışmasında zineb maruziyeti neticesinde EPC hücrelerinde fibriler yapının bozularak bazı hücrelerin sirküler hale geldiği ve morfolojik yönden uniformitelerini kaybettikleri gözlenmiştir (Şekil 4.4.). Ancak morfolojik bozukluklar, toksik ajanlarla muamele edilen hücrelerde gözlenen genel değişimlerdir. Tez çalışmasında benzer morfolojik bozukluklar DCOIT ve diklofluanid maruziyetinde de gözlenmiştir.



Şekil 4.4. EPC hücrelerinde morfolojik bozukluklar. <sup>A</sup>Kontrol (10x), <sup>B</sup>Zineb grubu (40x), <sup>C</sup>Diklofluanid grubu (40x)

#### 4.1.4. Kombinasyon Sitotoksosite Testi

Literatür taramasında, DCOIT, diklofluanid ve zineb bileşikleri toksisitesinin birlikte değerlendirildiği tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Jung et al. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Nitzschia pungens* (mikroalg) türü fitoplanktonlarda 96 saatlik EC<sub>50</sub> değeri (hücre proliferasyonunda %50 azalma) DCOIT, diklofluanid ve zineb için sırasıyla 267, 377 ve 232 µg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Artemia* türü zooplankton larvalarında, 48 saatlik LC<sub>50</sub> değeri DCOIT, diklofluanid ve zineb için sırasıyla 0,31, 154,94, 41,17 mg/L'dir. İlgili çalışma sonucunda elde edilen toksisite sıralaması *Nitzschia pungens* için zineb > DCOIT > diklofluanid şeklinde iken *Artemia* larvaları için DCOIT > zineb > diklofluanid olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen verilerin gruplar arası istatistiksel analiz sonucu elde edilen değerler Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.'te yer almaktadır.

Tablo 4.4. Bileşiklerin gruplar arası karşılaştırılması (24 saat)

	Test İstatistiği	Std. Hata	Std. Test İstatistiği	Önemlilik (Sig.)	Düzeltilmiş önemlilik (adj Sig. <sup>a</sup> )
Diklofluanid (24 saat) DCOIT (24 saat)	-6,3	4,761	-1,323	0,186	0,557
DCOIT (24 saat) Zineb (24 saat)	-14,7	4,761	-3,088	0,002	<b>0,006*</b>
Diklofluanid (24 saat) Zineb (24 saat)	-8,4	4,761	-1,764	0,078	0,233

H<sub>0</sub>: Gruplar arasında hücre canlılığı açısından bir fark yoktur

Çoklu testler için önemlilik düzeyi (sig. değeri) belirlenirken Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır

Tablo 4.5. Bileşiklerin gruplar arası karşılaştırılması (96 saat)

	Test İstatistiği	Std. Hata	Std. Test İstatistiği	Önemlilik (Sig.)	Düzeltilmiş önemlilik (adj Sig. <sup>a</sup> )
Diklofluanid (96 saat) DCOIT (96 saat)	-7,8	4,789	-1,629	0,103	0,31
DCOIT (96 saat) Zineb (96 saat)	-18,4	4,789	-3,842	0,000	<b>0,000*</b>
Diklofluanid (96 saat) Zineb (96 saat)	-10,6	4,789	-2,214	0,027	0,081

H<sub>0</sub>: Gruplar arasında hücre canlılığı açısından bir fark yoktur

Çoklu testler için anlam düzeyi (sig. değeri) belirlenirken Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Tablo 4.4. ve 4.5.'te gösterildiği üzere 24 ve 96 saatlik sitotoksosite testleri sonucunda hücre canlılığı yönünden sadece DCOIT ve zineb grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Toksisite şiddeti ise IC<sub>50</sub> değerleri yönünden DCOIT > diklofluanid > zineb olarak sıralanmıştır. Bireysel toksisite sıralaması ile bileşiklerin etki güçlerinin anlaşılması mümkün olmakta ancak sucül ortamda bu bileşikler ve daha birçok ekotoksik ajan karışım halinde bulunmaktadır. Tam bir risk değerlendirmesinin yapılabilmesi ve toksik etkilerin aydınlatılabilmesi ancak bu ajanların karışım halindeki etkilerinin incelenmesi ile mümkün görünmektedir (de Almeida et al., 2017). Ayrıca, kekamoz önleyici bileşiklerin bireysel etkilerinin incelendiği çeşitli toksisite çalışmalarının sonuçları da birbiri ile uyum göstermemektedir. Farklı bileşiklerin alg, midye, denizkestanesi, su piresi gibi çeşitli akuatik canlılarda bireysel olarak incelendiği çok sayıda çalışmada, bileşiklerin meydana getirdiği toksisite şiddetleri sıralanmıştır. Myers et al. (2006),

diuron, DCOIT, TBT, çinko piriton ve zineb bileşiklerinin *Hormosira banksii* türü kahverengi makroalg sporlarının germinasyon ve büyüme üzerine 48 saatlik inhibe edici etkisini araştırmış; germinasyon ile ilgili EC<sub>50</sub> değerini sırasıyla 6.29, 0.34, 0.00016, 0.21, 0.87 mg/L, büyüme ile ilgili EC<sub>50</sub> değerini sırasıyla 6.75, 0.43, 0,00034, 0.31, 2.04 mg/L olarak tespit etmiştir. Çalışma sonucu elde edilen toksisite şiddeti sıralaması TBT > çinko piritiyon > DCOIT > zineb > diuron şeklindedir. Diğer bazı çalışmalarda;

- *Mytilus edulis* türü midyeler larvalarında embriyonik gelişim toksisitesi ile ilgili chlorothalonil > DCOIT > diklofluanid > Irgarol 1051 (Bellas, 2006);

- *Strongylocentrotus intermedius* türü denizkestanesi embriyolarında gelişim toksisitesi ile ilgili diklofluanid > DCOIT > bakır piritiyon (Xu et al., 2011);

- *Strongylocentrotus intermedius* türü denizkestanesi embriyolarında gelişim toksisitesi ile ilgili, bakır piritiyon > DCOIT > diklofluanid > Irgarol 1051 (Wang et al., 2011);

- *Selenastrum capricornotum* türü mikroalglerde büyüme inhibisyonu ile ilgili TBT = DCOIT > klorothalonil > Irgarol 1051 > diuron > diklofluanid > TCMTB (Fernández-Alba et al., 2002);

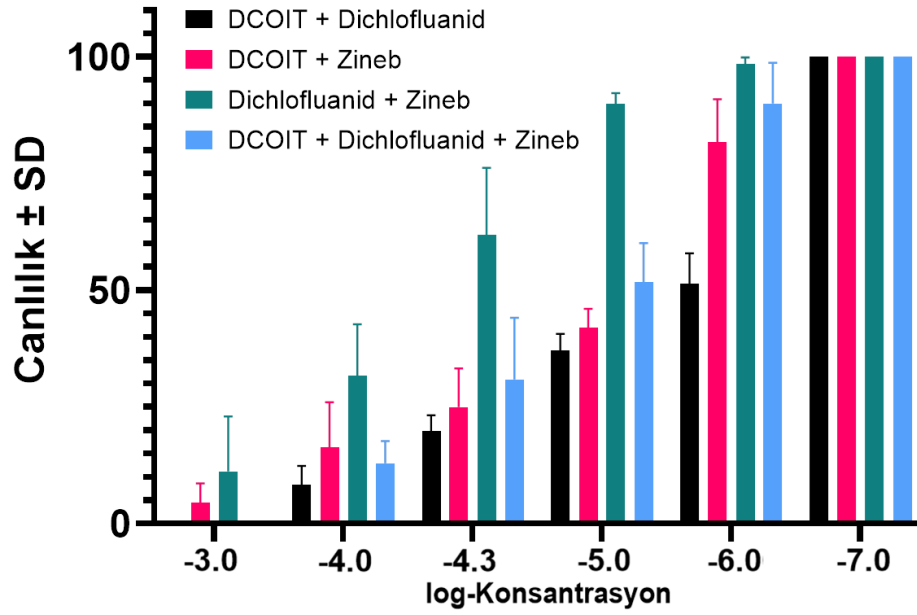
- *Daphnia magna* motilite inhibisyonu ile ilgili TBT > DCOIT > klorothalonil > TCMTB > diklofluanid > Irgarol 1051 > diuron (Fernández-Alba et al., 2002);

- *Vibrio fischeri* türü bakterilerde hücrel metabolizma toksisitesi ile ilgili DCOIT > TBT > TCMTB > diklofluanid > Irgarol 1051 > klorothalonil (Fernández-Alba et al., 2002);

- *Undaria pinnatifida* (wakame deniz yosunu) gametofitlerinde fotosentez inhibisyonu ile ilgili diuron > Irgarol 1051 > tolifluanid > DCOIT > medetomidin > çinko piritiyon (Lee et al., 2020) olarak toksisite şiddetleri sıralanmıştır.

Kekamoz önleyici bileşiklerin farklı organizmalar üzerinde değerlendirildiği birçok çalışma neticesinde farklı sınıflandırmalar elde edildiği görülmektedir. Bu durum bileşiklerin etki mekanizmasından ziyade test için seçilen organizmanın biyokimyasal işleyişi, beslenme ve enerji üretim mekanizması gibi süreçler neticesinde şekillenmektedir. Özellikle fitoplanktonlar gibi fotosentetik canlıların bu bileşiklerden çok daha çabuk etkilendikleri bilinmektedir (Fernández-Alba et al., 2002). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar neticesinde DCOIT > diklofluanid > zineb sırasıyla toksisite şiddetini belirtmek mümkün olsa da deniz suyunda karışım halinde bulunan bu maddelerin birlikte nasıl davranacağı, agonist, antagonist ya da

aditif etkileşimler neticesinde oluşabilecek etkileşimleri değerlendirmek, toksikoloji bilimi açısından daha büyük önem teşkil etmektedir (Damasceno et al., 2017; Yebra et al., 2004). Bu bağlamda tez çalışmasında bireysel toksisite testlerine ek olarak kombine toksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testlerde deney konsantrasyon ikili bileşiklerin her biri için ilgili konsantrasyon değerinin  $\frac{1}{2}$ 'si, üçlü grupta ise  $\frac{1}{3}$ 'ü olarak uygulanmıştır. Kombinasyon sitotoksosite testleri sonucu elde edilen log-Konsantrasyon-% canlılık değerlerine ait grafik Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. 96 saatlik kombinasyon sitotoksosite testi log-konsantrasyon-hücre canlılığı grafiği

Şekil 4.5.'te gösterildiği üzere DCOIT + diklofluanid kombinasyonunda  $10^{-6}$  molar konsantrasyona kadar hücre canlılığında belirgin azalma, diklofluanid + zineb kombinasyonunda ise diğer gruplara oranla daha zayıf toksisite tespit edilmiştir. İki grup arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. Bileşik kombinasyonlarının gruplar arası karşılaştırılması (96 saat)

(I) Grup	(J) Grup	Ortalama Fark (I-J)	Std. Hata	Önemlilik (Sig.)	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
DCOIT + Diklofluanid (96 saat)	DCOIT + Zineb (96 saat)	-10,5489733	8,9345403	0,475	-32,80988	11,711933
	Diklofluanid + Zineb (96 saat)	-35,5577932*	10,335152	<b>0,006</b>	-61,512726	-9,60286
DCOIT + Zineb (96 saat)	Diklofluanid + Zineb (96 saat)	-25,0088199	11,6218282	0,098	-53,828793	3,811153

Kombinasyon sitotoksosite testi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri;

- DCOIT + diklofluanid kombinasyonu için (0,46 mg/L + 0,54 mg/L )
- DCOIT + zineb kombinasyonu için (1,34 mg/L + 1,31 mg/L)
- Diklofluanid + zineb kombinasyonu için (12,72 mg/L + 10,53 mg/L)
- DCOIT + diklofluanid + zineb kombinasyonu için (1,30 mg/L + 1,53 mg/L +

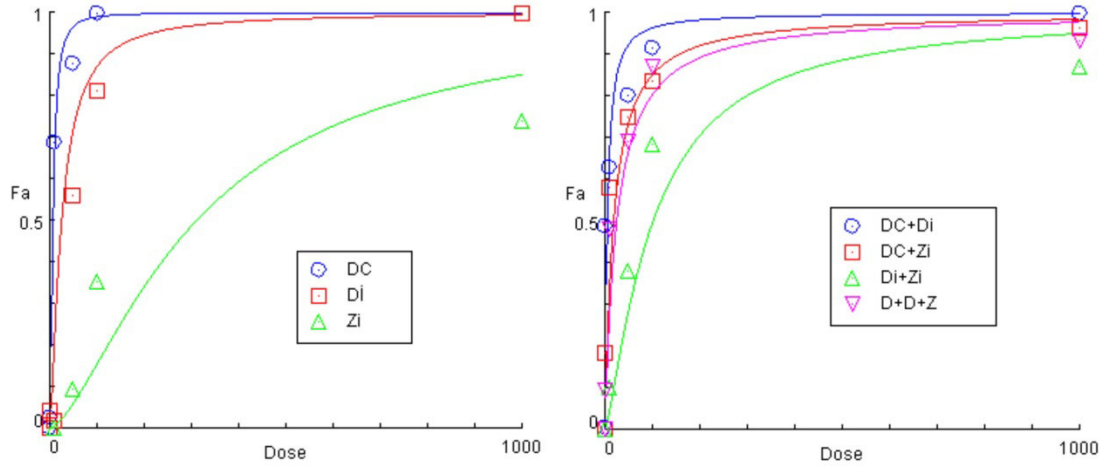
1,27 mg/L) olarak tespit edilmiştir.

IC<sub>50</sub> değerleri rakamsal farklılıkları ifade etse de hücre canlılığı yönünden sadece iki grup arasında (DCOIT+Diklofluanid - Diklofluanid+Zineb) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Tablo 4.6.). İkili ve üçlü kombinasyonlar farklı konsantrasyonlarda uygulandığı için üçlü kombinasyon istatistiksel karşılaştırma testine dahil edilmemiştir.

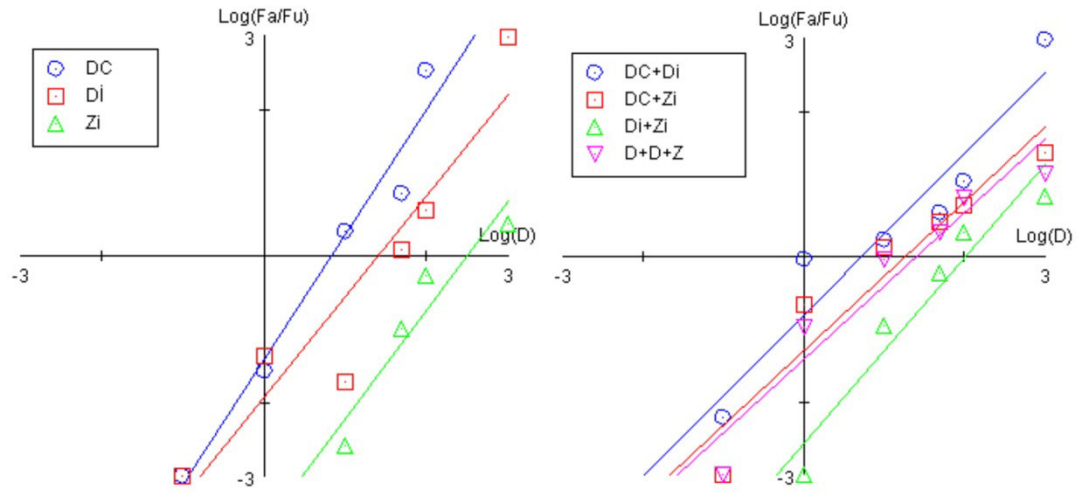
#### 4.2. Toksikodinamik Etkileşimler

Tüm kombinasyonlar incelenerek bileşiklerin aditif, sinerjistik ya da antagonist etkileşimler yönünden değerlendirilmesi amacıyla CompuSyn programı kullanılmıştır (Chou, 2006; Chou and Martin, 2005). Analiz için 96 saatlik testlerden elde edilen grup – konsantrasyon (mikromolar) - % inhibisyon değerleri kullanılmıştır.

Analiz sonucu elde edilen konsantrasyon (doz) – etki (Fa) grafikleri Şekil 4.6. ve medyan etki grafiği Şekil 4.7.’de belirtilmiştir.

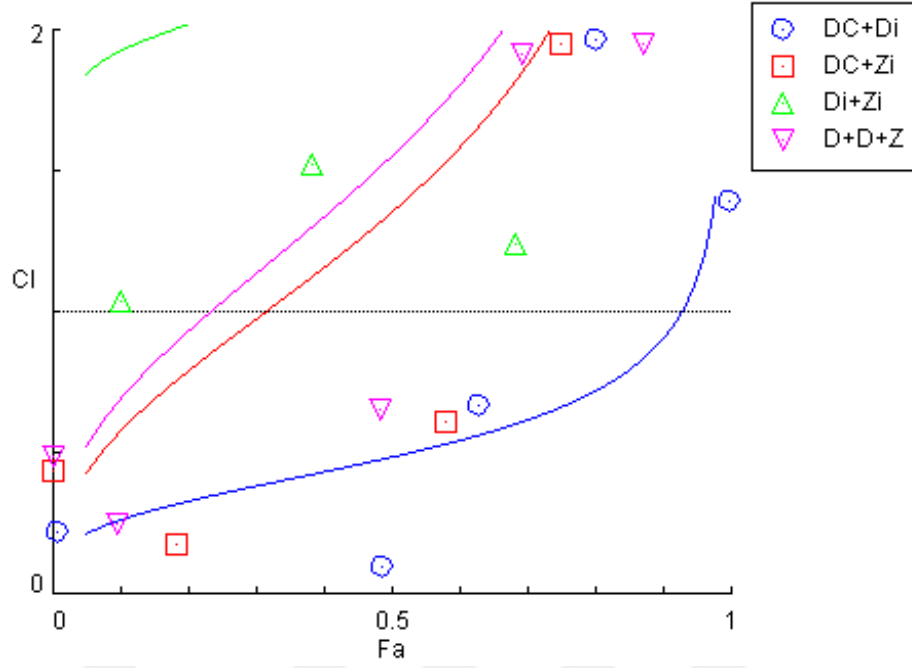


Şekil 4.6. Ortalama etki (Fa) – Konsantrasyon (doz) grafiği, (DC: DCOIT, Dİ: Diklofluanid, Zİ: Zineb, Fa: etki şiddeti)



Şekil 4.7. Medyan etki (Log Fa/Fu) – log-Konsantrasyon (Log(D)) grafiği (DC: DCOIT, Dİ: Diklofluanid, Zİ: Zineb, Fa: etki şiddeti, Fu: (1-Fa))

Grafiklerde belirtilen veriler neticesinde DCOIT'in toksik potansinin diğer bileşiklere nispeten daha yüksek olduğu; DCOIT ve diklofluanid kombinasyonunda potensin arttığı ancak zineb bileşiğinin bulunduğu kombinasyonlarda potensin zayıfladığı anlaşılmaktadır. Kombinasyonların sinerjist-antagonist-aditif etkileşimler yönünden değerlendirildiği kombinasyon indeksi grafiği Şekil 4.8.' gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kombinasyon indeksi – ortalama etki grafiği (DC: DCOIT, Di: Diklofluanid, Zi: Zineb)

Kombinasyon indeksi (CI) iki veya daha fazla bileşiğin medyan etki şiddetinin, kombinasyon içerisindeki konsantrasyonlarına oranlanması ile hesaplanmaktadır. Bu bağlamda tez çalışmasında analiz edilen 4 farklı kombinasyon grubunun CI indeksi grafiğinde, orta hattın (kesikli çizgi) altında kalan eğriler sinerjistik etkileşimi, orta hat üzerinde seyreden eğriler aditif etkileşimi, orta hatta bitişik seyreden eğriler ise antagonist etkileşimi belirtmektedir (Chou, 2016; Zhang et al., 2016). Diklofluanid ve zineb kombinasyonu orta hattın üzerinde yer almakta ve deneyde kullanılan tüm konsantrasyonlarda antagonizma göstermektedir. Bileşiklerin üçlü kombinasyonu düşük konsantrasyonlarda sinerjizm gösterirken konsantrasyon arttıkça antagonizma göstermeye başlamaktadır. Benzer şekilde DCOIT ve zineb kombinasyonu düşük dozlarda sinerjistik etkileşim oluştururken konsantrasyon artışına paralel olarak antagonizma göstermektedir. DCOIT ve diklofluanid kombinasyonu ise ortalama etki (Fa) düzeyinin neredeyse tamamında sinerjizma göstermekte, çok yüksek konsantrasyonlarda antagonist etki göstermeye başlamaktadır. Kombinasyon indeksi – konsantrasyon değerleri Tablo 4.7.’de belirtilmiştir.

Tablo 4.7. Kombinasyon indeksi – Ortalama etki tablosu

Ortalama Etki (Fa)	CI Değeri			
	DCOIT + Diklofluanid (1:1)	DCOIT + Zineb (1:1)	Diklofluanid + Zineb (1:1)	DCOIT + Zineb + Diklofluanid (1:1:1)
0.05	<b>0.21625</b>	<b>0.43511</b>	1.84980	<b>0.53124</b>
0.1	<b>0.26499</b>	<b>0.58064</b>	1.92854	<b>0.69586</b>
0.15	<b>0.30085</b>	<b>0.69424</b>	1.97906	<b>0.82331</b>
0.2	<b>0.33118</b>	<b>0.79423</b>	2.01802	<b>0.93494</b>
0.3	<b>0.38460</b>	<b>0.97812</b>	2.07992	1.13921
0.4	<b>0.43507</b>	1.16025	2.13216	1.34054
0.5	<b>0.48749</b>	1.35711	2.18134	1.55736
0.6	<b>0.54651</b>	1.58742	2.23172	1.81021
0.7	<b>0.61935</b>	1.88316	2.28804	2.13395
0.8	<b>0.72206</b>	2.31961	2.35880	2.61036
0.9	<b>0.91099</b>	3.17428	2.46970	3.54043
0.95	1.13033	4.23843	2.57683	4.69566
0.97	1.31899	5.20668	2.65608	5.74559

\* CI: Kombinasyon indeksi

\* CI<1 sinerjistik, CI=1 aditif, CI>1 antagonist

\* İnhibitör etki değeri (%10 inhibisyon, 0.1; %95 inhibisyon, 0.95)

\* 1:1 her konsantrasyon değeri için bileşikler ½ oranında kombine edilmiştir, 1:1:1 her konsantrasyon değeri için bileşikler ⅓ oranında kombine edilmiştir.

Aynı etki mekanizmasına sahip kimyasal maddeler birlikte bulduklarında genellikle aditif etkileşime girerken farklı etki mekanizmasına sahip kimyasal maddelerin birlikte etki göstermeleri ancak minimum toksik konsantrasyon eşiklerini aşmaları ile mümkündür. Antagonizm, sinerjizm ya da aditivizm gibi etkiler genellikle kimyasal maddelerin bireysel olarak orta ya da daha yüksek dozlarında (ilgili bileşiğin toksisiteye yol açan en düşük dozuna oranla) ortaya çıkmaktadır (European Commission, 2012). Tez çalışmasında incelenen bileşikler arasında zineb toksik potansi en zayıf madde olarak belirlenmiştir. Ayrıca DCOIT veya diklofluanid ile olan kombinasyonlarında genellikle antagonist etkileşim gözlenmiştir. Ancak, sitotoksikite testinde  $\cong 50$  mg/L IC<sub>50</sub> değeri belirlenen zineb, Wistar ırkı ratlara 15

mg/kg/gün dozda periton içi 5 hafta boyunca uygulanmış ve plazma, karaciğer, testislerde yüksek düzeyde oksidatif stres oluştuğu, reproduktif hormon seviyelerinin etkilendiği bildirilmiştir (Astiz et al., 2009). Zineb gibi su çözünürlüğü çok zayıf olan maddelerin detaylı bir şekilde değerlendirilebilmesi için sediment testleri ya da yemle birlikte kronik maruziyet testleri yapılmasının daha uygun olduğu düşünülmüştür (OECD, 2002). DCOIT ve diklofluanid bileşikleri kombinasyonu yüksek derecede sinerjistik etki göstermiştir. Benzer şekilde Wang et al. (2011), *Strongylocentrotus intermedius* türü denizkestanelerinde DCOIT ve diklofluanid kombinasyonunun embriyotoksik olarak sinerjistik etki gösterdiğini bildirmiştir. Xu et al. (2011), Irgarol 1051, diklofluanid, tolifluanid, DCOIT ve beş farklı ağır metalin (Cu, Cd, Zn, Pb, Ni) *Glyptocidaris crenularis* türü denizkestanesi larvaları üzerindeki etkileşimini incelemiş; ağır metallerin çevresel konsantrasyonlara yakın dozda uygulandığı durumda kekamoz önleyici bileşikler ile sinerjistik etkileşim göstermediği, daha yüksek dozlarda ise güçlü sinerjizm tespit edildiğini bildirmiştir. Chesworth et al. (2004), diuron ve Irgarol 1051'in *Zostera marina* (erişte otu) üzerinde sinerjistik toksik etki gösterdiğini; Dupraz et al. (2018) aynı bileşiklerin *Tisochrysis lutea* (mikroalg) üzerinde aditif toksik etki gösterirken *Tetraselmis suecica* (mikroalg) üzerinde sinerjistik toksik etki gösterdiğini; Bao et al. (2008) çinko-piritiyon ve bakırın *Thalassiosira pseudonana* (diyatome), *Hydroides elegans* (halkalı solucan) ve *Elasmopus rapax* (amfipod) üzerinde sinerjistik toksik etki oluşturduğunu; Kungolos et al. (2004) TBT ve bakırın *Daphnia magna* (su piresi) üzerinde sinerjistik toksik etki oluşturduğunu; Koutsaftis and Aoyama (2007), *Artemia salina* (tuzlu su karidesi) üzerinde bakır piritiyon ve çinko piritiyon'un sinerjistik, diuron ve piritiyon kombinasyonlarının ise doza bağlı olarak sinerjistik, aditif ya da antagonist, klorothalonil'in ise piritiyonlar ve diuron ile antagonist toksik etki oluşturduğunu bildirmiştir. Bileşikler arası bu tür etkileşimler akuatik sistemin çeşitliliği, suyun pH ve tuzluluk değeri, TOC seviyesi ve diğer maddelerin varlığı gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir.

### 4.3. Proliferasyon Testi

Proliferasyon testi, bileşiklerin ikili ve üçlü kombinasyonlarının subletal dozlarda hücre çoğalması üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Test edilecek konsantrasyon, sitotoksisite testi ile belirlenen IC<sub>10</sub> (hücre popülasyonunun %90'unda inhibisyona yol açmayan konsantrasyon) değeri olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin IC<sub>10</sub> değerleri DCOIT + diklofluanid (28 + 33

$\mu\text{g/L}$ ), DCOIT + zineb (83 + 81  $\mu\text{g/L}$ ), diklofluanid + zineb (788 + 652  $\mu\text{g/L}$ ), DCOIT + diklofluanid + zineb (120 + 142 + 118  $\mu\text{g/L}$ ) olarak elde edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonlarda vasat içerisinde hazırlanan bileşik kombinasyonları, 3 tekrar halinde uygulanmış ve teste ait proliferasyon eğrileri Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Proliferasyon eğrileri

Ortalama % proliferasyon artış değerinin hesaplanması amacıyla aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Proliferasyon} = \frac{\% \text{ Son Konfluens} - \% \text{ Başlangıç Konfluens}}{\% \text{ Başlangıç Konfluens}} \times 100$$

Hesaplanan % proliferasyon artış değerleri Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Kombinasyon gruplarının 96 saatlik proliferasyon testi sonuçları

	Tekrar	Konfluens (ilk)	Konfluens (son)	Proliferasyon artışı (%)	Proliferasyon artışı (% ortalama)
<b>Kontrol</b>	1	48	76	58,33	<b>66,45</b>
	2	47	73	55,31	
	3	29	52	85,71	
<b>Diklofluanid + Zineb</b>	1	38	62	63,16	<b>65,86</b>
	2	40	63	57,5	
	3	26	46	76,92	
<b>Diklofluanid + DCOIT</b>	1	25	42	68,00	<b>45,99</b>
	2	44	62	40,90	
	3	55	71	29,09	
<b>DCOIT + Zineb</b>	1	43	81	88,37	<b>57,47</b>
	2	31	49	58,06	
	3	50	63	26,00	
<b>DCOIT + Diclofluanid + Zineb</b>	1	52	92	76,92	<b>66,24</b>
	2	41	73	78,05	
	3	32	46	43,75	

Proliferasyon testi sonucunda ortalama % proliferasyon artışı; kontrol grubunda %66,45; diklofluanid ve zineb kombinasyon grubunda %65,86; diklofluanid ve DCOIT kombinasyon grubunda %45,99; DCOIT ve zineb kombinasyon grubunda %57,47; diklofluanid, DCOIT ve zineb kombinasyon grubunda %66,24 olarak tespit edilmiştir. Grupların proliferasyon sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak çevresel örneklerde tespit edilen kekamoz önleyici bileşik miktarı, proliferasyon testinde uygulanan konsantrasyondan daha yüksek düzeyde gerçekleşebilmektedir (Lam et al., 2017; Mukhtar et al., 2019). Kekamoz önleyici bileşikler gibi insan kaynaklı birçok kimyasal maddenin sucul ortama karışması, özellikle endokrin sistem

üzerinde zararlı etkilere sebep olmaktadır (Zoller & Hushan, 2010). Boyalara eklenen yardımcı biyosidal maddeler, TBT ve Irgarol 1051 gibi kullanımı yasaklanan bileşiklere nazaran çok daha hızlı yıkımlanmaktadır. Ancak gemi ve tekne bakım-onarım tesisleri ya da limanlar çevresinde gerek deniz suyu ve gerekse sedimente sürekli biyosidal madde geçişi olmaktadır. Bu nedenle ilgili bileşiklerin yarılanma ömrü kısa olsa dahi bölgede giderek artan miktarlarda birikebilmektedir. Soroldoni et al. (2017) tekne bakım-onarım tesisi çevresinde analiz ettikleri sedimentlerde ortalama olarak 0,13 mg/kg DCOIT tespit etmişlerdir. Gemi ve teknelerde boya sökme-boyama işlemleri esnasında ortaya çıkan kekamoz önleyici boya parçacıkları (antifouling paint particles) özellikle sedimentte birikerek bentik canlıları tehdit etmektedir (Molino et al., 2019; Soroldoni et al., 2020). Proliferasyonu çeşitli yollarla inhibe eden bileşikler ise ergin canlılardan ziyade larvalara daha fazla zarar verebilmekte ve gelişim sürecini aksatarak neslin tükenmesine sebep olabilmektedir (Bellas, 2006).

## 5. SONUÇ

Uluslararası denizyolu taşımacılığı ve balıkçılık gibi geniş çaplı faaliyetlerin ekonomik bir biçimde sürdürülebilmesinde kekamoz önleyici bileşiklerin rolü oldukça önemlidir. Kekamoz oluşumunu engelleyen bu bileşikler yakıt tüketimi ve gemi/tekne hızının optimum aralıkta kalmasına yardımcı olarak ekonomik anlamda büyük katkı sağlamaktadırlar. Ancak tribütilin, diuron ve Irgarol 1051 gibi bazı bileşiklerin, sucul ekosistem üzerinde kalıcı hasarlara yol açtığı tespit edilerek birçok ülkede kullanımlarına son verilmiştir. Etkili ve güçlü kekamoz önleyici bileşiklere doğan ihtiyaç neticesinde özellikle bakır içeren boyalara, yeni nesil yardımcı biyosidal maddeler (booster organic biocides) eklenerek kullanılmaya başlanmıştır. Tez çalışmasında incelenen DCOIT, diklofluanid ve zineb bileşikleri, TBT yasağı sonrası en sık kullanılan kekamoz önleyici bileşikler arasında bulunmaktadır. Ancak bu bileşiklerin de sucul ekosistem üzerinde çeşitli zararlara yol açtığı tespit edilmiştir. Yeni nesil kekamoz önleyici bileşiklerin en önemli avantajı, sucul ortamda hızlı biçimde yıkımlanmaları ve yarı ömürlerinin genellikle birkaç saat ile birkaç gün aralığında olmasıdır. Böylece etkilerini sürdürürken sucul ortamda akümüle olmadan hedef dışı canlılara minimum zarar vermektedirler. Biyosidal madde geliştirme ve ruhsatlandırma süreci oldukça uzun ve maliyetlidir. Örneğin, Sea-Nine 211 adlı biyosidal maddenin geliştirilme ve ruhsatlandırılması 10 yıllık bir zamana ve 10 milyon dolara yakın bir tutara mâl olmuştur. Ancak günümüzde toksikolojik araştırmalar ve beraberinde getirdiği yasal düzenlemeler ile birçok biyosidal maddenin kullanımı kısıtlanmış veya yasaklanmıştır. Bu durum, şirketlerin araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin daha çevreci kaplamalara yönelmesini sağlamıştır. Ancak henüz, toksik maddelerin kullanıldığı kaplamaların yerini alabilecek nitelikte bir model geliştirilememiştir (De Nys & Guenther, 2009; Yebra et al., 2004).

Tez çalışmasında gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite testleri ve proliferasyon testleri ile üç farklı bileşiğin, balık kökenli bir hücre hattı (EPC) üzerindeki etkileri preliminer olarak incelendi. Bileşiklerin bireysel ve kombinasyon halindeki etkileşimleri analiz edilerek IC<sub>50</sub> değerleri tespit edildi. EPC hücreleri üzerinde en güçlü toksik etkinin DCOIT tarafından oluşturulduğu ve bunu sırasıyla diklofluanid ve zineb bileşiklerinin izlediği; ayrıca DCOIT ve diklofluanid bileşiklerinin güçlü sinerjistik etkileşim gösterdiği tespit edildi. Böylece sucul ekosistemde karışım halinde

bulunan bu maddelerin hücresel boyutta ne gibi etkileşimlere girebileceği ortaya çıkarıldı. Literatürdeki birçok çalışmada, tez çalışması ile uyumlu olarak DCOIT bileşiğinin güçlü toksik etkisi olduğu tespit edildi. Bu nedenle sucul ortamda DCOIT birikiminin sucul canlılar açısından büyük risk arz ettiği; zineb bileşiğinin ise incelenen diğer bileşiklere nispeten daha güvenli olduğu sonucuna varıldı.

Kekamoz önleyici bileşiklerin çevresel açıdan en büyük problemlere yol açan ve canlılara yönelik zararlarının sıkça ortaya konulduğu bölgeler gemilerin bakım ve onarım faaliyetlerinin gerçekleştirildiği limanlar ve çevreleridir. Bu bölgelerde özellikle sedimentte biyosidal madde birikimi yoğunlaşmakta ve akuatik canlılar devamlı olarak bu maddelere maruz kalmaktadır. Son yıllarda geliştirilen ultrasonik cihazlar, nano-kaplamalar, foul-release ve sol-gel kaplamalar gibi biyosidal madde içermeyen çeşitli sistemlerin etkinliği giderek geliştirilmektedir. Ancak bu metotların tam olarak benimsenmesine ve ekonomik yönden elverişli hale gelmesine kadar geçecek sürede, hedef dışı toksisite ve biyoakümülyasyon göstermeyen biyosidal alternatiflerin kullanılması, ekolojik yönden meydana gelebilecek sorunları mümkün olduğunca önleyecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abcam. (2019). Counting cells using a hemocytometer. Retrieved October 20 from <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-hemocytometer>
- Abreu, F. E., da Silva, J. N. L., Castro, Í. B., & Fillmann, G. (2020). Are antifouling residues a matter of concern in the largest South American port?. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122937.
- Akcha, F., Spagnol, C., & Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106, 104-113.
- Aksoy, A., Guvenc, D., Yavuz, O., Das, Y. K., & Atmaca, E. (2012). Seasonal variation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticide levels of sea and cultured farm fish in the Samsun region of Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(6), 842-849.
- Ali, D., Tripathi, A., Al Ali, H., Shahi, Y., Mishra, K. K., Alarifi, S., . . . Manohardas, S. (2018). ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells. *Oncotargets and Therapy*, 11, 489.
- Almeida, A. C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V., & Tollefsen, K. E. (2017). Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic Toxicology*, 189, 50-59.
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & De Sousa, O. (2007). Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59(1), 2-20.
- Almond, K. M., & Trombetta, L. D. (2016). The effects of copper pyrithione, an antifouling agent, on developing zebrafish embryos. *Ecotoxicology*, 25(2), 389-398.
- Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management*, 40(1), 23-36.
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Deltreil, J., & Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, 17(11), 494-498.
- Amara, I., Miled, W., Slama, R. B., & Ladhari, N. (2018). Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, 115-130.
- Andrioli, N. B., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Mudry, M. D. (2012). Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 742(1-2), 48-53.
- Anonymus. (2013). Hull Fouling Control: The Era of Innovation. Retrieved September 22, 2020, from <https://gcaptain.com/hull-fouling-control-innovation/>
- Anonymus. (2015). Classic yacht Kentra emerges from refit with rare copper hull. Retrieved September 24, 2020, from <https://trends.nauticexpo.com/project-34881.html>
- Anonymus. (2016). Barnacle. Retrieved August 10, 2020, from <https://asknature.org/strategy/multiple-component-glue-aids-underwater-adhesion/>
- Anonymus. (2018a). All the things that you need to know about biofouling. Retrieved June 30, 2020, from <https://smallboater.com/biofouling-guide/>
- Anonymus. (2018b). How to apply antifouling. Retrieved June 29, 2020, from <https://www.piratescave.co.uk/blogs/blog/how-to-apply-antifouling/>

- Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment International*, 34(2), 292-308.
- Arai, T., Harino, H., Ohji, M., & Langston, W. J. (2009). *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Japan: Springer.
- Aras, N., & Gerede, E. (2010). Ulaştırma Sistemleri. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları.
- Arning, J. r., Matzke, M., Stolte, S., Nehen, F., Bottin-Weber, U., Bösch, A., . . . Ranke, J. (2009). Analyzing Cytotoxic Effects of Selected Isothiazol-3-one Biocides Using the Toxic Ratio Concept and Structure– Activity Relationship Considerations. *Chemical Research in Toxicology*, 22(12), 1954-1961.
- Arnst, J. (2017). The slime and grime that stick to ships. Retrieved September 20, 2020, from <https://www.asbmb.org/asbmbtoday/201704/Feature/Biofouling/>
- Astiz, M., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2009). The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94(2-3), 93-99.
- ATCC. (2016a). EPC [Epithelioma Papulosum Cyprini] (ATCC® CRL-2872™). Retrieved September 02, 2020, from [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2872.aspx?geo\\_country=tr#culturemethod](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2872.aspx?geo_country=tr#culturemethod)
- ATCC. (2016b). Leibovitz's L-15 Medium (ATCC® 30-2008™). Retrieved September 02, 2020, from [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/30-2008.aspx?geo\\_country=tr#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/30-2008.aspx?geo_country=tr#generalinformation)
- Ayers, J. C. T., H J, & Hutchins, L. W. (1952). The principal fouling organisms - Species recorded from fouling. In *Marine fouling and its prevention* (pp. 118-204): Woods Hole Oceanographic Institution United States. Navy Department. Bureau of Ships.
- Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Gramatica, P., Vighi, M., & Grimme, L. H. (2004). Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(2), 258-264.
- Balakrishnan, S., Takeda, K., & Sakugawa, H. (2012). Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. *Geochemical Journal*, 46(3), 169-177.
- Bao, V. W., Leung, K. M., Kwok, K. W., Zhang, A. Q., & Lui, G. C. (2008). Synergistic toxic effects of zinc pyriithione and copper to three marine species: Implications on setting appropriate water quality criteria. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 616-623.
- Bazes, A., Silkina, A., Defer, D., Bernède-Bauduin, C., Quéméner, E., Braud, J.-P., & Bourgougnon, N. (2006). Active substances from *Ceramium botryocarpum* used as antifouling products in aquaculture. *Aquaculture*, 258(1-4), 664-674.
- Bellas, J. (2006). Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of the Total Environment*, 367(2-3), 573-585.
- Bellas, J., Granmo, Å., & Beiras, R. (2005). Embryotoxicity of the antifouling biocide zinc pyriithione to sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1382-1385.
- Berenshtein, I., Paris, C. B., Perlin, N., Alloy, M. M., Joye, S. B., & Murawski, S. (2020). Invisible oil beyond the Deepwater Horizon satellite footprint. *Science Advances*, 6(7), eaaw8863.

- Berto, D., Giani, M., Boscolo, R., Covelli, S., Giovanardi, O., Massironi, M., & Grassia, L. (2007). Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 55(10-12), 425-435.
- Bighiu, M. A., Gorokhova, E., Carney Almroth, B., & Eriksson Wiklund, A.-K. (2017). Metal contamination in harbours impacts life-history traits and metallothionein levels in snails. *PLoS One*, 12(7), e0180157.
- Blanchard, J., & Grosell, M. (2005). Effects of salinity on copper accumulation in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(6), 1403-1413.
- Borg, D. A., & Trombetta, L. D. (2010). Toxicity and bioaccumulation of the booster biocide copper pyrrhione, copper 2-pyridinethiol-1-oxide, in gill tissues of *Salvelinus fontinalis* (brook trout). *Toxicology and Industrial Health*, 26(3), 139-150.
- Bragadin, M., Pavoni, B., Scutari, G., & Manente, S. (2005). An in vitro study of the interaction of sea-nine® with rat liver mitochondria. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(5), 1074-1078.
- Bray, S., & Langston, W. (2006). Tributyltin pollution on a global scale. An overview of relevant and recent research: impacts and issues. *United Kingdom: World Wildlife Fund UK*.
- Briski, E., Bailey, S. A., Cristescu, M. E., & MacIsaac, H. J. (2010). Efficacy of 'saltwater flushing' in protecting the Great Lakes from biological invasions by invertebrate eggs in ships' ballast sediment. *Freshwater Biology*, 55(11), 2414-2424.
- Callow, M. E., & Callow, J. A. (2002). Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*, 49(1), 1-5.
- Castro, Í. B., Iannacone, J., Santos, S., & Fillmann, G. (2018). TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere*, 205, 253-259.
- Çelik, F. (2019). Gemilerin Sınıflandırılması. Retrieved April 24 2020 from <http://www.yildiz.edu.tr/~fcelik/dersler/dizayn/Ders%20Notlari/2.%20Gemilerin%20iniflandirilmesi.pdf>
- Chagot, D., Alzieu, C., Sanjuan, J., & Grizel, H. (1990). Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 3(2), 121-130.
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), 3642-3652.
- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., & Leartsakulpanich, U. (2019). Application of WST-8 based colorimetric NAD (P) H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*, 20(1), 4.
- Champ, M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 21-71.
- Chaudhari, C. (2017). Adhesion of Fouling Organisms and Its Prevention Technique. *Int J Adv Res Ideas Innov Technol*, 3, 427-439.
- Chen, J.-D., Yi, R.-Z., Sun, C.-L., Feng, D.-Q., & Lin, Y.-M. (2010). Antifouling activity of simple synthetic diterpenoids against larvae of the barnacle *Balanus albicostatus* Pilsbry. *Molecules*, 15(11), 8072-8081.
- Chen, L., & Lam, J. C. (2017). SeaNine 211 as antifouling biocide: A coastal pollutant of emerging concern. *Journal of Environmental Sciences*, 61, 68-79.
- Chen, L., & Qian, P.-Y. (2017). Review on molecular mechanisms of antifouling compounds: an update since 2012. *Marine Drugs*, 15(9), 264.

- Chen, L., Zhang, H., Sun, J., Wong, Y.-H., Han, Z., Au, D. W., . . . Qian, P.-Y. (2014). Proteomic changes in brain tissues of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after chronic exposure to two antifouling compounds: Butenolide and 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT). *Aquatic Toxicology*, *157*, 47-56.
- Chen, L., Zhang, W., Ye, R., Hu, C., Wang, Q., Seemann, F., . . . Qian, P.-Y. (2016). Chronic exposure of marine medaka (*Oryzias melastigma*) to 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) reveals its mechanism of action in endocrine disruption via the hypothalamus-pituitary-gonadal-liver (HPGL) axis. *Environmental Science & Technology*, *50*(8), 4492-4501.
- Chesworth, J., Donkin, M., & Brown, M. (2004). The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquatic Toxicology*, *66*(3), 293-305.
- Chou, T. C. (2016). Sample Illustration of the "CompuSyn Report" of Two-Drug Combinations in Vitro. Retrieved August 12 2020 from <http://combosyn.com/Sample%20Ills.CompuSyn%20Report.pdf>
- Chou, T., & Martin, N. (2005). CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. ComboSyn, Paramus, NJ.
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621-681.
- Cima, F., & Ballarin, L. (2012). Immunotoxicity in ascidians: Antifouling compounds alternative to organotins: III—The case of copper (I) and Irgarol 1051. *Chemosphere*, *89*(1), 19-29.
- Cima, F., & Ballarin, L. (2015). Immunotoxicity in ascidians: Antifouling compounds alternative to organotins—IV. The case of zinc pyrithione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *169*, 16-24.
- Cima, F., & Varello, R. (2020). Immunotoxicity in Ascidians: Antifouling Compounds Alternative to Organotins—V. the Case of Dichlofluanid. *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(6), 396.
- Cima, F., Bragadin, M., & Ballarin, L. (2008). Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes: I. Sea-Nine 211™ and chlorothalonil. *Aquatic Toxicology*, *86*(2), 299-312.
- Cima, F., Burighel, P., & Ballarin, L. (2001). Biodiversity in the Lagoon of Venice: a laboratory model for the study of the effects of antifouling compounds on settlements and survival of sessile species. *Scientific Research and Safeguarding of Venice. Research Program, 2003*, 449-456.
- CPA. (2010). *4,5-Dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one (DCOIT) Competent Authority Report*. Norway Climate and Pollution Agency.
- da Silva Barreto, J., de Melo Tarouco, F., de Godoi, F. G. A., Geihs, M. A., Abreu, F. E. L., Fillmann, G., . . . da Rosa, C. E. (2018). Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laonereis acuta*. *Aquatic Toxicology*, *196*, 1-8.
- da Silveira Guerreiro, A., Abreu, F. E. L., Fillmann, G., & Sandrini, J. Z. (2020). Effects of chlorothalonil on the antioxidant defense system of mussels *Perna perna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*, 110119.

- Dafforn, K. A., Lewis, J. A., & Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3), 453-465.
- Damasceno, É. P., de Figuerêdo, L. P., Pimentel, M. F., Loureiro, S., & Costa-Lotufo, L. V. (2017). Prediction of toxicity of zinc and nickel mixtures to *Artemia* sp. at various salinities: from additivity to antagonism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 322-329.
- David, M., Gollasch, S., & Hewitt, C. (2015). Global Maritime Transport and Ballast Water Management. *Springer Netherlands*. doi, 10, 978-994.
- Davidson, I., Scianni, C., Hewitt, C., Everett, R., Holm, E., Tamburri, M., & Ruiz, G. (2016). Mini-review: Assessing the drivers of ship biofouling management—aligning industry and biosecurity goals. *Biofouling*, 32(4), 411-428.
- de Almeida, A. C. G., Petersen, K., Langford, K., Thomas, K. V., & Tollefsen, K. E. (2017). Mixture toxicity of five biocides with dissimilar modes of action on the growth and photosystem II efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(16-18), 971-986.
- de Almeida, A. C. G., Petersen, K., Langford, K., Thomas, K. V., & Tollefsen, K. E. (2017). Mixture toxicity of five biocides with dissimilar modes of action on the growth and photosystem II efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(16-18), 971-986.
- Devilla, R. A., Brown, M. T., Donkin, M., Tarran, G. A., Aiken, J., & Readman, J. W. (2005). Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Marine Ecology Progress Series*, 286, 1-12.
- Do, J. W., Haque, M. N., Lim, H.-J., Min, B. H., Lee, D.-H., Kang, J.-H., . . . Rhee, J.-S. (2018). Constant exposure to environmental concentrations of the antifouling biocide Sea-Nine retards growth and reduces acetylcholinesterase activity in a marine mysid. *Aquatic Toxicology*, 205, 165-173.
- Dupraz, V., Stachowski-Haberkorn, S., Ménard, D., Limon, G., Akcha, F., Budzinski, H., & Cedergreen, N. (2018). Combined effects of antifouling biocides on the growth of three marine microalgal species. *Chemosphere*, 209, 801-814.
- Dürr, S., & Thomason, J. C. (2009). *Biofouling*: John Wiley & Sons.
- ECHA. (2013). Regulation (EU) n°528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Zineb Product-Type 21 (Anti-fouling products). Retrieved September 13, 2020, from [https://echa.europa.eu/documents/10162/24380810/7226\\_1409-21\\_Assessment\\_Report.pdf/97e7b9fe-54f4-362b-0316-bd2cb992fa78](https://echa.europa.eu/documents/10162/24380810/7226_1409-21_Assessment_Report.pdf/97e7b9fe-54f4-362b-0316-bd2cb992fa78)
- ECHA. (2014). Copper pyrrithione (PT 21) Retrieved September 14, 2020, from <https://echa.europa.eu/documents/10162/da271568-682b-03a0-1b8a-edbda376b89a>
- ECHA. (2016). Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Dichlofluanid Product-type 21 (Antifouling Products). Retrieved September 10, 2020, from <https://echa.europa.eu/documents/10162/4e5ac246-8463-fac1-49b3-eeef6a63c2fd>
- ECHA. (2019). Substance Infocard/Zineb. Retrieved September 11, 2020, from <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.031.970>
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., & Zucco, F. (1990). Toxicity tests with mammalian cell cultures. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*, 41, 75-82.

- Elia, A. C., Magara, G., Caruso, C., Masoero, L., Prearo, M., Arsieni, P., . . . Salvati, S. (2018). A comparative study on subacute toxicity of arsenic trioxide and dimethylarsinic acid on antioxidant status in Crandell Rees feline kidney (CRFK), human hepatocellular carcinoma (PLC/PRF/5), and epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell lines. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 81(10), 333-348.
- Eom, H.-J., Haque, M. N., Nam, S.-E., Lee, D.-H., & Rhee, J.-S. (2019). Effects of sublethal concentrations of the antifouling biocide Sea-Nine on biochemical parameters of the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 222, 125-134.
- EPA. (1996). Presidential Green Chemistry Challenge: 1996 Designing Greener Chemicals Award. Retrieved September 11, 2020, from <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-1996-designing-greener-chemicals-award>
- Erik, N. Y. (2015). Petrol tanker kazaları ve neden olduğu çevre kirliliği. *Mavi Gezegen*, 20.
- Ermolayeva, E., & Sanders, D. (1995). Mechanism of pyrithione-induced membrane depolarization in *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3385-3390.
- European-Commission. (2012). Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Retrieved July 21 from [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/environmental\\_risks/docs/scher\\_o\\_155.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_155.pdf)
- Evans, S., Birchenough, A., & Brancato, M. (2000). The TBT ban: out of the frying pan into the fire? *Marine Pollution Bulletin*, 40(3), 204-211.
- FAO. (2011). The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture. Retrieved September 17, 2020, from <http://www.fao.org/3/a-i1688e.pdf>
- FAO. (2018). The state of world fisheries and aquaculture. Retrieved July 12 from <http://www.fao.org/3/ca0191en/ca0191en.pdf>
- Faßbender, S., Döring, A. K., & Meermann, B. (2019). Development of complementary CE-MS methods for speciation analysis of pyrithione-based antifouling agents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(27), 7261-7272.
- Fernández-Alba, A., Hernando, M., Piedra, L., & Chisti, Y. (2002). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 456(2), 303-312.
- Figueiredo, J., Loureiro, S., & Martins, R. (2020). Hazard of novel anti-fouling nanomaterials and biocides DCOIT and silver to marine organisms. *Environmental Science: Nano*.
- Fijan, N., Sulimanović, D., Bearzotti, M., Muzinić, D., Zwillenberg, L., Chilmonczyk, S., . . . De Kinkelin, P. (1983). *Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp Cyprinus carpio*. Paper presented at the Annales de l'Institut pasteur/Virologie.
- Flach, C.-F., Pal, C., Svensson, C. J., Kristiansson, E., Östman, M., Bengtsson-Palme, J., . . . Larsson, D. J. (2017). Does antifouling paint select for antibiotic resistance? *Science of the Total Environment*, 590, 461-468.
- Flores, I. L., Gamba T. O., Carvalho R. V., . . . Etges, A. (2016). *In vitro* cytotoxicity of plantago australis ethanol extract used as an anti-inflammatory for the treatment of oral pathologies. *Jentashapir J Health Res*, 7(1), 1-4.

- Fonseca, V. B., da Silveira Guerreiro, A., Vargas, M. A., & Sandrini, J. Z. (2020). Effects of DCOIT (4, 5-dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one) to the haemocytes of mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 108737.
- Frogliola, C. (2012). First record of *Charybdis japonica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae) in the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, 5.
- Fukunaga, E., Enma, K., Saitoh, S., Nishimura-Danjyobara, Y., Oyama, Y., & Akaike, N. (2015). Increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> level by phenylsulfamide fungicides, tolylfluanid and dichlofluanid, in rat thymic lymphocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 149-155.
- Gabe, H. B., da Silveira Guerreiro, A., & Sandrini, J. Z. (2020). Molecular and biochemical effects of the antifouling DCOIT in the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 239, 108870.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, 88(11), 1929-1938.
- Gallo, A., & Tosti, E. (2015). Reprotoxicity of the antifoulant chlorothalonil in ascidians: an ecological risk assessment. *PloS One*, 10(4), e0123074.
- Ganjam, G. K., Bolte, K., Matschke, L. A., Neitemeier, S., Dolga, A. M., Höllerhage, M., ... & Culmsee, C. (2019). Mitochondrial damage by  $\alpha$ -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell death & Disease*, 10(11), 1-16.
- Gibbs, P., & Bryan, G. (1986). Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(4), 767-777.
- Goetz, K. (2019). Report to the Legislature Pursuant to SHB 2634 (2018): Antifouling Paints in Washington State Report and Recommendations. Washington State Department of Ecology-Hazardous Waste and Toxics Reduction Program, 19-04-020.
- Goka, K. (1999). Embryotoxicity of zinc pyrithione, an antidandruff chemical, in fish. *Environmental Research*, 81(1), 81-83.
- Grosicka-Maciąg, E., Kurpios-Piec, D., Szumiło, M., Grzela, T., & Rahden-Staroń, I. (2012). Dithiocarbamate fungicide zineb induces oxidative stress and apoptosis in Chinese hamster lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(1), 95-101.
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1541-1560.
- Gutierrez, L., & Mutharasan, N. (2020). Life Below Water: Contributions to Combat Various Polymers. *Illinois Mathematics and Science Academy*.
- Hall Jr, L. W., Giddings, J. M., Solomon, K. R., & Balcomb, R. (1999). An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(4), 367.
- Hamwijk, C., Schouten, A., Foekema, E., Ravensberg, J., Collombon, M., Schmidt, K., & Kugler, M. (2005). Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. *Chemosphere*, 60(9), 1316-1324.
- Hellio, C., & Yebra, D. (2009). *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*: Elsevier.
- Henderson, O. K. (2019). Zebra mussels found in largest of Iowa Great Lakes. Retrieved September 11, 2020, from <https://www.radioiowa.com/2017/10/04/zebra-mussels-found-in-largest-of-iowa-great-lakes/>

- Hewitt, C. (2002). The distribution and diversity of tropical Australian marine bio-invasions. *Pacific Science*, 56(2), 213-222.
- Hoffman, L., & Hardej, D. (2012). Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 556-573.
- Holovská, V., Pistl, J., & Kovalkovičová, N. (2007). In vitro effect of pesticides (dichlofluanid, endosulfan, simazine, tolylfluanid and triallate) on proliferative activity of animal derived cell cultures. *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 61-74.
- Hunter, J., & Evans, L. (1990). The toxicity of the biocides zineb, nabam and their derivatives to the ship-fouling diatom *Amphora coffeaeformis*. *Biofouling*, 2(4), 267-287.
- IARC. (2020). IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Retrieved September 17, 2020, from <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>
- ICCVAM. (2001). Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity, Based on Recommendations from an International Workshop Organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). In: NIEHS Research Triangle Park, NC, USA.
- ICS. (2019). Shipping and World Trade. Retrieved June 30 2020 from <http://www.ics-shipping.org/shipping-facts/shipping-and-world-trade>
- IMO. (2019). Biofouling. Retrieved September 17, 2020, from <http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/Biofouling/Pages/default.aspx>
- IMO. (2020a). Common Hull Fouling Invasive Species. Retrieved September 18, 2020, from <http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/Biofouling/Pages/Common-Hull-Fouling-Invasive-Species.aspx>
- IMO. (2020b). Status of IMO treaties-Comprehensive information on the status of multilateral Conventions and instruments in respect of which the International Maritime Organization or its Secretary-General performs depositary or other functions. Retrieved September 09, 2020, from <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Documents/Status%20-%202020%20May.pdf>
- Interlux. (2010). Micron 66 - The Intelligent SPC Antifouling. Retrieved August 14, 2020, from <https://interlux.com/en/us/boat-paint/antifouling/micron-66>
- Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 8(3), 72.
- Jackson, L. (2008). Marine biofouling and invasive species: guidelines for prevention and management. *United Nations Environment Programme*.
- Jacobson, A. H., & Willingham, G. L. (2000). Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 103-110.
- Jacobson, A., Mazza, L., Lawrence, L., Lawrence, B., Jackson, S., & Kesterson, A. (1993). Fate of an antifoulant in an aquatic environment. In: ACS Publications.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., . . . Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.

- Jia, Z., & Misra, H. P. (2007). Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells, in vitro. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 27(5), 434-446.
- Johansson, P., Eriksson, K. M., Axelsson, L., & Blanck, H. (2012). Effects of seven antifouling compounds on photosynthesis and inorganic carbon use in sugar kelp *Saccharina latissima* (Linnaeus). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(3), 365-377.
- Jos, A., Cameán, A., Pflugmacher, S., & Segner, H. (2009). The antioxidant glutathione in the fish cell lines EPC and BCF-2: response to model pro-oxidants as measured by three different fluorescent dyes. *Toxicology in Vitro*, 23(3), 546-553.
- Jung, S., Bae, J., Kang, S., Son, J., Jeon, J., Lee, H., . . . Shin, H. (2017). Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 811-818.
- Kanemoto-Kataoka, Y., Oyama, T. M., Ishibashi, H., & Oyama, Y. (2015). Dithiocarbamate fungicides increase intracellular Zn<sup>2+</sup> levels by increasing influx of Zn<sup>2+</sup> in rat thymic lymphocytes. *Chemico-biological Interactions*, 237, 80-86.
- Kappock, P. S., Glaser, J. K., & Cornish, A. (2005). Protecting paints. *European Coatings Journal*, 4, 144-149.
- Karadeniz, E., & Kılıç, E. (2015). Deniz ve Kıyı Sularında Yolcu Taşımacılığı Sektörünün Finansal Performansının Oran Yöntemiyle Analizi. *Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 15(2), 79-98.
- Karlsson, J., & Eklund, B. (2004). New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), 456-464.
- Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., & Persoone, G. (2003). The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1491-1494.
- Keith, L. H., & Walters, D. B. (2019). National toxicology program's chemical solubility compendium: CRC Press.
- Koning, J. T., Bollmann, U. E., & Bester, K. (2020). The occurrence of modern organic antifouling biocides in Danish marinas. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111402.
- Konstantinou, I. K. (2006). *Antifouling Paint Biocides* (Vol. 5): Springer Science & Business Media.
- Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, 30(2), 235-248.
- Koutsaftis, A., & Aoyama, I. (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, 387(1-3), 166-174.
- Kungolos, A., Hadjispyrou, S., Petala, M., Tsiridis, V., Samaras, P., & Sakellaropoulos, G. (2004). Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 4(4-5), 101-110.
- Kwon, S. H., Lee, I., Park, H., & Lee, S. G. (2019). Decomposition mechanisms of self-polishing copolymers for antifouling coating materials through first-principles approach. *Progress in Organic Coatings*, 105406.
- Laidlaw, F. B. (1952). The history of the prevention of fouling. *Woods Hole Marine Oceano Inst., ed. Fouling and Its Prevention. Annapolis, US Naval Inst*, 211-223.

- Lam, N. H., Jeong, H.-h., Kang, S.-d., Kim, D.-J., Ju, M.-J., Horiguchi, T., & Cho, H.-S. (2017). Organotins and new antifouling biocides in water and sediments from three Korean Special Management Sea Areas following ten years of tributyltin regulation: Contamination profiles and risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 121(1-2), 302-312.
- Laws, E. A. (2018). Plastics in the Sea. In E. A. Laws (Ed.), *Aquatic Pollution: An Introductory Text* (Vol. 4). Los Angeles, US: Wiley.
- Lebret, K., Thabard, M., & Hellio, C. (2009). Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention. In *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies* (pp. 80-112): Elsevier.
- Lee, H., Depuydt, S., Choi, S., Han, T., & Park, J. (2020). Rapid toxicity assessment of six antifouling booster biocides using a microplate-based chlorophyll fluorescence in *Undaria pinnatifida* gametophytes. *Ecotoxicology*, 1-12.
- Lewis, J. A. (1998). *Marine Biofouling and Its Prevention*. Paper presented at the Materials Forum.
- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., . . . Sunyer, J. O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7(10), 1116-1124.
- Lin, I., Liu, W. T., Wu, C. C., Wong, G. T., Hu, C., Chen, Z., . . . Liu, K. K. (2003). New evidence for enhanced ocean primary production triggered by tropical cyclone. *Geophysical Research Letters*, 30(13).
- Lin, T., Hu, Z., Zhang, G., Li, X., Xu, W., Tang, J., & Li, J. (2009). Levels and mass burden of DDTs in sediments from fishing harbors: the importance of DDT-containing antifouling paint to the coastal environment of China. *Environmental Science & Technology*, 43(21), 8033-8038.
- Long, J. W., & Siegel, M. R. (1975). Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2, 4, 5, 6-tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems: 2. In vitro reactions. *Chemico-biological Interactions*, 10(6), 383-394.
- Lopes, F. C., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., Sánchez, J. A. A., Pires, D. M., Pereira, J. R., . . . Martins, C. D. M. G. (2020). Impacts of the biocide chlorothalonil on biomarkers of oxidative stress, genotoxicity, and sperm quality in guppy *Poecilia vivipara*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109847.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). *100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database* (Vol. 12): Invasive Species Specialist Group Auckland.
- MacDonald, I. R., Garcia-Pineda, O., Beet, A., Daneshgar Asl, S., Feng, L., Graettinger, G., . . . Huffer, F. (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(12), 8364-8380.
- Mann, J., & Fraker, P. (2005). Zinc pyrithione induces apoptosis and increases expression of Bim. *Apoptosis*, 10(2), 369-379.
- Maraldo, K., & Dahllöf, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9-10), 894-901.
- Maritime-Connector. (2019). Merchant Vessels. Retrieved September 14, 2020, <http://maritime-connector.com/wiki/merchant-vessels/>
- Markovic, J., & Nikolic, M. (2014). The impact of oil pollution of the marine environment. *Journal of Process Management-New Technologies (JPMNT)*, 2(4). Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/35337833.pdf#page=28>

- Martínez-Riaño, A., Bovolenta, E. R., Mendoza, P., Oeste, C. L., Martín-Bermejo, M. J., Bovolenta, P., . . . Alarcón, B. (2018). Antigen phagocytosis by B cells is required for a potent humoral response. *EMBO reports*, 19(9).
- Matthiessen, P. (2019). The impact of organotin pollution on aquatic invertebrate communities—are molluscs the only group whose populations have been affected? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 11, 13-20.
- Mauter, M. S., Zucker, I., Perreault, F., Werber, J. R., Kim, J.-H., & Elimelech, M. (2018). The role of nanotechnology in tackling global water challenges. *Nature Sustainability*, 1(4), 166-175.
- McElroy, D. J., Hochuli, D. F., Doblin, M. A., Murphy, R. J., Blackburn, R. J., & Coleman, R. A. (2017). Effect of copper on multiple successional stages of a marine fouling assemblage. *Biofouling*, 33(10), 904-916.
- Medium. (2017). 7 reasons why sea sponges are the coolest. Retrieved from <https://medium.com/@GreenpeaceUK/7-reasons-why-sea-sponges-are-the-coolest-58dac5667625>
- Menin, A., Ballarin, L., Bragadin, M., & Cima, F. (2008). Immunotoxicity in ascidians: Antifouling compounds alternative to organotins—II. The case of Diuron and TCMS pyridine. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43(8), 644-654.
- Meriç, G., Dahl, J. E., & Ruyter, I. E. (2008). Cytotoxicity of silica–glass fiber reinforced composites. *Dental Materials*, 24(9), 1201-1206.
- Mochida, K., Amano, H., Onduka, T., Kakuno, A., & FUJII, K. (2010). Toxicity of 4, 5-dichloro-2-n-octyl-3 2H-isothiazolone Sea-Nine 211 to two marine teleostean fishes. *Japanese Journal of Environmental Toxicology*, 13(2), 105-116.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Tanaka, H., Onduka, T., Kakuno, A., & Fujii, K. (2009). Inhibition of acetylcholinesterase by metabolites of copper pyrithione (CuPT) and its possible involvement in vertebral deformity of a CuPT-exposed marine teleostean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 624-630.
- Molino, C., Angeletti, D., Oldham, V. E., Goodbody-Gringley, G., & Buck, K. N. (2019). Effect of marine antifouling paint particles waste on survival of natural Bermuda copepod communities. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110492.
- Moon, Y.-S., Kim, M., Hong, C. P., Kang, J.-H., & Jung, J.-H. (2019). Overlapping and unique toxic effects of three alternative antifouling biocides (Diuron, Irgarol 1051®, Sea-Nine 211®) on non-target marine fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 23-32.
- Mukhtar, A., Mohamat-Yusuff, F., Zulkifli, S. Z., Harino, H., Ismail, A., & Inoue, K. (2019). Concentration of Organotin and Booster Biocides in Sediments of Seagrass Area from Sungai Pulai Estuary, South of Johor, Malaysia. *Environments*, 6(2), 26.
- Muller-Karanassos, C., Arundel, W., Lindeque, P. K., Vance, T., Turner, A., & Cole, M. (2020). Environmental concentrations of antifouling paint particles are toxic to sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution*, 268, 115754.
- Myers, J. H., Gunthorpe, L., Allinson, G., & Duda, S. (2006). Effects of antifouling biocides to the germination and growth of the marine macroalga, *Hormosira banksii* (Turner) Desicaine. *Marine Pollution Bulletin*, 52(9), 1048-1055.
- Nikinmaa, M. (2014). What causes aquatic contamination. *An Introduction to Aquatic Toxicology: Elsevier*, 19-39.
- NMS. (2018). Invasive Cup Coral. Retrieved August 07, 2020, from <https://flowergarden.noaa.gov/education/invasivecupcoral.html>

- NPS. (2018). California Blue Mussel. Retrieved August 24, 2020, from <https://www.nps.gov/subjects/islandofthebluedolphins/california-mussel.htm>
- O'Malley, M. (2010). The Regulatory evaluation of the skin effects of pesticides. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 701-787): Elsevier.
- Oberdörster, E., & McClellan-Green, P. (2002). Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Marine Environmental Research*, 54(3-5), 715-718.
- OECD. (2002). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Publishing, 2002.
- OECD. (2010). Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. OECD Ser Test Assess, 20, 1-54.
- OECD. (2015). Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. OECD Workgroup of National Coordinators for Test 42 Guidelines (WNT).
- Onduka, T., Ojima, D., Ito, M., Ito, K., Mochida, K., & Fujii, K. (2013). Toxicity of the antifouling biocide Sea-Nine 211 to marine algae, crustacea, and a polychaete. *Fisheries Science*, 79(6), 999-1006.
- O'Neil, M. J. (2013). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*: RSC Publishing.
- Park, E.-J., Seong, E., Kim, Y., & Lee, K. (2019). Ammonium lauryl sulfate-induced apoptotic cell death may be due to mitochondrial dysfunction triggered by caveolin-1. *Toxicology in Vitro*, 57, 132-142.
- Park, K.-H., Lee, K.-T., Lee, J.-S., & Han, K.-N. (2006). Acute toxicity of antifouling agents (TBT, Sea-nine, Cu-pyrithione and Zn-pyrithione) to rockfish *Sebastes schlegeli* and amphipod *Monocorophium acherusicum*. *Journal of the Korean Society for Marine Environment & Energy*, 9(1), 21-28.
- Pehlivan, A., Atmaca, E., & Aksoy, A. (2018). Ekotoksikoloji Alanında Balık Hücre Hatlarının Kullanımı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 29(2), 175-180.
- Perić, L., & Burić, P. (2019). The effect of copper and chlorpyrifos co-exposure on biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 225, 126-134.
- Perschbacher, P. W., & Ludwig, G. M. (2004). Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliant on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 233(1-4), 197-203.
- Peters, K. (2004). Tissue culture of fish cell lines. In N. Heil (Ed.), *National Wild Fish Health Survey Laboratory Procedures Manual* (5 ed., pp. 1-16). Washington D.C.: Warm Springs.
- Petra, P., Ester, M. E., Neven, C., Maritina, M. Š., Gianluca, C., & Sandi, O. (2020). The role of metal contamination in shaping microbial communities in heavily polluted marine sediments. *Environmental Pollution*, 114823.
- Pistl, J., Kovalkovičová, N., Holovská, V., Legáth, J., & Mikula, I. (2003). Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro. *Toxicology*, 188(1), 73-81.
- Price, A. R., & Readman, J. W. (2013). 12 Booster biocide antifoulants: is history repeating itself? *Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation*, 297.
- PubChem. (2019). Dichlofluanid. Retrieved September 19, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dichlofluanid>

- PubChem. (2020a). Dichlofluanid. Retrieved September 19, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dichlofluanid>
- PubChem. (2020b, ). Kathon 930. Retrieved September 19, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kathon-930>
- PubChem. (2020c). Zineb. Retrieved September 19, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zineb>
- Pynaert, K., & Speleers, L. (2005). Development of an integrated approach for the removal of tributyltin (TBT) from waterways and harbors: prevention, treatment and reuse of TBT contaminated sediments. *Report by the Environmental Research Center, Hofstade-Aalst, Belgium.*
- Pyo, J., & Shin, S. (2011). A New Record of Invasive Alien Colonial Tunicate *Clavelina lepadiformis* (Ascidiacea: Aplousobranchia: Clavelinidae) in Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 27(2), 197-200.
- Qian, P.-Y., Chen, L., & Xu, Y. (2013). Mini-review: Molecular mechanisms of antifouling compounds. *Biofouling*, 29(4), 381-400.
- Railkin, A. I. (2003). *Marine biofouling: colonization processes and defenses*: CRC press.
- Ramaglia, A. C., de Castro, L. M., & Augusto, A. (2018). Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(5), 729-738.
- Reddy, P. R. C., Salvekar, P., & Nayak, S. (2008). Super cyclone induces a mesoscale phytoplankton bloom in the Bay of Bengal. *IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters*, 5(4), 588-592.
- Resmi Gazete. (2018). Gemilerdeki Zararlı Organik Tutunma Önleyici Sistemlerin Kontrolüne İlişkin Uluslararası Sözleşme. 2018/11199. Retrieved September 11, 2020, from <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/02/20180215M1.htm>
- Rosenhahn, A., & Sendra, G. (2012). Surface sensing and settlement strategies of marine biofouling organisms. *Biointerphases*, 7(1-4), 63.
- Saban, M., & Gülerçin, G. (2009). Deniz Taşımacılığı İşletmelerinde Maliyetleri Etkileyen Faktörler ve Sefer Maliyetleri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Denizcilik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 1-16.
- Saitoh, S., Fukunaga, E., Ohtani, H., & Oyama, Y. (2015). Zn<sup>2+</sup>-dependence of the synergistic increase in rat thymocyte cell lethality caused by simultaneous application of 4, 5-dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Chemosphere*, 135, 447-452.
- Sakkas, V. A., Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2001). Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 930(1-2), 135-144.
- Schilling, J. (2015). Biofouling. Retrieved September 11, 2020, from <http://www.stccmop.org/blog/schillij/biofouling>
- Schouten, A., Mol, H., Hamwijk, C., Ravensberg, J., Schmidt, K., & Kugler, M. (2005). Critical Aspects in the Determination of the Antifouling Compound Dichlofluanid and its Metabolite DMSA (N, N-dimethyl-N'-phenylsulfamide) in Seawater and Marine Sediments. *Chromatographia*, 62(9-10), 511-517.
- Seidel, J. (2012). Antifouling 101, A Comprehensive Guide from Interlux. Retrieved August 04, 2020, from [http://www.yachtpaint.com/LiteratureCentre/antifouling\\_101\\_usa\\_eng.pdf](http://www.yachtpaint.com/LiteratureCentre/antifouling_101_usa_eng.pdf)

- Sekizawa, J., Suter, G., & Birnbaum, L. (2013). Tributyltin and Triphenyltin compounds. In: World Health Organization.
- Şendur, T. (2015). Lojistik Sektöründe Deniz Yolu Taşımacılığı, Türkiye’de Kuru Yük Taşımacılığında Gemi İşletmeciliği Sorunlarının Tespitine Yönelik Sektörel Bir Araştırma. (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul.
- Seo, J.-H., Park, J.-W., Lee, S.-K., & Kim, W.-K. (2014). Application of neutral red uptake assay using EPC cells as an alternative to the fish acute toxicity test for pesticide. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 18(1), 8-13.
- Sherrington, C. (2016). Plastics in the Marine Environment. Retrieved August 17, 2020, from <https://www.eunomia.co.uk/reports-tools/plastics-in-the-marine-environment/>
- Shields, J. (2019). Mnemiopsis leidyi. Retrieved September 19, 2020, from <https://reeflifesurvey.com/species/mnemiopsis-leidyi/>
- Shuilleabhain, S. N., Mothersill, C., Sheehan, D., O’Brien, N., O’Halloran, J., Van Pelt, F., & Davoren, M. (2004). In vitro cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines. *Toxicology in Vitro*, 18(3), 365-376.
- Sigma-Aldrich. (2019). Cell Counting Kit - 8. Retrieved September 05, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>
- Smedbol, É., Gomes, M. P., Paquet, S., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., & Juneau, P. (2018). Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. *Chemosphere*, 192, 133-141.
- Sobhanardakani, S., Tayebi, L., & Hosseini, S. V. (2018). Health risk assessment of arsenic and heavy metals (Cd, Cu, Co, Pb, and Sn) through consumption of caviar of *Acipenser persicus* from Southern Caspian Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3), 2664-2671.
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., & Larramendy, M. L. (2015). Carbamates: a study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 834-844.
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A., & Larramendy, M. L. (2015). Carbamates: a study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 834-844.
- Soloneski, S., Reigosa, M. A., & Larramendy, M. L. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. II. micronucleus induction in immunophenotyped human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(1), 57-62.
- Sonne, C., Siebert, U., Gonnsen, K., Desforges, J.-P., Eulaers, I., Persson, S., . . . Olsen, M. T. (2020). Health effects from contaminant exposure in Baltic Sea birds and marine mammals: A review. *Environment International*, 139, 105725.
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í. B., Duarte, F. A., & Pinho, G. L. L. (2017). Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials*, 330, 76-82.
- Soroldoni, S., da Silva, S. V., Castro, Í. B., Martins, C. d. M. G., & Pinho, G. L. L. (2020). Antifouling paint particles cause toxicity to benthic organisms: Effects on two species with different feeding modes. *Chemosphere*, 238, 124610.
- Sousa, A. C., Pastorinho, M. R., Takahashi, S., & Tanabe, S. (2014). History on organotin compounds, from snails to humans. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1), 117-137.

- Specian, A. F. L., Serpeloni, J. M., Tuttis, K., Ribeiro, D. L., Cilião, H. L., Varanda, E. A., . . . Cólus, I. M. (2016). LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*, 68(6), 2729-2744.
- Statista. (2019). Number of merchant ships by type 2018. Retrieved June 22 2020 from <https://www.statista.com/statistics/264024/number-of-merchant-ships-worldwide-by-type/>
- Su, Y., Li, H., Xie, J., Xu, C., Dong, Y., Han, F., . . . Li, E. (2019). Toxicity of 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in the marine decapod *Litopenaeus vannamei*. *Environmental Pollution*, 251, 708-716.
- Su, Y., Li, H., Xu, C., Wang, X., Xie, J., Qin, J. G., . . . Li, E. (2018). Endoplasmic reticulum stress mediates 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT)-induced toxicity and liver lipid metabolism changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution*, 242, 1981-1987.
- Suzuki, T., Nojiri, H., Isono, H., & Ochi, T. (2004). Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology*, 204(2-3), 97-107.
- Szöcs, E., Brinke, M., Karaoglan, B., & Schäfer, R. B. (2017). Large scale risks from agricultural pesticides in small streams. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7378-7385.
- Tan, F., Wang, M., Wang, W., & Lu, Y. (2008). Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 164-170.
- Thomas, K. (2009). The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints. In *Advances in marine antifouling coatings and technologies* (pp. 522-553): Elsevier.
- Thomas, K. V., & Brooks, S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 26(1), 73-88.
- Thomas, K. V., Blake, S. J., & Waldock, M. J. (2000). Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 40(9), 739-745.
- Thomas, K. V., McHugh, M., & Waldock, M. (2002). Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Science of the Total Environment*, 293(1-3), 117-127.
- Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Toth, S., Becker-van Slooten, K., Spack, L., De Alencastro, L. F., & Tarradellas, J. (1996). Irgarol 1051, an antifouling compound in freshwater, sediment, and biota of Lake Geneva. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(3), 426-433.
- Townsin, R., & Dey, S. (1987). *Developments in the Calculation of Rough Underwater Surface Power Penalties*. Paper presented at the International Symposium on Advanced Research for Ships and Shipping in the Nineties.
- Tsunemasa, N., & Okamura, H. (2011). Effects of organotin alternative antifoulants on oyster embryo. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(1), 128-134.
- Tsunemasa, N., & Okamura, H. (2011). Effects of organotin alternative antifoulants on oyster embryo. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(1), 128-134.

- Tucker, C. S., Hargreaves, J. A., & Boyd, C. E. (2008). Aquaculture and the Environment in the United States. *Environmental Best Management Practices for Aquaculture*, 3-54.
- UN. (2017). *Factsheet: People and Oceans, Marine Pollution, Biodiversity*, . Paper presented at the The Ocean Conference, New York. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/wp-content/uploads/2017/05/Ocean-factsheet-package.pdf>
- USGS. (2010). How much water is there on earth? Retrieved July 10, 2020, from [https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/how-much-water-there-earth?qt-science\\_center\\_objects=0#qt-science\\_center\\_objects](https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/how-much-water-there-earth?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects)
- USS-Constitution-Museum. (2015). Copper Bottomed. *Recoppering the Constitution*. Retrieved July 14, 2020, from <https://ussconstitutionmuseum.org/2015/08/12/copperbottomed/>
- van Den Heuvel-Greve, M. J., Szczybelski, A. S., van Den Brink, N. W., Kotterman, M. J., Kwadijk, C. J., Evenset, A., & Murk, A. J. (2016). Low organotin contamination of harbour sediment in Svalbard. *Polar Biology*, 39(10), 1699-1709.
- Van Houten, B., Hunter, S. E., & Meyer, J. N. (2016). Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 21, 42.
- Vaquero-Fernández, L., Sanz-Asensio, J., López-Alonso, M., & Martínez-Soria, M.-T. (2009). Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking. *Food Additives and Contaminants*, 26(2), 164-171.
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., . . . Roy, D. (2010). How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(3), 135-144.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. *Chemosphere*, 47(7), 789-795.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M., & Lester, J. (1999). Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry*, 13(3), 135-143.
- Wakita, M., Shoudai, K., Oyama, Y., & Akaike, N. (2017). 4, 5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) modifies synaptic transmission in hippocampal CA3 neurons of rats. *Chemosphere*, 184, 337-346.
- Wang, D., Wang, Y., Singh, V. P., Zhu, J., Jiang, L., Zeng, D., . . . Wang, L. (2018). Ecological and health risk assessment of PAHs, OCPs, and PCBs in Taihu Lake basin. *Ecological Indicators*, 92, 171-180.
- Wang, F., Gómez-Sintes, R., & Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, 19(12), 918-931.
- Wang, H., Li, Y., Huang, H., Xu, X., & Wang, Y. (2011). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the Strongylocentrotus intermedius sea urchin embryo test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 692-703.
- Wendt, I., Backhaus, T., Blanck, H., & Arrhenius, Å. (2016). The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 25(5), 871-879.
- Whalen, M. M., Loganathan, B. G., Yamashita, N., & Saito, T. (2003). Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chemico-biological Interactions*, 145(3), 311-319.

- Winner, C. (2012). Barnacles and Biofilms. Retrieved July 30, 2020, from [https://www.whoi.edu/wp-content/uploads/2012/12/ShipHullBacteria9-en\\_258838.jpg](https://www.whoi.edu/wp-content/uploads/2012/12/ShipHullBacteria9-en_258838.jpg)
- Winton, J., Batts, W., DeKinkelin, P., LeBerre, M., Bremont, M., & Fijan, N. (2010). Current lineages of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line are contaminated with fathead minnow, *Pimephales promelas*, cells. *Journal of Fish Diseases*, 33(8), 701-704.
- Xie, L., Dai, Z., Pang, C., Lin, D., & Zheng, M. (2018). Cellular glucose metabolism is essential for the reduction of cell-impermeable water-soluble tetrazolium (WST) dyes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1535.
- Xu, X., Fu, J., Wang, H., Zhang, B., Wang, X., & Wang, Y. (2011). Influence of P-glycoprotein on embryotoxicity of the antifouling biocides to sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*). *Ecotoxicology*, 20(2), 419-428.
- Yamada, H. (2006). Toxicity and preliminary risk assessment of alternative antifouling biocides to aquatic organisms. In *Antifouling Paint Biocides* (pp. 213-226): Springer.
- Yeber, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75-104.
- Zeavida. (2019). New Zealand Sourced Seaweed. Retrieved July 10, 2020, from <https://zeavida.com/>
- Zhang, A. Q., Zhou, G.-J., Lam, M. H., & Leung, K. M. (2019). Toxicities of Irgarol 1051 derivatives, M2 and M3, to two marine diatom species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109455.
- Zhang, A. Q., Zhou, G.-J., Lam, M. H., & Leung, K. M. (2019). Toxicities of Irgarol 1051 derivatives, M2 and M3, to two marine diatom species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109455.
- Zhang, N., Fu, J.-N., & Chou, T.-C. (2016). Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelson with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: experimental design and data analysis using the combination index method. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 97.
- Zhu, Q., Zhang, M., Shi, M., Liu, Y., Zhao, Q., Wang, W., . . . Zhang, L. (2016). Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Immunobiology*, 221(4), 558-567.
- Zoller, U., & Hushan, M. (2010). Synergistic ecotoxicity of APEOs-PAHs in rivers and sediments: is there a potential health risk? *Reviews on Environmental Health*, 25(4), 351-358.

