



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MANİLA KUM MİDYESİ (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*)
KULLANILARAK CİVA (Hg) ALIMINDA MİKROPLASTİKLERİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Ercan SIKDOKUR

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Önder KILIÇ**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 21.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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



Prof. Dr. Murat BELİVERMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Dr. Öğr. Üyesi Olgaç GÜVEN
Akdeniz Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi





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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 30538 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 30538 numaralı İstanbul Üniversitesi BAP Birimi projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Gerek ders aşaması gerekse de tez süresince bilgisini, deneyimini ve sabrını hiç esirgemeyen, çalışmalarında her türlü destek ve imkanı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Önder Kılıç'a en içten saygı ve sevgilerimle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat Belivermiş'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca hep yanımda olan ve yardımlarını hiç eksik etmeyen değerli arkadaşım Uzm. Biyolog Narin Sezer'e çok teşekkür ederim.

Doku analizlerinin gerçekleştirilmesine yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Nihal Ömür Bulan'a, moleküler analizlerin gerçekleştirilmesiyle tez çalışmama katkılarını sunan değerli hocam Doç. Dr. Akın Çayır'a, biyokimyasal analizlerin yapılmasında yardım ve desteğini eksik etmeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat Pekmez'e ve cıva ölçümlerinin gerçekleştirilmesinde desteğini sunan değerli hocam Prof. Dr. Erol Sarı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocam Arş. Gör. Dr. Emre Yemişken'e ve değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Merve Erçin'e, Arş. Gör. Melis Çöremen'e, Arş. Gör. Tuğçe Nagihan Arslan Kaya'ya, Uzm. Biyolog Mert Kesiktaş'a ve Biyolog Esin Öztürk'e tüm yardımları ve destekleri için içten teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve başım her sıkıştığında sorularıma cevap bulduğum Moleküler Hücre Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndan değerli hocalarıma ve yine laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağladıkları için Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan hocalarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürler.

Haziran 2019

Ercan SIKDOKUR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. PLASTİKLER VE ÖZELLİKLERİ.....	3
2.2. MİKROPLASTİKLER	4
2.3. SUCUL EKOSİSTEMLERDE PLASTİK KİRLİLİĞİNİN KAYNAKLARI	5
2.4. PLASTİK KİRLİLİĞİNİN BİYOTAYA ETKİLERİ.....	7
2.5. (MİKRO-)PLASTİKLERİN CANLILAR TARAFINDAN YUTULMASI/BÜNYEYE ALINMASI.....	10
2.6. MİKROPLASTİKLERİN TOKSİK KİRLLETİCİLER İLE ETKİLEŞİMLERİ	15
2.7. KİRLLETİCİLERİN TAŞINIMINDA MİKROPLASTİKLERİN VEKTÖR POTANSİYELİ	18
2.9. DENİZEL ÇEVREDE CİVA KİRLİLİĞİ	20
2.10. CİVANIN BİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİ.....	22
2.11. MODEL ORGANİZMA OLARAK <i>RUDITAPES PHILIPPINARUM</i> (ADAM VE REEVE, 1850)	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. CANLILARIN ELDE EDİLMESİ VE ALIŞTIRMA PERİYODU	29
3.2. STOK SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI	30
3.2.1. Sürfaktan Stok Solüsyonunun Hazırlanması	30
3.2.2. Mikroplastik Stok Solüsyonunun Hazırlanması	30
3.2.3. Cıva Stok Solüsyonunun Hazırlanması	31
3.3. DENEY GRUPLARI	31
3.4. İNKÜBASYON İŞLEMİ.....	33

3.5.	MARUZİYET	33
3.6.	HEDEF KRİTERLER.....	33
3.6.1.	Filtrasyon Oranı.....	33
3.6.2.	Mikroplastik Alımı ve Biyodağılımı	34
3.6.3.	Cıva Alımı ve Biyodağılımı	35
3.6.4.	Histolojik İnceleme	35
3.6.5.	İmmünomodülasyon	36
3.6.5.1.	Dolaşımdaki Total Hemosit Sayısı.....	36
3.6.5.2.	Hemosit Yaşayabilirliği.....	36
3.6.5.3.	Lizozomal Membran Stabilizasyonu.....	37
3.6.6.	Antioksidan Batarya ve Lipid Peroksidasyonu	38
3.6.6.1.	Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lipid Peroksidasyonunun Tayini	40
3.6.7.	Dolaşımdaki Hücre Serbest Nükleik Asitlerin Kantitasyonu	42
3.7.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	45
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	PARTİKÜL SAYISI.....	46
4.2.	HAYATTA KALIM	46
4.3.	MİKROPLASTİK ALIMI VE BİYODAĞILIMI	46
4.4.	CIVA ALIMI VE BİYODAĞILIMI	49
4.5.	FEÇES VE PSÖDOFEÇESLERDE MİKROPLASTİK VARLIĞI.....	52
4.6.	FİLTRASYON ORANLARI	53
4.7.	HİSTOPATOLOJİ	54
4.8.	İMMÜNOMODÜLASYON	66
4.8.1.	Dolaşımdaki Total Hemosit Sayısı	66
4.8.2.	Hemosit Yaşayabilirliği	66
4.8.3.	Lizozomal Membran Stabilizasyonu	67
4.9.	ANTİOKSİDAN BATARYA.....	68
4.9.1.	CAT	68
4.9.2.	GSH	69
4.9.3.	LPO.....	70
4.10.	DOLAŞIMDAKİ HÜCRE SERBEST NÜKLEİK ASİTLERİN KANTİTASYONU	71
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	73
5.1.	STRESÖRLERİN ALIMI.....	73
5.2.	BİYOBELİRTEÇLER	82

5.2.1. Filtrasyon Oranı.....	82
5.2.2. Psödofeçes ve Feçeslerde Mikroplastik Varlığı	85
5.2.3. Histopatolojik Değerlendirme	86
5.2.4. İmmünomodülasyon	88
5.2.5. Antioksidan Batarya	91
5.2.6. Biyobelirteç Olarak Dolaşımdaki Hücre Serbest Nükleik Asit Kantitasyonunun Değerlendirilmesi	95
5.3. SONUÇ	99
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ	147



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: 1950-2013 yılları arasında artan nüfus ve plastik üretim miktarı arasındaki ilişki (Lusher ve diğ., 2017a).....	4
Şekil 2.2: Manila kum midyesi (<i>Ruditapes philippinarum</i>).....	27
Şekil 3.1: Biyometrik ölçümleri tamamlanan manila kum midyeleri.	29
Şekil 3.2: Deney grupları.	32
Şekil 3.3: Filtrasyon oranının değerlendirilmesi.	34
Şekil 3.4: Mikroplastik biyobirikimini incelemek üzere gerçekleştirilen yumuşak doku sindirimi.....	35
Şekil 3.5: Midyeden hemolenf çekimi.	36
Şekil 3.6: Dolaşım sıvısına geçen nükleik asitlerin kökenlendiği çeşitli yolaklar (Swarup ve Rajeswari, 2007).	44
Şekil 4.1: Doku sindirimini ardından filtrelerde biriktirilen kırmızı floresan mikrobuncuklar; Bar 200 µm.	47
Şekil 4.2: Maruziyet sonrası deney gruplarında mikrobuncukların dokulara göre % dağılımı.....	48
Şekil 4.3: Maruziyet sonrası farklı dokulardaki mikrobuncuk birikimi.....	49
Şekil 4.4: Deney gruplarında cıvanın dokulara göre % dağılımı.	51
Şekil 4.5: Dokulardaki cıva biyobirikimi.....	52
Şekil 4.6: Psödofeçes ve feçes ile uzaklaştırılan mikrobuncuklar. Bar: 100 µm.	53
Şekil 4.7: Filtrasyon oranları.....	54
Şekil 4.8: C Deney Grubu: Solungaç dokusunun genel görünümü. F: Solungaç filamentleri; LS: Lateral siller; FS: Frontal siller. Düzenli sil yapısı ve solungaç filamentleri arasında belirgin kontak. H&E, Bar: 100 µm.	56
Şekil 4.9: C Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. S: Siller; G: Goblet hücrelerinde gözlenen şiddetli PAS+ reaksiyon. Düzenli sil yapısı ve solungaç filamentleri arasında belirgin kontak. PAS, Bar: 100 µm.	56

Şekil 4.10: Hg Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. →: Sil yapısında bozulma ve kayıp; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ►: Nekroz. H&E, Bar: 100 µm.	57
Şekil 4.11: Hg Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ►: Lateral sil kaybı; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ☆: Filament yapısında dejenerasyon; G: Goblet hücresi sayısında ve PAS+ reaksiyon şiddetinde azalma. PAS, Bar: 100 µm.	57
Şekil 4.12: MP Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ☆: Filament yapısında dejenerasyon; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 µm.	58
Şekil 4.13: MP Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; G: Goblet hücreleri ve kuvvetli PAS+ reaksiyonu. PAS, Bar: 100 µm.	58
Şekil 4.14: Co-Exp Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 µm.	59
Şekil 4.15: Co-Exp Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; →: Sil yapısında bozulma ve kayıp. Goblet hücreleri sayısında ve PAS+ şiddetinde azalma. PAS, Bar: 100 µm.	59
Şekil 4.16: Inc Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ◆: Hemosit infiltrasyonu; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı. H&E, Bar: 100 µm.	60
Şekil 4.17: Inc Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 100 µm.	60
Şekil 4.18: C Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; PT: Primer tübül; S: Sil yapıları; BH: Bazofilik hücreler; EH: Eosinofilik hücreler. H&E, Bar: 100 µm.	61
Şekil 4.19: C Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; TL: Tübül lümeni; S: Sil yapıları; E: Epitel tabaka; G: Goblet hücreleri ve kuvvetli PAS+ reaksiyon. PAS, Bar: 100 µm.	61
Şekil 4.20: Hg Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ►: Nekroz; AT: Tübüler atrofi. H&E, Bar: 200 µm.	62
Şekil 4.21: Hg Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 100 µm.	62
Şekil 4.22: MP Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 µm.	63

Şekil 4.23: MP Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; E: Epitel tabaka; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 200 µm.....	63
Şekil 4.24: Co-Exp Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; ♦: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 200 µm.....	64
Şekil 4.25: Co-Exp Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; PT: Primer tübül; G: Goblet hücreleri sayısında ve PAS+ reaksiyon şiddetinde azalma. PAS, Bar: 200 µm.....	64
Şekil 4.26: Inc Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. AT: Tübüler atrofi; ►: Nekrotik alan. H&E, Bar: 100 µm.	65
Şekil 4.27: Inc Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. AT: Tübüler atrofi; ST: Sindirim tübülü; G: Goblet hücreleri sayısında azalma. PAS, Bar: 200 µm.	65
Şekil 4.28: Dolaşımdaki total hemosit sayısı.	66
Şekil 4.29: Hemosit yaşayabilirliği.	67
Şekil 4.30: Lizozomal membran stabilizasyonu.	68
Şekil 4.31: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan CAT aktiviteleri.....	69
Şekil 4.32: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan GSH düzeyleri.	70
Şekil 4.33: Solungaç ve sindirim bezinde lipid peroksidasyonu.....	71
Şekil 4.34: Dolaşımdaki hücre serbest DNA konsantrasyonu.	72
Şekil 4.35: Dolaşımdaki hücre serbest RNA konsantrasyonu.	72
Şekil 4.36: Dolaşımdaki hücre serbest miRNA konsantrasyonu.	72
Şekil 5.1: Midyelerde maruz bırakılan mikrobuncuklar haricinde saptanan diğer mikroplastikler. A: Mavi mikrofibril ve mikrobuncuk; B: Mavi fragment; C: Renksiz film; D: Renksiz fragment.	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Bir hafta süresince polietilen mikrobuncuklara maruz bırakılan midyelerde mikropplastiklerin dokulara göre dağılımları (Filtre sayısı=3).	47
Tablo 4.2: Maruziyet sonrası midye dokularındaki cıva konsantrasyonları, ng/g d.w. ⁻¹ , (n=3).	50
Tablo 4.3: Filtrasyon oranları, l midye ⁻¹ saat ⁻¹	54
Tablo 4.4: Dolaşımdaki total hemosit sayısı, hemosit ml hemolenf ⁻¹	66
Tablo 4.5: Hemosit yaşayabilirliği, %.	67
Tablo 4.6: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan CAT aktiviteleri, U mg protein ⁻¹	68
Tablo 4.7: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan GSH düzeyleri, µg GSH mg protein ⁻¹	69
Tablo 4.8: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan MDA düzeyleri, nmol MDA g f.w. ⁻¹	70
Tablo 4.9: Hemolenf sıvısında saptanan hücre serbest nükleik asit (DNA, RNA, miRNA) konsantrasyonları, ng ml hemolenf ⁻¹	71

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
l	: Litre
nm	: Nanometre
μm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
ng	: Nanogram
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
M	: Molar
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece

Kısaltmalar	Açıklama
MP	: Mikroplastik Deney Grubu
Hg	: Cıva
C	: Kontrol Deney Grubu
Co-Exp	: Co-Exposure (Birlikte Maruziyet) Deney Grubu
Inc	: İnkübe Deney Grubu
PE	: Polietilen
PS	: Polistiren
PA	: Poliamid
PP	: Polipropilen
PVC	: Polivinil klorür
Cd	: Kadmiyum
Pb	: Kurşun

As	: Arsenik
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Cr	: Krom
Ag	: Gümüş
MeHg	: Metil Cıva
HBCHD	: Hexabromocyclododecane
PCB	: Polychlorinated biphenyls
BaP	: Benzo[a]piren
MT	: Metallotiyonin
miRNA	: MikroRNA
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
GST	: Glutasyon S-transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Reduktaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
d.w.	: Dry weight (kuru ağırlık)
f.w.	: Fresh weight (ıslak ağırlık)
ccf-DNA	: Dolaşımdaki hücre serbest DNA (circulating cell-free DNA)
ccf-RNA	: Dolaşımdaki hücre serbest RNA (circulating cell-free RNA)
ccf-miRNA	: Dolaşımdaki hücre serbest miRNA (circulating cell-free miRNA)
H&E	: Hemotoksilen & Eozin
PAS	: Periyodik Asit-Schiff

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MANİLA KUM MİDYESİ (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*) KULLANILARAK CIVA (Hg) ALIMINDA MİKROPLASTİKLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Ercan SIKDOKUR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Önder KILIÇ

Günümüzün en önemli çevresel sorunlarından birisi olan plastik kirliliğinin ekosistem ve biyotaya yönelik etkileri henüz anlaşılmakta olup özellikle sucul ekosistemlerde her geçen gün büyüyen bir sorun haline gelmektedir. Çeşitli kaynaklardan kökenlenen birtakım mekanizmalar sonucu denizel ortamda önemli miktarlarda bulunan, boyutları 1 µm-5 mm arasında değişen plastik materyaller mikroplastik olarak tanımlanmaktadır. Bu partiküllere doğrudan ya da dolaylı maruziyet organizmalar üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bilindiği üzere sucul ortamdaki plastik maddeler metal, PAH ve PCB gibi diğer kirleticiler ile etkileşime girerek bu kirleticilerin organizmalar tarafından alım düzeylerine etki edebilmektedir. Bunun yanı sıra kirleticileri yüzeylerinde biriktirerek canlılara taşınımında vektör potansiyeline sahip bir matris olarak rol oynayabilmektedir.

Bu çalışma kapsamında *Ruditapes philippinarum* türü midyeler görece çevresel konsantrasyonlarda mikroplastik ve cıvaya yalnız, birlikte ve inkübe şekilde olmak üzere farklı deney senaryoları ile bir hafta süresince maruz bırakılmıştır. Daha sonra stresörlerin alımı ve biyodağılımlarının yanı sıra cıvanın organizmaya taşınımında mikroplastiklerin rolü değerlendirilmiştir. Ayrıca manila kum midyesinde filtrasyon oranları, immünomodülasyona

ve oksidatif strese dönük biyobelirteçler ve histolojik değişimler incelenmiştir. Bununla beraber, çalışmada çeşitli hücre yolaklarından köken alan dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin (ccf-DNA, ccf-RNA, ccf-miRNA) düzeyleri ele alınmıştır.

Sonuç olarak mikroplastiklerin manila kum midyeleri tarafından filtre edilerek biriktirilebildiği, çeşitli dokulara transloke olabildiği ve cıvanın alım düzeylerini modüle edebildiği gözlemlenmiştir. Ancak bu partiküllerin cıvanın biyotaya taşınımında düşük düzeyde bir vektör role sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca stresör baskısı altındaki canlılarda filtrasyon oranının önemli şekilde etkilendiği saptanmıştır. Her iki kirleticinin de organizmaların immünolojik durumunu etkileyebileceği gösterilmiştir. Oksidatif stres açısından ise deney grupları arasında bir farklılığa rastlanmazken, histolojik incelemede solungaç ve sindirim bezinde çeşitli patolojiler belirlenmiştir. Model organizma üzerinde kullanılan stresör konsantrasyonları ve seçili maruziyet süresinin dolaşımdaki hücre serbest nükleik asit düzeyleri açısından anlamlı bir farka yol açmadığı gözlemlenmiştir.

Haziran 2019, 164 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mikroplastik, Polietilen, Cıva, Biyobirikim, Biyobelirteç, *Ruditapes philippinarum*

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF ROLE OF MICROPLASTICS ON MERCURY UPTAKE USING BY MANILA CLAM (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*)

Ercan SIKDOKUR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Önder KILIÇ

Plastic pollution, which is one of the most important environmental problems at the present time, has been understood more recently and the effects of this pollution on the ecosystem and biota becoming a growing problem especially in the aquatic ecosystems. Microplastic is defined to be plastic particles in the range of the size between 1 μm – 5 mm which is originated from the various sources and found a large amount in the marine environment due to some mechanisms. Direct or indirect exposure to those particles leads to adverse effects on organisms. As well known plastic materials in the aquatic environment interact with the other pollutants such as metals, PAHs and PCBs, which can affect the uptake levels of those pollutants by organisms. Besides, as known that plastics can play a role as a matrix with vector potential by accumulating pollutants on their surfaces and transporting them to living organisms.

In the present study, the clams *Ruditapes philippinarum* were exposed to polyethylene microbeads and mercury single, combined and incubated form environmentally relative

concentrations for a week in controlled laboratory conditions. Afterwards, the uptake and tissue distribution of the stressors, as well as the microplastics' role on the transport of mercury to the organisms, were investigated. Moreover, filtration rates, biomarkers for immunomodulation and oxidative stress and histopathological alterations were evaluated. Additionally, the effects of microplastics and mercury on the levels of circulating cell free nucleic acids (ccf-DNA, ccf-RNA, ccf-miRNA) in clam tissues originating from various cellular pathways were discussed in the study.

As a result, it was observed that microplastics can be accumulated through filtering by Manila clams, translocated to various tissues and modulated uptake levels of mercury. However, it was seen that these particles have a vector role at low level on the transporting of mercury to the biota. Furthermore, the important effects in terms of filtration rates were observed in the clams that exposed to stressors at the aforementioned experimental scenarios. In the study, it was shown that both pollutants can affect the immunomodulation of organisms. While there was no differences among the treatment groups in terms of oxidative stress parameters, significant histopathological alterations were determined in gill and digestive gland tissue of clam. It was also observed that the microplastics and mercury did not lead to a significant alteration in terms of circulating cell-free nucleic acids levels.

June 2019, 164 pages.

Keywords: Microplastics, Polyethylene, Mercury, Bioaccumulation, Biomarkers, *Ruditapes philippinarum*

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasının en önemli kullanım araçlarından biri olan plastiklerin üretimi her geçen yılla birlikte rekor düzeylere ulaşmakta ve gelecek trendler dikkate alındığında da bu artışın hız kesmeden devam edeceği öngörülmektedir (Jambeck ve diğ., 2015). Üretilen plastik materyalin büyük çoğunluğu hızlıca atığa dönmekte ve başta uygun olmayan atık yönetimleri olmak üzere birçok yolakla beraber çevresel kompartımanlarda birikmektedir. Çeşitli polimer tiplerine ve yoğunluğa sahip bu materyaller ya birtakım amaçlarla oldukça küçük boyutlarda üretilmekte (primer mikroplastikler) ya da büyük plastik enkazın mikrobiyal degradasyon, UV ışınları, asidite, turbasyon vb. mekanizmalarla su ortamında daha küçük boyutlara (sekonder mikroplastikler) parçalanmasıyla meydana gelmektedir (Andrady ve diğ., 2011). Boyutları 1 µm-5 mm arasında değişen plastikler mikroplastik olarak tanımlanmaktadır. Su kolonundan sedimente değin çevrede birikim gösteren bu partiküller başta sucul ekosistemlerde olmak üzere biyota ile çeşitli şekillerde etkileşime girerek canlılar için büyük tehdit içermekte ve önemli bir risk durumu doğurmaktadır. Bu partiküller ile etkileşimler sonucu organizma düzeyinden popülasyon ve ekosistem düzeyine kadar ciddi negatif etkiler meydana gelmektedir. Canlıların bu maddelere dolanması ya da benzeri dolaylı etkileşimler sonucu ekstremitte kayıpları oluşmakta ve organizmaların hastalıklara karşı daha duyarlı hale gelmesi gibi durumlar söz konusu olmaktadır. Bu partiküllerin yutulması sonucunda ise canlılarda besin arama ve avlanma davranışları değişebilmekte, büyüme, vücut dengesi ve üreme üzerine önemli olumsuzluklar görülmekte, oksidatif stres ve doku patolojileri meydana gelmekte ve genotoksik etkiler görülmektedir (de Stephanis ve diğ., 2013; Sussarellu ve diğ., 2016; Jeong ve diğ., 2017; Détrée ve Gallardo-Escárate, 2017; Bråte ve diğ., 2018a; Seuront, 2018). Ayrıca plastikler; çeşitli canlıların kolonileşebileceği substratlar olmanın yanı sıra patojen veya istilacı türlerin yayılımlarında vetkör bir role sahiptir (Zettler ve diğ., 2013; Goldstein ve diğ., 2014). Başka bir endişe verici durum ise mikroplastiklerin su ortamındaki diğer kirleticileri yüzeylerinde biriktirerek bu kirleticilerin organizmaya taşınımında potansiyel bir vektör role sahip olmasıdır (Cole ve diğ., 2011). Bu vektör etki sonucu mikroplastik ile birlikte ilintili kirleticilere karşı da organizma üzerinde ciddi negatif cevaplar meydana gelebilmektedir.

Cıva canlılar için gerekli olmayan ve düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki gösterebilen bir elementtir. Volkanik aktiviteler ve jeolojik depozisyon vb. yollarla doğal olarak oluşabilmenin yanı sıra başta madencilik faaliyetleri ve fosil yakıtların kullanımıyla beraber küresel cıva konsantrasyonları her geçen yıl artış göstermektedir (Streets ve diğ., 2009). Son 500 yılda okyanus yüzeyindeki cıva konsantrasyonları 4 katına, sanayi devriminden bu yana ise 2 katına çıkmıştır (Chen ve diğ., 2012). Endüstriyel atıklar ve yüzey erozyonu ile nehirlerle önemli düzeyde cıva konsantrasyonu girdisi olup söz konusu nehirler aracılığıyla da okyanuslara taşınmaktadır. Volkanik aktiviteler, fosil yakıtların kullanımı vb. şekilde meydana gelen cıva ise atmosferle taşınarak denizlerde birikim göstermektedir. Besin zinciri boyunca yükseltgenebilen cıva başta gıda güvenliği temelli kaygılara neden olarak insan ve çevre sağlığına dönük önemli etkileri olan toksik bir elementtir. Maruz kalan canlılarda nörotoksisiteye, denge kaybına, büyüme ve gelişmede ciddi gerilemeye, oksidatif strese ve genotoksisiteye yol açmaktadır.

Denizel ekosistemin önemli organizmalarından olan manila kum midyesi *Ruditapes philippinarum* geniş alanlara yayılımları, uzun yaşam döngüsü, elde etmedeki kolaylıkları ve kirleticileri bünyesinde biriktirmeleri nedeniyle biyomonitor olarak da faydalanan ekonomik öneme sahip bir bivalv türüdür.

Bu çalışmanın “Genel Kısımlar” bölümünde (mikro-)plastikler ve özellikleri, sucul ekosistemdeki plastik kirliliğinin kaynakları, biyota ve ekosistem üzerine etkileri ve su ortamındaki diğer kirleticiler ile etkileşimlerinin yanı sıra denizel çevrede cıva kirliliği ve cıvanın biyota üzerine etkileri ele alınmıştır.

“Malzeme ve Yöntem” kısmında canlıların elde edilmesi, deney düzeneği ve maruziyet süreci aktarılırken, hedef kriterler sunulmuş ve gerçekleştirilen analizler detaylı şekilde anlatılmıştır.

“Bulgular” kısmında söz konusu hedef kriterlere dair elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

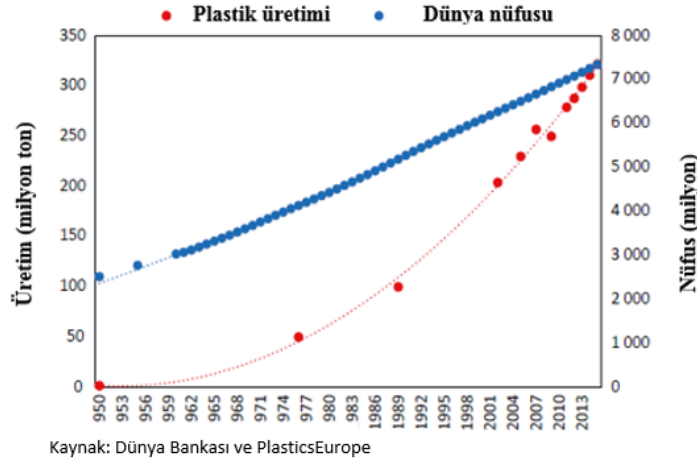
“Tartışma ve Sonuç” kısmında ise stresörlerin alımı ve meydana gelen toksisite ile ilgili biyobelirteçler özelinde tartışılmış, daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırması yapılarak yorumlanmış ve tez çalışmasının literatüre katkısı belirtilerek sonuca dair çıktılar vurgulanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PLASTİKLER VE ÖZELLİKLERİ

Plastikler fosil kaynaklardan ya da selüloz vb. organik ürünlerden türetilen, çeşitli monomerlerin uzun zincirli yapılara dönüştürülmesiyle elde edilen sentetik ve yarı sentetik materyallerdir ve günümüz dünyasının önemli kullanım araçlarından (Andrady ve Neal, 2009). Birçok alanda yararlandığımız bu materyallerin 2. Dünya Savaşı'nı takip eden yıllarla beraber gündelik yaşamdaki yeri de artmaya başlamıştır (Thompson ve diğ. 2009). Plastik materyallerden telekomünikasyon, sağlık, tekstil, otomotiv, ambalaj, yapı sanayi ve kozmetik sektörleri gibi birçok alanda faydalanılmaktadır. Ucuz olmaları, korozyon ve suya dayanıklılıkları, kolay biçimlendirilebilmeleri gibi birçok avantajı olan bu malzemelerin, üretiminde yenilenebilir kaynakların kullanılmaması, geri dönüşümündeki yüksek maliyet ve degradasyona karşı yüksek direnci başta olmak üzere birçok dezavantajı da mevcuttur (Phuong ve diğ. 2016).

Yıllık plastik üretimi 1950'li yıllarda 1,5 milyon tonken, bu rakam her yıl yaklaşık %9 oranında artarak 2017 yılı itibarıyla 348 milyon tonu geçmiştir (PlasticsEurope, 2018) ve söz konusu üretimin 2025 yılında iki, 2050 yılında ise üç katına çıkacağı düşünülmektedir (Lusher ve diğ., 2017a). Üretilen plastik miktarının sadece %40'ı çoğunluğu tek kullanımlık olan ve hızlı bir şekilde atığa dönen ambalaj malzemeleri olup denizel ortamdaki çöplerin yaklaşık %80-85'ni oluşturmaktadır (Auta ve diğ. 2017; Geyer ve diğ., 2017). Yapılan bir araştırmaya göre sadece 2010 yılında 4,8-12,7 milyon ton plastiğin sucul ortama karıştığı rapor edilmiştir (Jambeck ve diğ. 2015). Bugüne kadar yaklaşık 8,300 milyon metrik ton ham plastiğin üretildiği, bu miktarın %79'nun atık toplama tesisleri ya da çevresel kompartımanlarda varlığını devam ettirdiği ve bu trendin devamlılığı durumunda 2050 yılında 12,000 ton plastik atığın çevrede birikim göstereceği düşünülmektedir (Geyer ve diğ. 2017).



Şekil 2.1: 1950-2013 yılları arasında artan nüfus ve plastik üretim miktarı arasındaki ilişki (Lusher ve diğ., 2017a).

2.2. MİKROPLASTİKLER

Su ortamında büyük boyutlu plastik maddelerin fragmentasyon süreci çok uzun yıllar alabilmektedir (Bagheri ve diğ. 2017). Plastikler su ortamında uzun süreler mevcudiyetlerini devam ettirse de bir takım parçalanma süreçlerine tabiidir. Doğaya karışan plastik materyaller UV ışınları, sıcaklık, asidite, turbasyon, mikrobiyal degradasyon gibi mekanizmalarla daha küçük boyutlara parçalanabilmektedir (Andrady, 2011). Mikroplastik kirliliği diye bilinen bu problem ya büyük plastik enkazın sözü geçen mekanizmalarla daha küçük boyutlara parçalanması (sekonder mikroplastikler) ya da birtakım amaçlar için üretilen mikron boyutlardaki plastiklerin (primer mikroplastikler) çevresel kompartımanlara girmesiyle meydana gelir. Primer mikroplastiklere birçok örnek verilebilir. Yüz bakım ürünlerinden duş jellerine, diş macunlarından makyaj malzemelerine, boya sanayiiden medikal ürünlere kadar geniş bir kullanım yelpazesi vardır (Fendall ve Sewell, 2009). Su otamındaki büyük plastik enkazın fragmentasyonu haricinde diğer sekonder mikroplastik kaynakları ise sentetik giysilerden kökenlenen mikrofibriller ve sentetik lastik yapıların (road dust) aşınmasıdır (Abbasi ve diğ., 2017; Browne ve diğ., 2011). Özetlemek gerekirse boyutları 1µm-5mm arasında, primer ya da sekonder orjinli, suda çözünmeyen sentetik sert polimerik matriksler mikroplastik olarak tanımlanmaktadır (Frias ve Nash, 2019).

Plastikler polietilen (PE), poliamid (PA), polistiren (PS), polivinil klorid (PVC) gibi geleneksel polimer tiplerinin yanı sıra polikarbonat (PCA), polilaktid (PLA), polihidroksibutirat (PHB) gibi “biyobozunur” olarak nitelenen polimer yapılarından meydana

gelmektedir. Örneğin PE daha çok ambalaj ürünlerinin yapısında, PS başta balıkçılıkta kullanılan strafor malzemelerin üretiminde ve yapı malzemelerinde, PVC ise sert plastik malzemelerin yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca bu sentetik yapıların her birine ısıya dayanıklı olması, sert bir yapıda olması vb. amaçlarla üretim süreçlerinde farklı katkı maddeleri dahil edilebilmektedir. Dolayısıyla farklı polimer tipleri farklı yoğunluklara sahiptir.

Mikroplastikler yoğunluklarına bağlı olarak suda ya batma ya da yüzmeye eğilimi göstermektedirler. Plastik malzemelerin %46'sı normal şartlarda suda batmama eğilimindedir (Lattin ve diğ., 2004). Yine de plastiklerin yüzeyinde meydana gelen mikrobiyal kolonizasyon, biyofilm oluşumu gibi faktörler bu partiküllerin yoğunluğunu artırarak su kolonu boyunca batmasına neden olmaktadır (Rummel ve diğ., 2017). Çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi altında deniz yüzeyinden sedimente geçen su kolonunun her seviyesinde mikroplastik partiküllere rastlanılmaktadır (Vianello ve diğ., 2013; Cózar ve diğ., 2015). Mikroplastiklerin yoğunlukları onlara maruz kalan canlıların ekolojileri açısından önemlidir, zira yüzmeye eğiliminde olan polimerler daha çok pelajik canlılar tarafından yutulurken, bentik canlılar daha çok deniz dibindeki partiküllere maruz kalmaktadır (Wright ve diğ., 2013a; Karami, 2017).

2.3. SUCUL EKOSİSTEMLERDE PLASTİK KİRLİLİĞİNİN KAYNAKLARI

Deniz ekosistemindeki plastik çöpler birçok kaynaktan köken almaktadır. Buna başta evsel ve endüstriyel atıklar olmak üzere, balıkçılık faaliyetleri, turizm, denizcilik ve taşımacılık sektörleri, kozmetik, boya, temizlik, tekstil sanayi gibi birçok kaynak sıralanabilir (Topçu ve diğ., 2013; Galgani ve diğ., 2015). Nehirler de daha iç bölgelerden denizlere plastik taşınımında önemli rol oynamaktadır (Lebreton ve diğ., 2017). Örneğin Avrupa'nın ikinci büyük nehri olan Tuna Nehri'nden Karadeniz'e yıllık 1500 tondan fazla mikroplastığın karıştığı düşünülmektedir (Lechner ve diğ., 2014). Yağış ve iklim olayları da plastiklerin su ortamına karışmasında etmendir. Yağmur sezonu ile sucul ortamdaki mikroplastik kirliliği arasında pozitif ilişki gözlemlendiği belirtilmiştir (Yonkos ve diğ., 2014). Okyanuslardaki plastik kontaminasyonunun %7'sinin sadece rüzgar hareketleriyle karadan sucul ortama taşınan partiküllerden meydana geldiği tahmin edilmektedir (Boucher ve Friot, 2017). 2017 yılında Paris'te gerçekleştirilen ve iç-dış mekanların incelenmesini içeren bir çalışmada mevcut atmosferik tozda %33 oranında mikroplastik varlığı rapor edilmiştir (Dris ve diğ., 2017).

Ayrıca mikroplastiklerin meteorolojik dinamiklere bağlı olarak insan etkisinin düşük olduğu coğrafyaları dahi atmosferik serpinti ile kontamine hale getirebildiği gösterilmiştir (Allen ve diğ., 2019). Bir kontaminasyon yolağı olarak atmosferik tozda mevcut olan bu sentetik materyaller insan sağlığı açısından da bir risk kaynağı durumu doğurmaktadır (Prata, 2018). Küresel ölçekte bakıldığında ise mikroplastik kirliliği ile nüfus yoğunluğu arasında pozitif bir ilişki olduğu ortaya konulmuş olmakla birlikte, insan varlığının bulunmadığı coğrafyalarda dahi plastik atıklara rastlanmaktadır (Browne ve diğ., 2011; Perez-Venegas ve diğ., 2017). Yapılan bir araştırmada tek bir polyester tekstil ürününden her yıkamada 1900'den fazla mikrofibril salındığı ve bu sentetik fibrillerin nihayetinde atık su deşarjları ile su ortamına karıştığı ifade edilmiştir (Browne ve diğ., 2011). Atık su toplama tesisleri her ne kadar plastiklerin su ortamına karışmamasında %98 oranına kadar verim sağlayabilse de günde 65 milyon mikroplastığın bu şekilde denizel ortama giriş yaptığı tahmin edilmektedir (Murphy ve diğ., 2016). Bir diğer tahmin ise; sadece ABD'de atık su arıtma tesislerinden her gün 8 trilyon mikroboncuğun sucul ortama karıştığı yönündedir (Rochman ve diğ., 2015). Bununla birlikte Nizzetto ve diğ. (2016) tarafından işaret edildiği üzere Avrupa boyunca atık su arıtma tesislerinden elde edilen çamurun tarımsal amaçlı gübre olarak kullanılmasıyla 430.000 tona kadar mikroplastığın tekrardan çevreye geri döndüğü düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada ABD'deki nüfusun özellikle kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinden oluşan, günlük kişi başı ortalama mikroplastik kullanımının 2,4 mg olduğu belirtilmiştir (Gouin ve diğ., 2011). Bir diğer tahmine göre ise su ortamındaki mikroplastiklerin tüm plastik atıkların %92'sinden fazlasına karşılık geldiği ve dünya sularında 5,25 trilyon plastik partikülün yüzdüğü düşünülmektedir (Eriksen ve diğ., 2014).

Avrupa Birliği denizlerin kalitesini iyileştirmek amacıyla 17 Haziran 2008 tarihi itibarıyla Deniz Stratejisi Çerçeve Direktifi'ni hayata geçirmiştir. Denizlerdeki kirlilik durumunu minimuma indirmek ve ekosistem sağlığını optimum kılmak üzere 11 adet başlığın geliştirilmesini amaçlayan bu direktif dahilinde; sular ve ilişkili ekosistemlerin sağlığını korumak temel kaygısıyla, denizel atıkların ve mikroplastiklerin zamansal ve mekânsal eğilimlerini takip etmek, kirliliğin boyutunu tespit etmek ve bu kirleticilerin çevre üzerindeki etkisini saptamak amaçlanmaktadır (EU, 2008)

Çevresel kompartımanlarda bulunan mikroplastikler farklı kaynaklardan köken almaktadır. İzleme çalışmalarında saptanan mikroplastikler tip, renk, şekil, büyüklük ve polimer karakteri

gibi birtakım kriterlere göre kategorize edilmektedir (Hidalgo-Ruz ve diğ., 2012). Bu kriterler canlıların mikroplastiklere maruz kalma davranışlarında söz sahibi etmenlere dönük bize bilgiler sunması açısından önemlidir. Ayrıca doğal çevrede var olan plastiklerin polimerizasyon karakterinin yapılması, geldikleri kaynak/kullanım alanı hakkında fikir vermesi açısından da önem teşkil etmektedir. Polimer tiplerinin tayini FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre), Raman Spektroskopisi ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) gibi bir takım enstrümantal cihazlarla yapılabilmektedir (Shim ve diğ., 2017).

2.4. PLASTİK KİRLİLİĞİNİN BİYOTAYA ETKİLERİ

Okyanuslardan nehirlerle, su yüzeyinden sedimente, kutup bölgelerinden göllere kadar birçok habitatta mikroplastik kirliliğine rastlanılmaktadır (Claessens ve diğ., 2011; Obbard ve diğ., 2014; Aytan ve diğ., 2016; Peng ve diğ., 2018; Sighicelli ve diğ., 2018). Dolayısıyla zooplanktondan filtre ederek beslenen canlılara, pelajik ve dip balıklarından deniz kaplumbağalarına, kuşlardan deniz memelerine kadar birçok tür plastik kirliliğinden mustarıptır (Van Franeker ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2015; Lusher ve diğ., 2015; Santos ve diğ., 2015; Güven ve diğ., 2017). 2016 Birleşmiş Milletler Raporu'nda 800'ün üzerinde hayvan türünün yutma (ingestion) ya da dolanma (entanglement) şeklinde plastik maddeler ile etkileşime girdiği ve bu 800 türün 220'sinin mikroplastikleri doğal ortamlarında bünyelerine aldığı belirtilmiştir (UNEP, 2016). Deniz canlıları çoğunlukla büyük plastik materyallere dolanarak ve daha küçük plastik maddelere ise yutarak/filtrasyon ile maruz kalmaktadır (Katija ve diğ., 2017; Foekama ve diğ., 2013).

En bilinen dolaylı maruz kalma hayalet balıkçılık kavramıdır (Antonelis ve diğ., 2011). Son yıllarda balıkçılıkta kullanılan doğal materyaller yerini sentetik materyallere bırakmıştır. Deniz ortamındaki canlılar azımsanmayacak miktardaki suda unutulmuş, bırakılan ya da kopan ağlara dolanmakta ve bu yüzden de canlılıklarını sürdürememektedir (Kühn ve diğ., 2015). Dolandıkları materyaller balıkların yüzerliklerine etki ederek onların ya kolay av olmalarına veya besin bulamamalarına sebebiyet vermektedir. Örneğin sadece deniz kaplumbağalarında balıkçılık etkileşimleri sonucu ölümler %83,9 ile en büyük paya sahiptir (Santos ve diğ., 2016).

Deniz kaplumbağaları gibi tehlike altında olan türler açısından yuvalama alanı olarak kullanılan kumsallar kritik önem taşımaktadır. Bu lokasyonlar hali hazırda kıyı turizmi ve deniz seviyesinin yükselmesi gibi tehditlerin yanı sıra plastik kirliliğinin de etkisi altındadır. Bu alanlardaki plastik atıklar ebeveynlerin yumurtalarını bırakmasına engel olmakla beraber yavruların ise yumurtadan çıkabilme ve denize ulaşma başarılarına negatif yönde etki etmektedir (Do Sul ve diğ., 2011; Gündoğdu ve diğ., 2019). Bazı deniz canlılarının üremelerinde sıcaklık kritik faktördür. Örneğin bu gibi türlerde doğacak yavru bireylerin cinsiyeti sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Yuvalama alanlarındaki plastik miktarı kumun sıcaklık değerlerine etki edebilmekte olup yavruların cinsiyet dağılımını değiştirebilme potansiyeli taşımakta; dolayısıyla popülasyonun geleceği açısından bir tehdit oluşturabilmektedir (Carson ve diğ., 2011).

Doğada atık halinde olan plastik materyal ayrıca deniz kuşlarını da ciddi düzeyde etkilemektedir. Deniz kuşlarının sindirim sisteminde plastiğe rastlanma sıklığı 1980 öncesi %10 dolaylarındayken, bugün bu oranın %90'larda seyrettiği görülmektedir (Wilcox ve diğ., 2015). Plastikler ayrıca kuş yuvaları için birer inşa malzemesi rolü oynamaktadır ve bu da yavru bireylerin geleceğine dönük potansiyel olumsuzluklara sebep olmaktadır (Bond ve diğ., 2012). Canlıların plastiklere dolanması sonucu deri lezyonları oluşabilmekte ve ekstremitte kayıpları meydana gelebilmektedir. Su ortamında ise mikrofibrillerin midyelerin manto ve ayak gibi organlarına yapıştığı ve canlıların sadece solunum ve sindirim sistemi vasıtasıyla değil aynı zamanda yapışma (adherance) yoluyla da mikropplastiklere maruz kaldığı gösterilmiştir (Kolandhasamy ve diğ., 2018). Mikrofibrillerin yutulmasının biyota üzerine önemli stres etkileri olmakla beraber (Welden ve diğ., 2016); yutulmasa dahi organizmalar için ciddi morfolojik hasarlara neden olabilmektedir (Ziajahromi ve diğ., 2017).

Plastik kirliliği deniz tabanındaki canlıları da tehdit etmektedir. Deniz dibini kaplayan plastik materyal ortamın ışık alımını engelleyerek bir süre sonra buradaki canlılığın sonlanmasına neden olabilmektedir. Örneğin Hawaii mercan resiflerinin %80'i plastikle kaplıdır ve kolonilerin birçoğu artık ölmüş durumdadır (Yoshikawa ve Asoh; 2004). Mercanlar bulundukları habitat için oldukça önemli canlılardır. Diğer türlerin parazitlerinden arındığı temizlik istasyonu olan bu koloniler, ek olarak birçok canlı için üreme, saklanma ve yuvalama yeri temin etmektedir. Mercanların ölmesiyle beraber bu türlerde dolaylı olarak plastik kirliliğinden etkilenmektedir. Lamb ve diğ. (2018) tarafından plastik materyallerle

etkileşimleri sonucu mercan yapılarının fiziksel yaralanmalara ve patojenlere karşı daha savunmasız hale geldiği ve hastalıkların görülme sıklığında artış gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Sudaki mikroplastik varlığı alg patlamalarına ve sedimentasyon oranlarına etki ederek pelajik ve bentik hayvanların besin teminine müdahale potansiyeli taşımanın yanı sıra (Long ve diğ., 2015), denizel ekosistemin birincil üreticileri üzerinde de negatif etkilere yol açmıştır. *Chlorella* ve *Scenedesmus* türleri üzerinde gerçekleştirilen laboratuvar çalışmasında, mikroplastiklerin alglerle etkileşimi neticesinde hava akışı ve ışığın muhtemel engellenmesi sonucu fotosentez aktivitesinin azaldığı ve reaktif oksijen üretiminde de artış görüldüğü ifade edilmiştir (Bhattacharya ve diğ., 2010). Yine bir mikroalg *Skeletonema costatum*, 1 µm ve 1 mm olmak üzere iki farklı büyüklükte mikroplastiklere maruz bırakıldığında mikron boyutlu plastiklerin büyüme oranını %40'a kadar inhibe ettiği, daha büyük mikroplastiklerin ise herhangi bir etkide bulunmadığı görülmüştür (Zhang ve diğ., 2017a). Başka bir çalışmada artan mikroplastik konsantrasyonu ile beraber bir makrofit *Myriophyllum spicatum*'un sürgün uzunluğunun azaldığı, nanoplastik maruziyeti sonucunda ise hem *M. spicatum* hem de *Elodea* sp.'de sürgün/kök biyokütle oranının azalma gösterdiği rapor edilmiştir (Van Weert ve diğ., 2019). Bahsi geçen araştırmalarda kullanılan konsantrasyonlar çevresel değerlerden oldukça yüksek olmakla beraber denizel ortamda artan kirliliğin birincil üretim üzerine potansiyel etkilerinin gerçekçi senaryolar üzerinden araştırılması ihtiyaç başlıklarından biri olarak güncelliğini korumaktadır. Örneğin Troost ve diğ. (2018) tarafından Kuzey Denizi için plastiklerin birincil üretim üzerine etkisini ekosistem düzeyinde ele alan bir biyojeokimyasal modelleme geliştirilmiş ve plastik kirliliğinin mevcut izleme verileri ile değerlendirildiğinde birincil ve ikincil üretime dönük bu ölçekte bir olumsuz etkisinin henüz olmadığı belirtilmiştir. Sucul ortama karışan plastik çöplerin ise ayrıca gelen güneş ışığında kırılmalara yol açarak su kolonunun sıcaklığında dalgalanmalara sebep olabileceği; solar radyasyona dönük bu müdahalenin okyanus yüzeyine yakın derinliklerde fiziksel süreçleri etkileyebilme potansiyeli taşıdığı ise VishnuRadhan ve diğ. (2019) tarafından ifade edilmiştir.

Deniz ortamındaki mikroplastikler ayrıca mikrobiyal canlıların kolonileştiği ve yumurtaların biriktiği yeni bir substrat olarak da rol oynamaktadır (Wright ve diğ., 2013a). Mikroorganizmalar açısından yüzer habitatlardır (Reisser ve diğ., 2014). Zettler ve diğ. (2013) Kuzey Atlantik'ten topladıkları plastik çöpler üzerinde kolonileşen canlılığı "plastisphere" olarak nitelendirmişler ve içlerinde patojen türlerin de olduğu birçok organizmaya

rastlamışlardır. Örneğin Baltık Denizi'nden toplanan yüzen plastikler üzerinde patojenik *Vibrio spp*'ye de rastlanılmıştır (Kirstein ve diğ., 2016). Bu gibi etkileşimlerin omurgalı ve omurgasız canlı popülasyonları için yeni hastalık riskleri oluşturma potansiyeli ise henüz bir soru işareti durumundadır. Dahası plastik yüzeyler bakterilerin antibiyotik direncinin artmasına da sebep teşkil edebilmektedir. Laganà ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmada PS yüzeylerden izole edilen 27 bakteri suşunda, test edilen kimi antibiyotiklere karşı bazı bakterilerin %100 direnç geliştirdikleri ve yine bu suşların aktif biyofilm üretimi sergiledikleri belirtilmiştir. Biyofilm oluşumuyla beraber artan horizontal gen transferi mikroorganizmaların metabolik çeşitliliğine etki edebilmekte ve antibiyotik dirençli genlerin yayılmasına sebep olabilmektedir (Arias-Andres ve diğ., 2018b; Yang ve diğ., 2019). Su ortamındaki plastik materyal organizmaların geniş alanlara yayılmasına yardımcı bir vektör olmanın yanı sıra canlıların saklanabileceği bir kamuflej rolü de oynamaktadır (Goldstein ve diğ., 2014). Bu bağlamda mikropplastik kirliliği istilacı türlerin de daha geniş alanlara yayılmasına neden olmakta ve ekosistem sağlığı açısından geri döndürülemez değişimlere sebebiyet verebilme potansiyeli taşımaktadır (Barnes, 2002).

2.5. (MİKRO-)PLASTİKLERİN CANLILAR TARAFINDAN YUTULMASI/BÜNYEYE ALINMASI

Canlıların plastikleri yutma/bünyelerine alma şekilleri farklılık göstermekle birlikte bazıları yedikleri avlar nedeniyle plastiklere maruz kalırken, bazıları da plastikleri avları ile karıştırıp yutmaktadır. Sucul ortamdaki plastik materyal özellikle pelajik balıklar ve filtre ederek beslenen canlılar için tehlike içermektedir (Güven ve diğ., 2017; Bråte ve diğ., 2018a). Yutulan plastik materyal hayvanların sindirim ve boşaltım sistemlerini tıkayabilmekte ve bloke edebilmektedir. Sindirilemeyen plastik midede kalıcı olmakta ve bu nedenle canlılar yetersiz beslenmeden ölebilmektedir (de Stephanis ve diğ., 2013). Dolayısıyla plastik kirliliği hayvanların besin arama davranışlarını değiştirebilmektedir. Plastik yutulması üreme başarısına da etki edebilir. Örneğin kloakın yutulan plastik tarafından bloke edilmesi yumurtaların bırakılacağı kanalın tıkanması anlamına gelmektedir ve bu durum üreme başarısını sekteye uğratmakla beraber hem canlının hem de popülasyonun geleceğini tehlikeye atmaktadır (Plot ve Georges, 2010).

Canlıların plastikleri bünyelerine almalarında beslenme stratejisi, partiküllerin yoğunluğu, büyüklüğü, rengi ve şekli gibi faktörler de önem teşkil etmektedir. Plastik maddelerin

yoğunluğu bu partiküllerin sudaki derinliğini konumlar ve bu durum pelajik ya da bentik hangi canlıların daha çok maruz kalabileceğine dair bir fikir vermektedir. Partiküllerin şekli, rengi ve büyüklüğü ise potansiyel avları ile olan benzerlikleri ya da bu maddelerin biyoerişebilirlikleri açısından önemlidir. Çünkü hayvanlar su ortamında çoğu zaman bu materyalleri avları ile karıştırmaktadır. Örneğin deniz kuşları, balık ve sefalopod gibi potansiyel avlarına benzerliklerinden ötürü koyu renk plastiklerden ziyade açık renkli plastikleri daha çok yutmaktadır (Verlis ve diğ., 2013). Mikroplastiklerin büyüklüğü de potansiyel avları ile benzer boyutlardaki partiküllerin yutulması açısından önemlidir. Örneğin filtre ederek beslenen canlıların beslendikleri planktona benzer boyutlardaki partiküllere büyük olanlara göre daha fazla maruz kaldıkları gözlenmiştir (Cole ve Galloway, 2015).

Bir diğer faktör; partiküllerin biyofilm tabakasıyla kaplanmasıdır ve bu durum kemodetektörlere sahip hayvanlar tarafından bu partiküllerin yutulmasına sebebiyet verebilir (Vroom ve diğ., 2017). Ya da biyofilm formasyonu olmasa dahi sadece kimyasal ipuçlarının varlığında canlılar tarafından mikroplastiklerin av olarak tercih edilebilirliği artabilir. Örneğin bir çalışmada *Calanus helgolandicus* türü kopepodlar, avları olan planktonik organizmaların ürettiği dimetil sülfid kimyasalı ile infüze olmuş ve olmamış mikrofibrillere maruz bırakıldığında, ilk deney şartındaki kopepodların ikinci deney şartındaki kopepodlara kıyasla ciddi oranda daha fazla mikroplastığı bünyelerine aldıkları gösterilmiştir (Procter ve diğ., 2019). Dimetil sülfidin ayrıca deniz kuşlarının sudaki yüzen plastik partikülleri yutmalarında olfaktör bir ipucu olarak teşkil edilebileceği Savoca ve diğ. (2016) tarafından da ifade edilmiştir.

Mikroplastiklerin toksisitesi bağlamında diğer bir etmen de özellikle nano boyutlardaki partiküller için yüzey yükleridir. Bu maddelerin yüzey yükleri maruz kalan canlıların partikül alım düzeylerine, dolayısıyla toksisitelerine etkide bulunabilmektedir (Tallec ve diğ., 2018; González-Fernández ve diğ., 2018). Ayrıca partiküllerin boyutları küçüldükçe bünyede kalma/uzaklaştırılma süreleri de artmakta ve farklı doku ve organlarda bu partiküller transloke olabilmekte, organizma üzerinde toksik etkileri artabilmektedir (Browne ve diğ., 2008; Ziajahromi ve diğ., 2018).

Su ortamında canlılar, etrafında mevcut olan mikroplastiklerle doğrudan ilişki içindedir (Phuong ve diğ., 2018). Bulundukları habitatın konsantrasyonuna bağlı olarak mikroplastikleri bünyelerine almaktadırlar. Örneğin 25 farklı istasyondan toplanan *Mytilus*

edulis ve *Perna viridis* türü bivalvlerin bünyelerine aldığı mikroplastik niteliği ile aynı örnekleme noktalarından alınan su örneklerindeki mikroplastik içeriği arasında pozitif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Qu ve diğ., 2018).

Laboratuvar ortamında *Euphausia superba* türü krustaseler üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada; organizmalar 27-32 µm boyutlarındaki floresan PE mikroboncuklara maruz bırakılmış; canlılar tarafından yutulan partiküllerin dışkılama yoluyla uzaklaştırıldıklarında ise ≤ 1 µm boyutlarına fragmente olabildikleri gözlenmiştir (Dawson ve diğ., 2018). Böylelikle hayvanlar tarafından yutulan mikroplastiklerin biyolojik süreçlere tabi kalıp uzaklaştırılmasını takiben, su ortamındaki oranlarında değişimlerin gerçekleşebildiği görülmüştür. Ek olarak, su ortamında, feçes vb. organik maddeler yüzeyden sedimente doğru deniz karı deneni fenomeni meydana getirerek dip katmanlarda birikmektedir. Nitekim bu durumun bentik canlılar açısından mikroplastiklerin biyoerişebilirliğini artırarak bir mikroplastik maruziyet yolağı olarak kendini gösterebileceği de belirtilmiştir (Porter ve diğ., 2018).

Beslenme tipi de mikroplastiklere maruziyet düzeyini belirleyen bir diğer faktördür. Kıyı habitatının taklit edildiği bir laboratuvar deneyinde farklı beslenme tiplerine sahip türlerin mikroplastik maruziyeti neticesinde beslenme tipi ile maruz kalma düzeyleri arasında ilişki gözlenmiştir. Buna göre suyu filtre ederek beslenen canlılar, sedimenti işleyen ya da pelajik beslenen türlerden daha fazla mikroplastik bünyelerine almış ve bu canlıların trofik aktarım açısından kilit rolde oldukları belirtilmiştir (Setälä ve diğ., 2016). Messinetti ve diğ. (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise düşük mikroplastik konsantrasyonlarında dahi sesil yaşayan ve filtre ederek beslenen canlıların, pelajik ve süspansiyon ile beslenen canlılara kıyasla mikroplastik kirliliğinden daha fazla etkilenebildikleri ifade edilmiştir.

Mikroplastiklerin yutulmasıyla gen ekspresyonunda değişimler, oksidatif stres, gastrik enzim salgılarında ve hormon düzeylerinde inhibisyon, intestinal yollarda tıkanmalar, besine karşı duyarsızlık, yumurtlamada gecikme ve üreme oranlarında düşme, doğan yavrularda ise gelişimsel bozukluklar meydana gelebilmektedir (Wright ve diğ., 2013a; Sussarellu ve diğ., 2016; Balbi ve diğ. 2017; Deng ve diğ., 2017; Pitt ve diğ., 2018; Romano ve diğ., 2018). Midyelerin mikroplastikleri filtre etmesi neticesinde bu kirleticiler vücuda alınmakta ve farklı dokulara taşınarak toksik etkiler meydana getirmektedir (Browne ve diğ., 2008; Von Moos ve diğ., 2012). Mikro ve nanoplastik maruziyeti hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı

neticesinde redoks dengesinde değişimlere sebep olmaktadır (Ribeiro ve diğ., 2017; Magni ve diğ., 2018). Ayrıca bir diğer toksik etki olarak çekirdek materyalin sentez yollarında değişimlere yol açabilmektedir (Jeong ve diğ., 2017; Yu ve diğ., 2018). Dahası mikroplastikler canlılarda fagositik aktivitede artışa ve enerji rezervlerinde ise %50'lere varan azalmalara neden olabilmektedir (Wright ve diğ., 2013b).

Mikroplastik toksisitesi segment rejenerasyonu gibi hayatta kalım açısından canlılar için kritik öneme sahip birtakım mekanizmaları da olumsuz etkilemiştir. Örneğin segment kaybı bulunan *Perinereis aibuhitensis* türü poliketlerde 8-12 µm büyüklüğündeki partiküllere maruziyet sonucu rejenerasyon hızının anlamlı şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Leung ve Chan, 2017). Yapılan bir başka araştırmada ise mikroplastiklerin antozoa ve mikroalglerin kurdukları simbiyotik ilişki üzerinde ketleyici bir role sahip olduğu gösterilmiş ve bu durumun bu canlıların popülasyon sağlığını gelecekte tehdit edebileceği belirtilmiştir (Okubo ve diğ., 2018).

Bivalvlerde kabuk gelişimi organizma sağlığına dönük önemli bir göstergedir. Örneğin değişen pH şartlarının suyun kalsiyum karbonat parametrelerine etkisi sonucu organizmaların kabuk morfolojilerinde olumsuz değişimlere neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Sezer ve diğ., 2018a; Fitzer ve diğ., 2018). Mikroplastik maruziyeti altındaki kabuklularda da kitin sentaz, karbonik anhidraz gibi matriks mineralizasyonunda rol oynayan enzimlerin inhibisyonu sonucu larval aşamada kabuk gelişimine dönük negatif etkiler gösterilmiştir (Balbi ve diğ., 2017, Tallec ve diğ., 2018).

Mikroplastik maruziyetinin canlıların avlanma ya da yırtıcıdan sakınma performanslarına dönük etkileri de incelenen bir diğer stres göstergelerindendir. Örneğin yavru *Pomatoschistus microps* türü balıklarda mikroplastiklerin avlanma davranışı üzerine etki ettiği bildirilmiş olup maruziyet neticesinde canlıların avlanma performansında %65'e varan önemli azalmalar gözlenmiştir (de Sá ve diğ., 2015). *Perca fluviatilis* türü balıkların lavralarında mikroplastik maruziyetinin yırtıcılardan sakınma davranışı üzerine etkisi araştırılmış, olfaktör sistemle ilintili alarm durumlarına karşı larvaların tepkileri gözlenmiştir. Kontrol grubundaki canlılar alarm durumunda aktivitelerini azaltıp ciddi oranda hareketsiz kalırken, yüksek konsantrasyon içeren deney grubundaki canlıların herhangi bir anti-predatör tepki göstermedikleri ifade edilmiştir (Lönnstedt ve Eklöv, 2016).

Mikroplastiklere maruziyet sonucunda organizmalarda görülen diğer bir toksik çıktı da üremeye dönük negatif etkilerdir. Örneğin *Crassostrea gigas* türü istiridyelerin mikroplastiklere maruziyeti sonrasında sperm hareketliliğinde ve oosit sayısında/büyükliğünde düşüş gibi sonuçlarla gamet kalitesinde azalmalar görülürken, yavruların büyümeleri üzerine de olumsuz etkiler rapor edilmiştir (Sussarellu ve diğ., 2016). Benzer şekilde *C. helgolandicus* türü kopepodlarda da mikroplastik maruziyeti sonucu daha küçük boyutlarda yumurta üretimi ve daha düşük yumurtadan çıkma oranı gözlenmiştir (Cole ve diğ., 2015). Ayrıca tatlı su levreği *Perca fluviatilis*'de de mikroplastik maruziyetinin yumurtadan çıkma oranlarına etki ettiği belirtilmiştir (Lönnstedt ve Eklöv, 2016). Mikroplastik maruziyeti sonucu organizmalar muhtemelen bu stresörlerin yarattığı metabolik depresyonla başa çıkabilmek amacıyla üreme için gereken enerji bütçesini büyüme ve bakım süreçlerine kanalize etmekte, bu da popülasyon sağlığını negatif etkilemektedir (Welden ve diğ., 2016). Mikroplastikler gamet hücrelerinin sağlığını ketleyerek popülasyon geleceğine dönük riskler içermektedir. Bir istiridyeye türü *Pinctada margaritifera* üzerinde de artan maruziyet konsantrasyonuna paralel olarak gametogenesisin negatif etkilendiği bildirilmiştir (Gardon ve diğ., 2018). Magni ve diğ. (2018) tarafından zebra midyesi *Dreissena polymorpha* üzerinde yapılan çalışmada, bivalvlerde yumurtlama ve gametogenesisin düzenlenmesinden sorumlu olan dopamin aktivitesinin mikroplastik maruziyeti sonrasında artış gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte maruz kalınan mikroplastiklerin farklı yaşam evreleri arasında aktarılabilirdiği de gösterilmiştir. Örneğin *Culex* sineklerinde alıkonulan partiküllerin larval evreden pupa aşamasına geçişte ontogenetik olarak taşınabildiği rapor edilmiştir (Al-Jaibachi ve diğ., 2018).

Sucul ortamdaki mikroplastik kirliliği özetle insan dahil birçok canlı açısından önemli bir tehdit kaynağıdır. Yukarıda değinilen biyolojik ve ekolojik etkilerinin yanı sıra mikroplastik bakımından kontamine olan avların yenmesi sonucu bu partiküller besin zincirinde de aktarılabilir (Macali ve diğ., 2018; Renzi ve diğ., 2018). Örneğin Farrell ve Nelson (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *Mytilus edulis* türü midyeler 0,5 µm boyutundaki mikroplastiklere maruz bırakılmış, ardından mikroplastikçe kontamine olan bu midyeler bir yengeç türü olan *Carcinus maenas*'a besin olarak verilmiştir. Kontamine avların yenmesiyle beraber mikroplastikler yengeçlerin hemolenfinde, solungaç, hepatopankreas ve mide gibi organlarında transloke olmuşlardır. Doğal çevrede deniz kabuklularındaki

mikroplastik kontaminasyonunun ele alındığı bir çalışmaya göre sadece bu canlıların tüketimiyle bir insanın yıllık 11,000 mikroplastik partikül yutabileceği tahmin edilmektedir (van Cauwenberghe ve Janssen, 2014). Yine diğer bir araştırmaya göre İngiltere’de sadece midye tüketimiyle bir bireyin yılda 123 mikroplastik partikül yutabileceği, yüksek midye tüketimi olan İspanya, Fransa ve Belçika gibi ülkelerde bu rakamın yılda 4,620 partiküle kadar artabileceği belirtilmektedir (Catarino ve diğ., 2018). Her ne kadar balıklar üzerinde yürütülen çalışmalarda gastrointestinal sistemlerinde (bu bölge genelde balıkların tüketilmeyen kısımlarını içermektedir) mikroplastik mevcudiyeti araştırılmış olsa da bir çalışmada *Platycephalus indicus*, *Epinephelus coioides*, *Alepes djedaba* ve *Sphyrna jello* türlerinin kas dokularında da mikroplastiklere rastlanmış ve bu durum gıda güvenliği temelli kaygıları daha da arttırmıştır (Akhbarizadeh ve diğ., 2018; Barboza ve diğ., 2018c; Seltenrich ve diğ., 2015). Deniz memelerinin de beslendikleri organizmalardan ötürü mikroplastiklere maruz kalabildikleri gösterilmiştir (Nelms ve diğ., 2018; Nelms ve diğ., 2019). İnsan sağlığı açısından oldukça kaygı verici haber ise birkaç ay öncesinde Viyana Tıp Üniversitesi’nden gelmiştir. Nihayetinde insan gaytasında da mikroplastik varlığının doğrulanabildiği ve plastik kap ve şişelerin de yapısını oluşturan polimerlerin insan sindirim sisteminde bulunabildiği gösterilmiştir (Duncombe, J, 2018).

Dolayısıyla mikroplastik kirliliği organizma, popülasyon ve ekosistem düzeyinde önemli etkilere yol açabilme potansiyelinin yanı sıra, çevre ve insan sağlığı açısından önemli tehditler içererek bir risk durumu oluşturmakta ve yakıcılığı her geçen gün artan bir kirlilik başlığı olarak güncelliğini korumaktadır.

2.6. MİKROPLASTİKLERİN TOKSİK KİRLLETİCİLER İLE ETKİLEŞİMLERİ

Su ortamındaki mikroplastikler fiziksel etkileşimler dışında çevreyle bir takım kimyasal etkileşimlerin de içindedir. Plastiklerin üretim aşamasında materyallere belli özellikleri kazandırması için yapılarına çeşitli maddeler ilave edilmektedir. Bu özellikler materyali daha dirençli ya da esnek kılmak gibi ihtiyaçlara göre belirlenir ve materyal ağırlığının %60 oranlarına kadar karşılık gelebilir. Üretim sürecinde dahil edilen en önemli maddeler ise fitalatlar, metaller (Pb, Cd, Cu vs.), serbest radikaller (peroksidazlar vb.), ultraviyole stabilizatörler (titanyum dioksit vb.), antimikrobiyal bileşenler (Triclosan vb.), pigmentler ve antioksidanlardır (Kedzierski ve diğ., 2018). Bu maddelerin önemli bir kısmı düşük

miktarlarda dahi canlılar için tehdit içerebilmektedir. Örneğin yaygın bir şekilde kullanılan katkı maddelerinden olan fitalat ve Bisfenol A (BPA)'nın düşük konsantrasyonlarının dahi endokrin yıkıcı etkilere sebep olduğu rapor edilmiştir (Oehlmann ve diğ., 2009; Balbi ve diğ., 2016). Üretim süreçlerinde eklenen katkı maddelerinden endişe kaynağı olan bir diğeri ise antimikrobiyal ajanlardır. Bu ajanlar sucul ortama karışan mikroplastiklerin yüzeyinden zamanla çevresel ortama salınabilmekte ve plastik yüzeylerde kolonileşen mikrobiyal komünitelerin bu kimyasallara dönük adaptasyon geçirmelerine sebep olabilmektedir (Arias-Andres ve diğ., 2018a).

Plastikler su ortamına dahil olduğunda, geçen zamanla beraber yapısındaki kimyasallar da sızıntı (leachate) halinde suya karışırlar. Farklı polimerlerden meydana gelen plastiklerin 500 gün boyunca su ortamına bırakılmasını takiben östrojenik etkiye sahip katkı maddelerinin hızlı bir şekilde su ortamına salındığı gösterilmiştir (Kedzierski ve diğ., 2018). Jang ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada “strafor balıkçılıkta yoğun olarak kullanılan bir malzemedir ve strafor yüzeylerin yüksek konsantrasyonlarda toksik bir kimyasal olan Hexabromocyclododecane (HBCD) içerdiği bilinmektedir” bilgisinden yola çıkarak; strafor, polietilen şamandıra, kaya ve metal olmak üzere farklı substratlarda kolonileşen *Mytilus galloprovincialis*'ler üzerinde HBCD konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak strafor yüzeylerdeki midyelerde HBCD konsantrasyonları daha yüksek bulunmuştur. Bununla beraber strafor yüzeyde kolonileşen midyelerin feçeslerinde de strafor partiküllere rastlanmış; araştırmacılar yüksek HBCD konsantrasyonlarının nedeni olarak bu straforların bünyeye alınması ile ya da bahsi geçen kimyasalın plastik yüzeyinden suya salınması kaynaklı maruziyeti işaret etmişlerdir (Jang ve diğ., 2016).

Mikroplastiklerin su ortamında fragmente olmasıyla beraber yüzey alanı arttıkça kirletici adsorbe etme kapasitesi de artmaktadır. Su kolonunda mikroplastikler diğer toksik kimyasalların da adsorbe olabildiği bir matrisi temsil etmektedir (Cole ve diğ., 2011). Mikrobiyal etki ve biyofilm formasyonu, partiküllerin aşınma durumu ve yüzey yapısı, yüzey alanı büyüklüğü, yüzey yükü ve polimer tipi gibi özellikler metallerin ve organik kirleticilerin mikroplastiklere adsorbsiyonunu etkilemektedir (Holmes ve diğ., 2012; Rochman ve diğ., 2013a; Wang ve diğ., 2018). Boyut küçüldükçe yüzey alanı artmakta ve böylece kirletici adsorbsiyonu da buna bağlı olarak artmaktadır (Lee ve diğ., 2014.) Bu yönüyle mikro ve nanoplastikler özellikle endişe kaynağı olarak görülmektedir. Bu endişelerin ileri boyutu ise

fragmentasyonun artması ile beraber çevresel kompartımanlarda bu partiküllerin tespit edilmesine dönük metodolojik sorunların baş göstermesidir (Koelmans ve diğ., 2015). Boyutların küçülmesiyle beraber özellikle besin zincirinin alt basamaklarında yer alan canlılar açısından partiküllerin erişebilirliği artmaktadır.

Holmes ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn gibi metallerin farklı pH ve tuzluluk şartlarında mikroplastik yüzeyine adsorbe olduğu; aşınmış peletlerin ham peletlere nazaran daha fazla metal adsorbe edebildiği ve mikroplastiklerin tatlı suda deniz suyuna göre daha fazla adsorbsiyon gösterebildiği belirtilmiştir. Aşınmış peletlerdeki yüksek metal konsantrasyonuna gerekçe olarak ise üretim aşamasında yapılarına ilaveten metallerin eklenmesi, üstlerinde oluşan biyofilm tabakasının sağladığı ara yüzey ve degradasyona bağlı yüzey alanının artması önerilmiştir (Holmes ve diğ., 2014). Ham ve sekonder peletlere metallerin adsorbsiyonunun 25-100 saatte denge durumuna erişebileceği yine Holmes ve diğ (2012) tarafından ifade edilmiştir.

Rochman ve diğ. (2014a) tarafından San Diego Körfezi'nde yapılan çalışmada polimer tipindeki değişimlerin metallerin adsorbsiyon kapasitesi açısından bir farklılığa yol açmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlardan farklı olarak; antifouling boyalardan sızarak deniz suyuna geçen metallerin bu ortamdaki plastik yüzeylere adsorbsiyonunun farklı polimerler için değişen oranlar gösterebildiği de bildirilmiştir (Brennecke ve diğ., 2016). Başka bir araştırmada Adriyatik Denizi kıyılarından toplanılan plastik peletlerdeki iz metal konsantrasyonlarının su kolonuna kıyasla daha yüksek, sedimente kıyasla ise daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Maršić-Lučić ve diğ., 2018). Graca ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise plaj kumu, karayosunu ve strafor yüzeylerin ihtiva ettikleri cıva konsantrasyonları incelenerek; strafor atıkların diğer bir abiyotik matris olan kuma kıyasla yüzeyinde meydana gelen biyofilm tabakası ve fiziksel faktörlerin etkisiyle daha fazla cıva biriktirdiği gösterilmiş, strafor yüzeylerin cıva taşınımı açısından bir vektör olabileceği vurgulanmıştır.

Denizel ortamda mikroplastiklerin sadece metal ve organik kirleticiler açısından değil antibiyotikler açısından da bir kontaminasyon yolağı olabileceği düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada mikroplastiklerin spesifik yüzey alanı, kristalitesi gibi fizikokimyasal özelliklerin antibiyotik adsorbsiyonuna etki ettiği görülürken, özellikle poliamid partiküllerin antibiyotiklerin diğer çevresel kompartımanlara taşınımında bir vektör olabileceği ifade

edilmiştir (Li ve diğ., 2018a). Johansen ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise iki farklı fisyon ürünü Cs-137 ve Sr-90 radyonüklidlerinin PE partiküllere adsorbisyonu incelenmiş olup sediment referans değerlerine kıyasla PE yüzeylere adsorbisyonun düşük olduğu belirtilse de radyonüklidlerin taşınımı açısından ele alındığında tüm örneklerde radyonüklid adsorbisyonunun görüldüğü ifade edilmiştir.

2.7. KİRLETİCİLERİN TAŞINIMINDA MİKROPLASTİKLERİN VEKTÖR POTANSİYELİ

Mikroplastikler su ortamında bulunan organik kirleticiler ile her iki maddenin de hidrofobik özelliklerinden ötürü etkileşime girmektedirler (Heskett ve diğ., 2012). Denizel plastik atıklar üzerindeki kalıcı organik kirleticilerin küresel konsantrasyonu 1-10,000 ng/g olarak raporlanmıştır (Hirai ve diğ., 2011; Heskett ve diğ., 2012). Örneğin PP peletler üzerindeki poliklorlu bifenil (PCB) konsantrasyonlarının suda saptanandan 10^6 kat daha yüksek olabileceği gözlenmiştir (Mato ve diğ., 2001). Sucul ortamda bulunan kirleticileri adsorbe eden mikroplastiklerin yutulmasıyla bu kirleticiler canlılara taşınacak ve böylece mikroplastiklerin toksik kimyasallar açısından vektör rolü söz konusu olacaktır (Khan ve diğ., 2015). Bu vektör role Truva atı etkisi de denilmektedir (Cole ve diğ., 2011). Syberg ve diğ. (2015) tarafından plastiklerin vektör etkisi kademelendirilerek açıklanmıştır. Buna göre çevredeki kirleticiler mikroplastiklerin yüzeyine adsorbe olmakta, mikroplastikler solunum veya sindirim sistemi aracılığıyla bünyeye alınmakta, endositoz ile hücre membranı boyunca taşınması neticesinde desorbe olan kirleticilere karşı da hücresel cevaplar gelişmektedir. Endişe verici şekilde Bakir ve diğ. (2014) tarafından mikroplastikler ile ilintili kirleticilerin desorbsiyon proseslerinin bağırsak sıvısında (intestinal fluids) deniz suyunda olduğundan 30 kat daha hızlı gerçekleşebileceği belirtilmiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada ham ve sekonder peletlerin ihtiva ettiği kirleticilerin suya salınımı sonrasında *Perna perna* türü bivalvlerin larval gelişimine dönük toksik etkiler incelenmiş ve sekonder peletlerin gerek katkı maddelerinin salınımı, gerekse de çevreden adsorbe ettiği kirleticilerin desorbsiyonu sonucu daha fazla toksik etkiye neden olduğu belirtilmiştir (e Silva ve diğ., 2016). *Littorina littorea* türü deniz salyangozu ham peletlere, sekonder peletlere ve yırtıcısı *Carcinus maenas*'a dönük kimyasal ipuçları içeren deniz sularında yaşamaya bırakıldığında, deneklerin ihtiyatlı davranma hali ve anti-predatör cevap davranışları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, plastik peletlerden gerçekleşen kimyasal

salınımının *L. littorea*'nın predatörlere karşı daha duyarlı olmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Seuront, 2018).

Polibromlu Difenil Eterlerin (PBDE) mikroplastiklere adsorbsiyonunun ardından, *Allorchestes compressa* türü amfipodlar bu kontamine partiküllere maruz bırakılmış ve organik kirleticiler canlı vücuduna taşınmıştır (Chua ve diğ., 2014). Diğer bir model organizma *Daphnia magna* türünde ise fenantren adsorbe olan partiküllerin canlı tarafından yutulması neticesinde bu kimyasallar da organizmada birikim göstermiştir. Araştırma ekibi ayrıca ölü ve yaşayan planktonik organizmaların biyokütlesi dikkate alındığında hidrofobik organik bileşiklerin biyotaya taşınımında mikroplastiklerin bir kontaminasyon yolağı olarak temsil ettiği oranın çok çok düşük kaldığını ifade etmişlerdir (Frydkjær ve diğ., 2017). Deniz tabanında yaşayan *Arenicola marina* deniz solucanı üzerinde de sedimentteki mikroplastik varlığına bağlı olarak beslenme eksikliği ve ağırlık kaybı kaydedilirken, PCB'lerin biyoakümüülasyonunda da artış gözlenmiştir (Besseling ve diğ., 2012). Japon pirinç balığı *Oryzias latipes* ile de laboratuvar ortamında çalışılmıştır. Ham düşük yoğunluklu PE peletler ile deniz ortamında bir süre kalan düşük yoğunluklu PE peletlere balıkların maruziyeti sonrasında; çoklu stresörlerin etkisi altında ciddi glikojen yıkımı, artan yağ vakuolizasyonu, hücrel nekroz ve lezyonlar gözlenmiştir. Ham peletlere maruz kalan deney grubunda tümör öncülleri ortaya çıkarken, doğal çevredeki kirleticileri de ihtiva eden peletlere maruziyet sonucunda balıkların bir kısmında tümör ve hapatoselüler adenomaya rastlanılmıştır (Rochman ve diğ., 2013b). Gomiero ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise PVC partiküllerin Benzo[a]piren (BaP) ile inkübasyonunun ardından, sedimentten doğru maruziyet sonucu *Hediste diversicolor* türü poliketler üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar sedimentten maruziyet sonucunda dahi mikroplastiklerin BaP taşınımı açısından bir vektör olabildiği ve bu vektör rolün canlılarda genotoksisiteye, lipid hasarına, membran destabilizasyonuna ve mitokondriyal aktivitede ciddi baskılanmalara yol açabildiğini ortaya koymuşlardır (Gomiero ve diğ., 2018). Bu çalışmaların aksine Beiras ve Tato (2019) ise mikroplastik varlığının *Paracentrotus lividus* türü deniz kestanesi larvaları üzerinde 4-n-nonlyphenol (NP) toksisitesini arttırmadığını ve bu kirletici açısından bir vektör rolün söz konusu olmadığını belirtmişlerdir. Güven ve diğ. (2018) tarafından tropikal bir balık türü *Lates calcarifer* üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise bir polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) olan pirenin yalnız ve birlikte etkileri incelenmiş, maruziyet sonrasında

kombin deney grubunda beslenme üzerine anlamlı bir etki saptanmazken, yüzme hızının önemli şekilde düştüğü belirtilmiştir.

Tüm bunlara ek olarak canlılar tarafından mikroplastiklerin yutulmasıyla beraber sadece bu partiküller değil ilişkili diğer kirleticiler de üst predatörlere taşınabilme riski içermektedir. Örneğin *Artemia nauplii*'den *Danio reio*'ya doğru yapay bir besin zincirinin tasarlandığı bir deneyde, hem 1-20 µm boyutundaki mikroplastiklerin, hem de mikroplastiklerle ilintili BaP'ın balıkların bünyesinde birikim gösterdiği belirtilmiştir (Batel ve diğ., 2016). Laboratuvar çalışmalarıyla da gösterilen bu aktarım şüphesiz çevresel şartlar altında da tepe tüketici olan insana kadar etki edebilme potansiyeli taşımaktadır.

Tüm bu çalışmalar göz önünde tutulduğunda mikroplastiklerin su ortamındaki diğer toksik kirleticiler ile etkileşimleri ve bunların biyota üzerindeki etkilerinin aydınlatılması önem teşkil etmektedir.

2.9. DENİZEL ÇEVREDE CIVA KİRLİLİĞİ

Ağır metaller yoğunluğu 5 g/cm³'den büyük olan metallerdir. Metaller sucul ortamda serbest iyonlar ve inorganik bileşikler halinde bulunabilmektedir. Metallerin bir kısmı organizmalar açısından biyolojik süreçlerin devamlılığı için gerekli (esansiyel) olmakla beraber çoğunluğu ihtiyaç duyulan konsantrasyonların fazlasında toksik etkiye neden olabilecek niteliktedir. Cd, Pb ve Hg gibi metaller ise organizmada bir rolü olmayan metallerdir. Suda çözünür ve su yoluyla canlı sistemlere dahil olabildiği gibi, su kolonu boyunca partiküllere adsorbe olabilmekte ve sedimentte birikim göstererek bu yolla da bir maruziyete sebebiyet verebilmektedir. Sucul ortamda metaller ya doğal kaynaklardan (yer kabuğu ve volkanlar vb.) ya da antropojenik kaynaklardan (tarımsal ve endüstriyel girdiler, madencilik faaliyetleri, fosil yakıtların kullanımı vb.) köken almaktadır ve su ortamında varlığını uzun süreler devam ettirebilmektedir. Bununla beraber metaller besin zinciri boyunca taşınmakta, kontamine avlarla beslenen canlılar için de tehdiye neden olmaktadır (Ackerman ve diğ., 2015). Sucul çevrede metal konsantrasyonları nüfusla doğrudan ilişkili olmakla birlikte, yağış gibi doğal süreçlerle ve hidrolojik döngülere dönük müdahalelerle de bir ilişki içerisinde (Rouane-Hacene ve diğ., 2015; Eagles-Smith ve diğ., 2018). Su ortamında canlıların metallere maruziyeti ve oluşan toksisite, canlı biyolojisi (cinsiyet, yaş, üreme periyodu, beslenme tipi, trofik pozisyon vs.), metal formu, maruziyet yolağı, maruz kalınan süre ve konsantrasyon, pH,

ortamdaki organik madde miktarı gibi biyotik ve abiyotik birçok faktöre bağlıdır (Fairbrother ve diğ., 2007).

Cıva yer kabuğunda doğal olarak da bulunan elementlerden biri olup oda sıcaklığında sıvı fazda bulunur. Periyodik cetvelin 2B grubunda yer alan bir geçiş metalidir. Organik, inorganik ve elemental formları bulunmaktadır. Çevresel kompartımanlarda çoğunlukla inorganik formda bulunsa da sucul çevrede biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi altında metil cıva gibi lipofilik ve oldukça toksik formlara dönüşebilmektedir. Böylelikle besin zinciri boyunca daha fazla birikme eğilimi sergileyebilmektedir (Celo ve diğ., 2006). Hava, su ve besin yoluyla canlı vücuduna dahil olmaktadır (Kotnik ve diğ., 2014). Volkanik aktiviteler, kayaların aşınması, jeolojik depozisyon ve okyanuslardan atmosfere geçişle çevrede konsantrasyonları artmakla beraber endüstriyel faaliyetler ve fosil yakıtlardan kaynaklanan atmosferik çökeller ile de çevresel kompartımanlara giriş yapmaktadır (Selin, 2009). Cıvanın endüstriyel kullanımlarına klor-alkali sanayi, bataryalar, barometreler, boyalar, pestisitler ve askeri donanımlar örnek gösterilebilir (Landis ve Yu, 1999). Her yıl %1.5 artış gösteren background atmosferik Hg konsantrasyonu (Clifton, 2007); kuzey yarımkürede 1.3-1.7 ng/m³ arasında değişirken, güney yarımkürede 1.1-1.3 ng/m³ arasında seyretmektedir ve bu konsantrasyonlar farklı etkenler ile lokal olarak büyük değişiklikler gösterebilmektedir (Kim ve diğ., 2016). Doğal yollarla meydana gelen cıva emisyonu daha çok lokal yoğunluklara sebebiyet verirken; antropojenik kaynaklı cıva emisyonları kırılgan olanlar da dahil ekosistemler arasında dalgalanmalara neden olmaktadır (Kim ve diğ., 2016). Örneğin küresel ısınmayla birlikte buzullar erimekte ve permafrostlar daralmakta, bunun dolaylı bir sonucu olarak da cıva konsantrasyonları ciddi artış göstermektedir. Dolayısıyla Arktik bölgede cıva düzeylerinin yüksek seyretmesi esas olarak insan kaynaklı nedenlerledir ve Arktik biyotadaki cıva konsantrasyonunda insan etkisi kaynakların payının %74-94 arasında olduğu düşünülmektedir (Dietz ve diğ., 2009). Küresel cıva seviyesi sanayi devriminden bu yana önemli artış göstermiştir ve tahmini projeksiyonlara göre gelecekte de bu trend devam edecektir (Streets ve diğ., 2009). Günümüzde küresel ölçekte atmosfere karışan yıllık cıva emisyonunun 6,500-8,200 ton olduğu düşünülmektedir (Driscoll ve diğ., 2013). Örneğin çevresel cıva konsantrasyonlarında büyük artışa neden olan altın madenciliği kaynaklı Hg emisyonu yıllık 727 ton dolaylarındadır ve sadece bu oran antropojenik cıva salımının %35'inden fazlasına tekabül etmektedir (UNEP, 2013). Bir diğer kontaminasyon kaynağının da fosil yakıtların kullanılması olduğu belirtilmiş olup küresel ölçekte kömür tüketimi sonucu

atmosfere yıllık 750-1,500 ton cıva emisyonu olduğu rapor edilmiştir (Pacyna ve Pacyna; 1995). Kuru ve nemli depozisyonla geniş alanlara yayılım gösterebilen bir kirletici olan cıva, hava olayları ve endüstriyel salım sonrasında yeraltı sularında ve nehir sistemlerinde birikebilmektedir (Bollen ve diğ., 2008).

Sucul çevrede besin zinciri boyunca yükseltgenebilen cıva, kontamine deniz canlılarının tüketilmesi sonucu insana kadar taşınabilmektedir (Figueira ve diğ., 2011). Cıvaya maruz kalan canlıların sinir ve üreme sistemlerinin ciddi anlamda olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Tchounwou ve diğ., 2003; Bjørklund ve diğ., 2017). İnsanların cıvaya maruziyeti en çok besin yoluyla olsa da gündelik alet kullanımı, dental amalgamlar, aşılar ve mesleki nedenlerle de olabilmektedir (Park ve Zheng, 2012).

2.10. CİVANIN BİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİ

Cıva oldukça toksik elementlerden biridir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından belirlenen tüketim sınır değerleri cıva için 0,5 mg/kg olup bu değer diğer toksik elementler olan Pb (1,5 mg/kg) ve Cd (1 mg/kg) gibi metallerden daha düşüktür (EFSA, 2010). Bu da cıvanın toksisitesinin ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Cıvayı çevresel açıdan önemli bir risk unsuru kılan diğer bir detay ise denizel ortamdaki biyomagnifikasyonudur. Aslında cıvanın katyonik formunun biyomagnifikasyonu sınırlı olmasına karşın biyotada biriken total cıvanın biyomagnifikasyonu oldukça yüksektir. Bunun nedeni cıvanın organik formu olan metil cıvanın hayli biyoyükseltgenen bir kirletici olmasıdır (Chen ve diğ., 2012).

Cıva kontaminasyonu farklı trofik seviyelerdeki canlılarda organizma ve popülasyon düzeyinde ciddi negatif etkilere yol açabilme potansiyeli taşımaktadır. Örneğin cıva gerek biyoyükseltgenme gerekse ekosistem sürekliliği açısından anahtar roldeki birincil üreticiler üzerinde ketleyici etkilere sahiptir. Birincil üreticiler ortamdaki cıva konsantrasyonları düşük olsa dahi yüksek birikim gösterebilmektelerdir (Yang ve diğ., 2018). Bu canlılarda cıva maruziyeti sonucu ROS üretiminin tetiklenmesiyle oksidatif stres görülebildiği gibi (Ferrat ve diğ., 2002), kloroplastların membran bütünlüğünün bozulmasıyla fotosentez oranlarında azalmalar meydana gelebilmektedir (Beauvais-Flück ve diğ., 2018).

Sucul çevrenin cıva ile kontamine olması ekosistem kompozisyonuna dönük başka kritik kırılganlıklar da doğurabilmektedir. Portekiz kıyılarında yerli tür olan *Anodonta anatina* midye türü ile istilacı midye türü *Corbicula fluminea* laboratuvar ortamında cıvaya maruz

bırakıldığında, *C. fluminea*'nın yerli türe kıyasla çok daha toleranslı olabildiği saptanmış; bunun nedeni ise iki tür arasındaki cıva alım düzeyi, biyotransformasyon ve eliminasyon süreçlerindeki farklılıklar şeklinde önerilmiştir (Oliveira ve diğ., 2015). Yine yerli tür olan *Ruditapes decussatus* ile istilacı konumdaki *Ruditapes philippinarum* karşılaştırıldığında ise her iki türün detoksifikasyon stratejilerindeki farklılıklardan ötürü *R. decussatus*'un manila kum midyesine kıyasla As ve Hg kontaminasyonuna karşı daha toleranslı olabildiği ortaya konmuştur (Velez ve diğ., 2016). Dolayısıyla sucul çevredeki cıva kirliliği hayvanların habitat yayılımlarına ve rekabet süreçlerine dönük müdahalelere yol açabilmektedir.

Çeşitli omurgalı ve omurgasız türlerinde de cıvanın potansiyel etkileri laboratuvar deneylerinde birçok kere araştırılmıştır. Örneğin Monteiro ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Brycon amazonicus* türü balıkları cıvaya maruz bırakıldığında hayvanların hiperaktivite, agresiflik ve denge kaybı, pigmentasyon bozuklukları ve pul azalması sergiledikleri ifade edilmiştir. *Gambusia affinis* üzerinde de negatif etkiler görülmüş, cıva maruziyetinin canlıların lokomotor akvitesini olumsuz etkilediği ve maruziyet süresi arttıkça yüzme hızı ve hareket edilen alanın azalma gösterdiği ortaya konmuştur (Jakka ve diğ., 2007). Merkezi ve çevresel sinir sistemi cıva birikimine karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle beyinde artan cıva birikimiyle ratlarda denge kaybı ve çevresel sinir hasarı saptanmıştır (Munro ve diğ., 1980). Cabecinhas ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise denizel bir gastropod türü olan *Gibbula umbilicalis*'in yırtıcıdan sakınma davranışlarının maruz kalınan konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede azaldığı ve predatörlere karşı daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.

Cıva maruziyeti canlıların üreme ve gelişimleri üzerine de olumsuz etkilere yol açmaktadır. Örneğin besin zinciri boyunca yükseltgenen metil cıva ebeveynler tarafından doğrudan yumurtalara aktarılmakta ve bu da kuş türlerinin üreme başarısını kitlemektedir (Wolfe ve diğ., 1998). Farklı türlerin yumurtalarına metil cıva enjekte edilerek hassasiyetleri incelendiğinde balık kartalı ve kerkenez gibi tepe predatörlerin en yüksek duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (Heinz ve diğ., 2009). Bir çalışmada erişkin *Danio reio* türü bireylerde inorganik cıva maruziyeti sonucu oosit hücre membranları ile foliküler hücre tabakaları arasında kontak kaybı gözlenirken; spermatojenik tübüllerde dejenerasyonlara rastlanılmış, balıkların cinsiyet hormonlarında cinsiyet-spesifik cevaplar geliştiği ve üremenin ciddi düzeyde etkilendiği rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2016). *Pimephales promelas* türü

balıkların ise metil cıvaya maruziyeti sonucu cinsiyet hormonlarının baskılandığı ve yumurtlama başarısının ciddi oranda azaldığı gösterilmiştir. (Drevnick ve Sandheinrich, 2003).

Cıva maruziyeti larval gelişim üzerine de önemli olumsuzluklara neden olmaktadır ve popülasyon düzeyinde göz ardı edilemez etkileri mevcuttur. *Mytilus galloprovincialis* larvaların artan cıva konsantrasyonuna bağlı olarak anormal gelişim gösterdiği deneylenmiş ve cıva maruziyeti açısından Akdeniz midyeleri larvalarının deniz kestanelerine kıyasla daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Novelli ve diğ., 2003; Prato ve Biandolino, 2007). Diğer bir kabuklu türü *Crassostrea gigas* larvalarında ise inorganik cıva maruziyetinin ardından larvaların %50'sinde anomali saptanmıştır (Beiras ve His, 1994). Yine Beiras ve His (1995) tarafından yapılan çalışmada *M. galloprovincialis* larvalar cıvaya maruz bırakılmış ve larvaların gelişim düzeyine bağlı olarak cıva toleransının arttığı gösterilmiştir.

Cıva maruziyeti sucul canlılarda hayatta kalım başarısına dönük olumsuzlukları da doğurabilecek önemli doku patolojilerine sebep olabilmekte; transkripsiyon faktörleri ve enzim aktivitelerine etki ederek hücresel stresi tetikleyebilmektedir (Zhang ve diğ., 2016; Varotto ve diğ., 2013; Coppola ve diğ., 2017; Sheir ve diğ., 2010). Örneğin *Scrobicularia plana* üzerinde çevresel cıva maruziyetinin immünotoksisiteyi indükleyebildiği rapor edilmiştir (Ahmad ve diğ., 2011a). Yine aynı türde solungaçlardaki cıva birikimi ile oksidatif stres cevapları arasında önemli bir korelasyon görülmüştür (Ahmad ve diğ., 2011b). *M. galloprovincialis* üzerinde ise cıva maruziyetinde yüksek sıcaklıklarda artan oksidatif hasar bildirilmiş ve maruziyet süresi ile pozitif korelasyon gösteren lipid peroksidasyonu saptanmıştır (Coppola ve diğ., 2017). Yine *Mytilus*'da inorganik cıvaya maruziyet sonucunda addüktör kas, sindirim bezi ve solungaçlarda enflamasyona neden olabilecek patolojiler meydana geldiği de belirtilmiştir (Sheir ve diğ., 2010). *R. philippinarum*'da ise cıva maruziyeti sonucunda glikojen içeriğinde azalma görülürken (Velez ve diğ., 2016); *G. umbilicalis*'de küresel enerji bütçesine dönük bir etki saptanmamıştır (Cabecinhas ve diğ., 2015). Cıva maruziyeti ile *D. reiro*'nun solungaç yapısında olumsuz morfolojik değişimler gözlenmiş ve sonuç olarak solungaçlarda fonksiyonel bozulmalar tespit edilmiştir (Macirella ve Brunelli, 2017). Solungaçlar sudaki çevresel ve kimyasal stresörlere karşı oldukça duyarlıdır ve benzer sonuçlar başka sucul türlerde de gösterilmiştir (de Oliveira Ribeiro ve diğ., 2002; Sheir ve diğ., 2010).

Organizmalarda nöroendokrin sistem cıva maruziyeti açısından kritik hedefdir ve farklı cıva formları asimile edildikten sonra kan beyin bariyerini geçerek sinir sistemindeki reseptörlerle etkileşim içine girebilmektedir (Rice ve diğ., 2014). Sinir sistemindeki N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), muscarinic cholinergic (mACh), dopamin gibi reseptörlerin cıva maruziyetinden etkilendiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Basu ve diğ., 2005a, Basu ve diğ., 2005b; Scheuhammer ve diğ., 2008; Basu ve diğ., 2009). Tüm bu reseptörler sinir sisteminde önemli fonksiyonlara sahip olmakla beraber cıva maruziyetine karşı oldukça duyarlı olmaları nedeniyle de nörotoksikite belirteçleri olarak çalışılmaktadır (Scheuhammer ve diğ., 2015). Yine başka bir nörotoksik belirteç olan asetilkolin esteraz (AChE) enzim aktivitesinin de cıva maruziyetinden önemli şekilde etkilendiği belirtilmiştir (Vieira ve diğ., 2009). Bunlara ek olarak cıva maruziyeti organizmaların kalsiyum ve glutamat hemostazını da etkileyerek çeşitli fonksiyonları sekteye uğratabilmektedir (Farina ve diğ., 2003). Tüm bu nörokimyasal değişimlerin yanı sıra, yoğun tiyol içerikleri nedeniyle sinir sistemindeki nöronal mikrotübüller de cıva maruziyetinde hedef olurlar (Björklund ve diğ., 2017) ve bu yapıların moleküllerin taşınımında hücre iskeleti oluşturmalarından ötürü, meydana gelen fonksiyonel kayıplarla beraber organizmada sinirsel farklılaşmalar da ortaya çıkabilmektedir (dos Santos ve diğ., 2016).

Metallotiyoninler (MT) tiyol zengini, metal bağlayan proteinlerdir ve gerekli metaller ile serbest radikallerin hemostazında rol oynayarak hücreleri metal stresine karşı korumaktadırlar (Takahashi, 2012). Cu ve Zn gibi metaller metallotiyonin indükleyen ve uygun konsantrasyonlarda organizma için esansiyel rol oynayan metallerdir. Cd ve Hg gibi toksik metaller ise biyobirikim sonucu MT'lerin metal bağlayan bölgelerine bağlanırlar ve detoksifikasyon süreçlerini kitlemenin yanı sıra birçok enzim için kofaktör olan Zn ve Cu metabolizmasını etkileyerek redoks dengesinin modülasyonuna ya da proteinlerin fonksiyonlarında değişimlere sebep olabilirler. Redoks dengesinin bozulmasıyla beraber hücre membranlarının geçirgenlikleri etkilenmekte ve bu da oksidatif strese ve detoksifikasyon süreçlerinde aksamalara sebep olabilmektedir (Prato ve Biandolino, 2007). Örneğin *B. amazonicus* türünde önemli şekilde cıva birikiminin görüldüğü karaciğer, solungaç ve kalpte MT düzeylerinde de artış saptanmıştır (Monteiro ve diğ., 2010). *Crassostrea iredalei* ve *Crassostrea glomerata* türü kabukluların solungaç ve midelerindeki Pb, Cd ve Hg düzeyleri ile MT sentezi arasında pozitif ilişki gözlemlendiği bildirilmiştir (Hertika ve diğ., 2018). *R.*

philippinarum üzerinde ise artan As ve Hg konsantrasyonlarına paralel olarak MT sentezinde de artış olduğu gösterilmiştir (Velez ve diğ., 2016).

Cıva maruziyeti ayrıca organizmalarda genotoksisiteye de yol açmaktadır. Bir çalışmada *M. galloprovincialis* türü midyelerin cıvaya maruziyeti sonucunda solungaç hücrelerinde kromozom kırılmaları saptanmıştır (Bolognesi ve diğ., 1999). Cıvanın -SH gruplarına bağlanması DNA, RNA ve ribozomal proteinlerin yapısını değiştirerek DNA metilasyonu gibi epigenetik değişimlere sebebiyet verebilmektedir. Örneğin Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks balıklarda üreme sisteminin gelişiminden sorumludur ve cıva maruziyetinin bu aks ile ilintili genlerin transkripsiyonunu modüle ederek balıklarda üreme başarısına etki edebileceği Zhang ve diğ. (2016) tarafından gösterilmiştir. Yine *M. galloprovincialis* üzerinde Hg, Cd ve Cu metallerine kombin maruziyet sonrasında solungaçlarda DNA hasarı ve transkripsiyonel değişimler saptanmıştır (Varotto ve diğ., 2013).

Cıvanın insan ve çevre sağlığına dönük etkileri gün geçtikçe daha kaygı verici olmakla beraber, su ortamında mikroplastikler gibi diğer kirleticilerle etkileşimlerine ve bunların biyota üzerinde meydana getireceği potansiyel tahribata dönük çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır.

2.11. MODEL ORGANİZMA OLARAK *RUDITAPES PHILIPPINARUM* (ADAM VE REEVE, 1850)

Genel olarak bivalvler coğrafik dağılımları, kolay erişebilirlikleri, sabit yaşamaları, kirleticileri bünyesinde fazlaca biriktirmesi ve stres faktörlerine karşı duyarlılıkları nedeniyle hem denizel çevreye dönük izleme çalışmalarında hem de laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan model organizmalardır (O'Connor ve diğ., 1998; Belivermiş ve diğ., 2016, Sezer ve diğ., 2018b; Bour ve diğ., 2018). Bentik ve pelajik ekosistemler arasında önemli bağlantı türleri olup omurgalılar için önemli besin kaynaklarıdır (Setälä ve diğ., 2016). Midye kolonileri ayrıca bulundukları habitatta yaşayan diğer türler için de bir çatı teşkil eder (Nieuwhof et al. 2015). Midye yatakları yüzey sedimentini erozyon ve diğer fiziksel müdahalelere karşı korur ve bu habitatların organik madde içeriğinin artmasını sağlar (Widdows ve Brinsley, 2002). Midye kolonileri ayrıca bentik mikroalg biyokütlesini ve üretiminin artmasına aracılık eder. Tüm bu özelliklerinden dolayı kıyı habitatlarının ekosistem mühendisleri rolündedir (Engel ve diğ. 2017). Ayrıca midyeler gerek mikroplastik

toksisitesine dair laboratuvar çalışmalarında, gerekse saha örneklemeleriyle çalışılmış türlerdir (De Witte ve diğ., 2014; Li ve diğ., 2015; Davidson ve Dudas, 2016; Rist ve diğ., 2016; Green ve diğ., 2019). Dahası küresel ölçekte ekonomik açıdan da önemli türlerdir. Birçok ülkede kayda değer besin kalemlerindendir. Kıyı habitatlarından toplayıcılığının yanı sıra yetiştiriciliği de yapılmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) açıkladığı verilere göre yetiştiricilik de dahil dünya denizlerinden besin olarak elde edilen kabuklu temini 125×10^6 tondan fazladır (FAO, 2012).

Bu çalışma kapsamında çalışılan kabuklu türü *Ruditapes philippinarum*'un taksonomisi ise aşağıdaki gibidir:

Şube : Mollusca

Sınıf : Bivalvia

Takım : Venerida

Aile : Veneridae

Cins : *Ruditapes*

Tür : *Ruditapes philippinarum*



Şekil 2.2: Manila kum midyesi (*Ruditapes philippinarum*).

Manila kum midyesi Hint-Pasifik menşeli bir türdür ve 1900'lerin ikinci yarısından itibaren ticari amaçlarla Avrupa sularına ve Akdeniz'e sokulmuştur (Figueira ve Freitas, 2013). Dünya çapında başta Hint Okyanusu ve Uzak Doğu suları olmak üzere Avrupa'nın Atlantik kıyıları ve Akdeniz'de bir yayılıma sahiptir. Sedimentin üst kısmında kuma girerek yaşayan infaunal bir canlıdır. Yüksek tuzluluk ve sıcaklık toleransının yanı sıra patojenlere karşı da yüksek toleransa sahiptir (Tanguy ve diğ., 2008). Ülkemizde ise Ege kıyıları ve Marmara'da

mevcuttur ve yine aynı yörelerde yetiştiriciliği de yapılmaktadır. Akdeniz ülkelerinde ise ikinci en yüksek kültür kalemine sahip midye türüdür (Lacoue-Labarthe ve diğ., 2016). Küresel olarak protein ihtiyacının karşılanması açısından önemli bir deniz ürünü olmasıyla beraber, yıllık 250,000 tonu geçen küresel üretimiyle de ekonomik öneme sahiptir (FAO, 2013). Geniş yayılımları, uzun yaşam döngüsü, elde etmedeki kolaylıkları ve su ortamında metal vb. kirleticileri yüksek düzeylerde biriktirmeleri nedeniyle biyoindikatör ve biyomonitör tür olmaya dönük birçok kriteri yerine getirmenin (Sacchi ve diğ., 2013) yanı sıra laboratuvar şartlarına iyi uyum sağlamaları ve mikropplastik toksisitesi bağlamında daha önce çalışılmamaları sebebiyle manila kum midyesi bu çalışmada model organizma olarak seçilmiştir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.CANLILARIN ELDE EDİLMESİ VE ALIŞTIRMA PERİYODU

R.philippinarum türü midyeler Yenikapı Balık Pazarı'ndan alınmış olup hızlıca laboratuvara getirilmişlerdir. Laboratuvara getirildikleri gibi 5 farklı akvaryuma aktarılmışlardır. Hayvanların büyüklükleri $2,96 \pm 0,01$ cm ve ortalama ağırlıkları $17,57 \pm 0,35$ g. olarak belirlenmiştir. Deneyde kullanılan akvaryumlar 15 L yapay deniz suyu ve 15 birey içermektedir. Stres durumunu minimize etmek için midyeler kademeli olarak yapay deniz suyuna alıştırmış ve ilk iki günden sonra tamamen bu suda yaşatılmıştır.



Şekil 3.1: Biyometrik ölçümleri tamamlanan manila kum midyeleri.

Yapay deniz suyu hazırlamak üzere ticari deniz tuzu (Instant Ocean Salt, Aquarium Systems, France) ve PURELAB® Option-Q cihazından elde edilen deiyonize (Tip II) su kullanılmış; yapay deniz suyu ‰21 ($21,19 \pm 0,2$) tuzluluk içerecek şekilde hazırlanmıştır. Midyeler iki günde bir 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda *Isochrysis galbana* türü alg ile beslenmişlerdir. Deney süresince midyeler 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda tutulmuş olup; su değerleri ortalama $8,3 \pm 0,1$ pH ve 20 ± 1 °C olarak ölçülmüştür.

Hayvanlar 12 gün süren alıştırma periyodunun ardından 7 gün süren maruziyet periyoduna alınmıştır. Çalışma totalde 4 tekrardan meydana gelmiştir.

3.2.STOK SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

3.2.1. Surfaktan Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Polietilen partiküllerin birbirlerinin üstüne topaklanmasını engellemek için mikroplastik ana stoğunda yüzey aktif madde olarak surfaktan Tween-80 kullanılmıştır. Gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarında surfaktanın bu amaçla kullanıldığı bilinmekte olup, işe yararlığı da birçok kere gösterilmiştir (Khan ve diğ., 2015; Paul-Pont ve diğ., 2016). Mikroplastiklerin topaklanma göstermesi durumunda büyüklüklerinde artış görülecek ve sonuç olarak büyük partiküller canlılar tarafından filtre edilmeyecek, potansiyel filtrasyon durumu ortadan kalkacaktır. Bu da partiküllerin biyoerişebilirliklerini düşürmekte ve canlıların alım kinetiklerini ve partiküllerin neden olacağı potansiyel toksisiteyi değiştirecektir. Doğal şartlar altında bu topaklanmalar oluşan biyofilm formasyonu ile ortadan kalkabilirken, laboratuvar şartlarında surfaktan kullanımı ile bu durumun önüne geçildiği mikroskop altında kontrol edilmiş, partiküllerin topaklanma göstermediği doğrulanmıştır.

Tween-80 stok solüsyonu için; 1.8 ml Tween-80, 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilmiş yapay deniz suyu ile 100 ml'ye tamamlanmış, bu stoktan 13.33 ml mikroplastik stok solüsyonuna ilave edilmiştir.

3.2.2. Mikroplastik Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılan mikroplastik boncuklar 10-45 µm boyutlarında kırmızı floresan renkte ve polietilen tipte olup satın alınmıştır (Cospheric Inc., USA). Polietilen ağırlıkla ambalaj malzemelerinde kullanılırken, kozmetik ve temizlik sektöründeki ürünlerde de kullanılmaktadır ve en çok üretilen polimerlerdendir (PlasticsEurope, 2016). Yapılan izleme çalışmaları sonucunda da gerek çevresel kompartımanlarda gerekse midyelerde en sık rastlanan polimerlerden biri olmasından dolayı bu çalışma için PE kullanımı tercih edilmiştir (Gago ve diğ., 2018; Li ve diğ., 2018b).

36 mg mikroplastik, 240 ml filtre edilmiş (0.22 µm) yapay deniz suyunda 13.33 ml surfaktan içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ardından solüsyon yarım saat su banyosunda sonikasyona bırakılmıştır. Maruziyet süresince mikroplastikler, hazırlanan mikroplastik ana stoğundan her defasında 2.5 ml çekim yapılarak akvaryumlara aktarılmış ve maruziyet konsantrasyonun 25

$\mu\text{g/l}$ olması sağlanmıştır. Mikroplastik ana stoğundaki Tween-80 oranı %0.001; her spike sonucu Tween-80/akvaryum oranı ise %0,00001'e tekabül etmektedir.

Bununla beraber yarım saat sonikasyonu takiben floresan mikroskop altında, sayım kamarası (Sedgewick Rafter Counting Chambers) ile mikropartiküllerin sayımı tekrarlı şekilde yapılmıştır.

3.2.3. Cıva Stok Solüsyonunun Hazırlanması

30 mg HgCl_2 (Merck) 1000 ml filtre edilmiş ($0.22 \mu\text{m}$) yapay deniz suyu ile tamamlanarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyona göre; akvaryumların $10 \mu\text{g/l}$ Hg konsantrasyonu içermesi için her uygulamanın 5 ml olması gerektiği görülmüş ve ana stoktan bu miktar alınarak deney gruplarına uygulanmıştır.

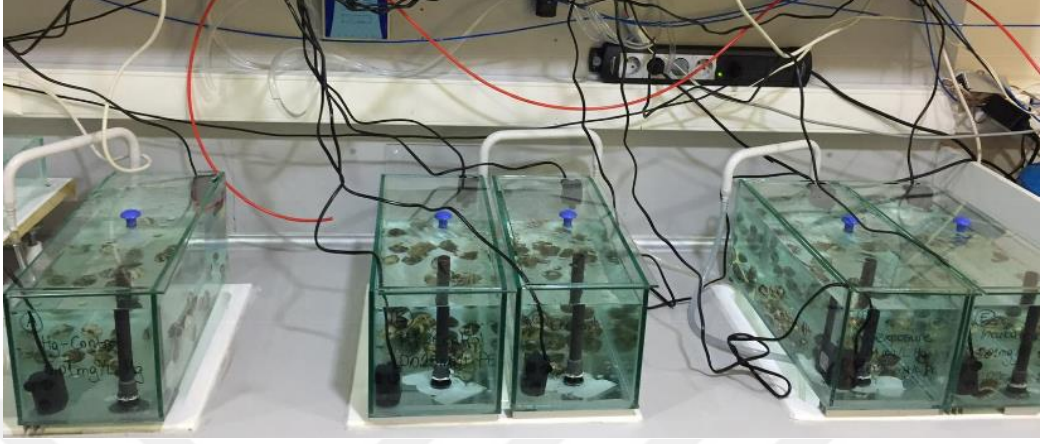
3.3.DENEY GRUPLARI

Çalışma 5 farklı deney grubundan (akvaryumdan) oluşmaktadır. Deney grupları sırasıyla aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda stresörlere maruz bırakılmıştır.

- Kontrol (C) – Herhangi bir stresör içermemektedir.
- Hg – Sadece $10 \mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda Hg içermektedir.
- MP – Sadece $25 \mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda mikroplastik içermektedir.
- Co-Exp; MP, Hg – Birlikte Maruziyet; $10 \mu\text{g/l}$ Hg ve $25 \mu\text{g/l}$ mikroplastik içermektedir.
- Inc; MP + Hg – İnkübe şekilde; $10 \mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda Hg ile 96 saat inkübe edilmiş $25 \mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda mikroplastik içermektedir.

Deney grupları her iki stresörün yalnız, birlikte ve vektör etkilerini yorumlamak amacıyla oluşturulmuştur. Bu amaç doğrultusunda kontrol grubu herhangi bir stresörü içermeyecek şekilde referans olarak alınmakta, Hg deney grubu cıvanın midyeler üzerindeki yalnız etkilerini, MP deney grubu ise mikroplastiklerin yalnız etkilerini görebilmek amacıyla oluşturulmuştur. Ayrıca birlikte maruziyet sonucu doğada canlıların sadece bu iki stresör bağlamında değil, birçok stresörün çoklu baskısı altında olduğu düşünüldüğünde (Khan, 2018); kullanılan her iki stresörün birbirlerinin alım düzeylerine müdahaleleri ve meydana gelebilecek sinerjistik ya da antogonistik etkiler incelenmek istenmiştir. Son deney grubu ile

ise midyelerin sudaki mikroplastiklere maruziyetinin cıva birikimi açısından bir alım yolağı niteliğindeki vektör rolü araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 3.2: Deney grupları.

Kullanılan cıva konsantrasyonu çevresel olarak da gözlenen bir aralıkta olup, daha önceki deneysel çalışmalarda benzeri konsantrasyonların kullanılması ve toksisite belirteçlerinde gözlemlenebilir etkinin görülmüş olması sebebiyle seçilmiştir (Singaram ve diğ., 2013; Velez ve diğ., 2016). Dahası antropojenik kirlilikten etkilenen lokasyonlarda sudaki cıva konsantrasyonların oldukça yüksek değerlere ulaşabildiği daha önceden rapor edilmiştir (Serfor-Armah ve diğ., 2005; Higuera ve diğ., 2006). Yine seçili mikroplastik konsantrasyonu açısından da aynı durum geçerli olup, kullanılan konsantrasyon görece çevresel bir değer olmakla beraber, ağırlıkça benzer konsantrasyonlara maruziyet sonucu gözlemlenebilir toksisite çıktıları saptanmıştır (Sussarellu ve diğ., 2016; Paul-Pont ve diğ., 2016).

Akvaryumların havalandırması Karami (2017)'e göre yapılmış olup; akvaryumların sağ üst ve sol altına birer hava motoru (Eheim) konularak partiküllerin su kolonu boyunca dağılması sağlanmıştır. Hava pompaları ortalama hızda çalıştırılmış ve tüm akvaryumların eşit hızlarda olmasına dikkat edilmiştir. Mikroplastik içeren her deney grubunda partiküllerin akvaryumlara eklenmesinden bir süre sonra, su kolonunun alt, orta ve üst kısımlarından su örneği alınarak mikroplastiklerin su kolonu boyunca dağılımları doğrulanmıştır.

3.4.İNKÜBASYON İŞLEMİ

Cıva açısından mikroplastiklerin vektör rolünü incelemek üzere; ön bir inkübasyon işlemi uygulanmıştır. 300 ml'lik filtreden geçirilmiş (0.22 μm) yapay deniz suyu içeren 0,5 l'lik erlenlere; 25 $\mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda mikroplastik ve 10 $\mu\text{g/l}$ konsantrasyonunda cıva eklenmiştir. Stresörler 96 saat süresince, 20 °C sıcaklıkta cıvanın mikroplastik yüzeylere adsorbe olması için 200 rpm'de karıştırılmıştır. 96 saat sürenin ardından erlendeki solüsyon 2-4 μm por açıklıklı filtre ile erlenlerin çeperleri iyice yıkanarak filtre edilmiş ve bu şekilde hedef akvaryuma verilmiştir. 96 saat sürenin seçilme nedeni ise literatürde metallerin polietilen yüzeylere adsorbsiyonunun 25-100 saat aralığında denge durumuna gelebildiğinin gözlenmesinden dolayı belirlenmiştir (Holmes ve diğ., 2012). Filtrede biriken mikroplastiklerin akvaryuma transferinin ardından, filtreler yine mikroskop altında incelenmiş ve üzerlerinde herhangi bir partikülün kalmadığı doğrulanmıştır.

3.5.MARUZİYET

12 gün süren alıştırmaya periyodunun ardından midyeler maruziyete alınmıştır. Maruziyet süresi 7 gündür. Bu süre boyunca her deney grubundan midyeler iki günde bir farklı kaplarda yarım saat süresince alıştırmaya periyodundaki gibi beslenmeye alınmıştır. Beslenme olsun ya da olmasın, her gün akvaryumların suları tamamen değiştirilmiş ve stresörler güncellenmiştir.

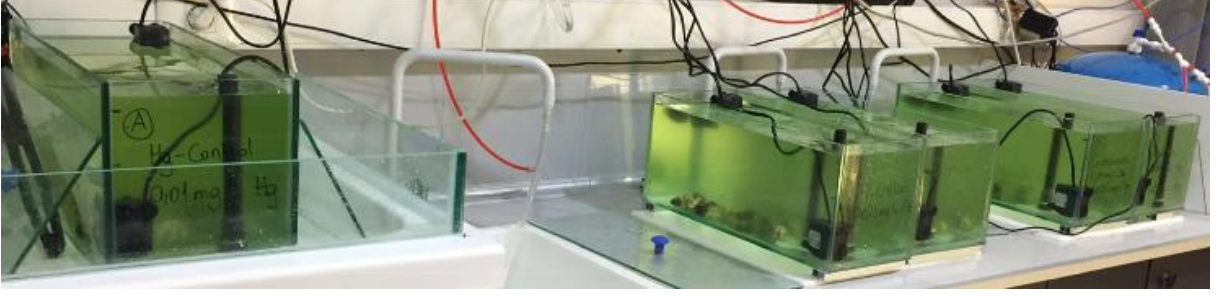
3.6.HEDEF KRİTERLER

3.6.1. Filtrasyon Oranı

Filtrasyon oranı deneyi Riisgård ve diğ. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmaya göre yapılmıştır. Akvaryumlara 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonu olacak şekilde *I. galbana* türü mikroalg verilmiş ve bir saatlik sürenin ardından alg tüketim oranları saptanmıştır. $t=0$ ve $t=60$ anında akvaryumlardan tekrarlı şekilde örnek alınmış ve daha sonra sayımları gerçekleştirilmek üzere %0,5'lik lügol çözeltisi ile fikse edilmiştir. Filtrasyon oranı ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$FR = V / (n.t) \times \log (C_0 / C_{60})$$

FR: Filtrasyon oranı; V: Su hacmi (l); n: Akvaryumdaki midye sayısı; t: Zaman; C₀: t=0 anındaki alg konsantrasyonu; C₆₀: t=60 anındaki alg konsantrasyonu.



Şekil 3.3: Filtrasyon oranının değerlendirilmesi.

3.6.2. Mikroplastik Alımı ve Biyodağılımı

Her deney grubundan I, II. ve III. tekrarların her birinde 3'er hayvan mikroplastik alımı ve biyodağılımının incelenmesi amacıyla disekte edilmiştir. 3 midyenin yumuşak dokuları; solungaç, sindirim bezi, manto ve kalan dokular (mide, bağırsak, gonad vs.) olmak üzere dört fraksiyona ayrılmış ve her doku ortak havuz oluşturacak şekilde farklı falkonlara konularak muhafaza edilmek üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Analiz zamanı yumuşak dokular sindirme işlemine tabii tutulmuştur. Sindirme işlemi Yuan ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışma referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Dokular 0.5 l'lik erlenlere aktarılmış ve 50 ml %10 KOH (w/v) eklenerek 40 °C 100 rpm'de 48 saat süresince çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Excella E24 Incubator Shaker) tutulmuştur. 48 saatin ardından solüsyona 10 ml %30 H₂O₂ kalan organik yapıyı sindirmesi için eklenmiş ve bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Solüsyon, eş hacimde distile su ile seyreltilmiş, vakum pompa (Rocker, 400) yardımıyla 1 µm por açıklıklı filtrelele (Whatman GF/B) biriktirilmiştir. Filtreler analiz öncesi 25 °C'de etüvde kurutulmuş ve temiz petri kaplarında muhafaza edilmiştir. Mikroskop altında içerdikleri kırmızı floresan mikrobuncuk sayıları tek tek kaydedilmiş ve mikroplastik alımı açısından deney grupları arasındaki farklar yorumlanmıştır.



Şekil 3.4: Mikroplastik biyobirikimini incelemek üzere gerçekleştirilen yumuşak doku sindirimi.

3.6.3. Cıva Alımı ve Biyodağılımı

Toplamda 3 tekrarda, her deney grubundan 3'er hayvan cıva alımı ve biyodağılımının incelenmesi amacıyla disekte edilmiştir. Yine midyelerin yumuşak dokuları; solungaç, sindirim bezi, manto ve kalan dokular olmak üzere dört fraksiyona ayrılmış ve her doku ortak havuz oluşturacak şekilde farklı falkonlara konularak daha sonra analiz edilmek üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Analiz öncesi dokular -20 °C'den çıkartılmış ve kuru ağırlığa erişinceye dek -50 °C'de liyafilizatörde (Labconco) dondurulmuştur. Ardından agat-havan yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Ölçümler DMA-80 Direct Mercury Analysis System, MILESTONE kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart çalışma solüsyonları stok cıva solüsyonundan seri seyreltme ile elde edilmiş ve ölçümlerin doğruluğu standart referans midye yumuşak dokusu (Trace Elements & Methylmercury, NIST-SRM 2976) ölçülerek onaylanmıştır. Verim değeri %101,6 olarak belirlenirken, her örnek 3 tekrar olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ng/g d.w. (kuru ağırlık) ifadesiyle verilmiştir.

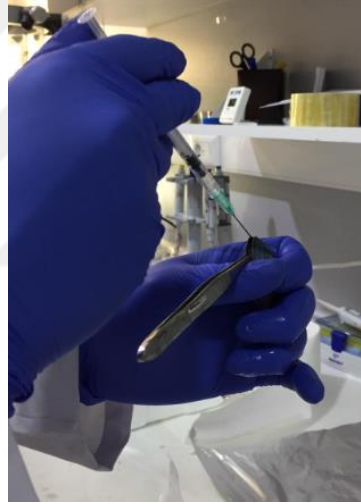
3.6.4. Histolojik İnceleme

Histolojik etkilenmeler tek tekrarda değerlendirilmiştir. Her deney grubundan 3 midyenin solungaç ve sindirim bezi disekte edilmiş, her biri farklı kaplara konularak Bouin fiksatifisi ile 22 saat süresince fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından rutin takip işlemlerinden geçirilen dokular parafine gömülmüşlerdir. Daha sonra 5 µm kalınlığında alınan kesitlere Hematoksilen

& Eozin (HE) ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) reaksiyonu uygulanmıştır (Humanson, 1972). Elde edilen preparatlar Olympus CX 41 mikroskop altında incelenirken, görüntüler Olympus DP 71 dijital kamera yardımıyla elde edilmiştir.

3.6.5. İmmünomodülasyon

Çalışmada her akvaryumdaki 6 hayvanın posterior adüktör kaslarından, 0.2 ml Alseve medyumunu (27mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 115mM D-glucose; 336mM NaCl; 9mM EDTA, pH:7,0) içeren steril 21G uçlu şırıngalar kullanılarak 1:1 oranında hemolenf çekilmiştir. Hemolenf örnekleri ortak havuzda bir araya getirilmiş ve deneyler süresince tüpler buz üzerinde bekletilmiştir. Hemolenflerin ortak havuzda bir araya getirilmesi gerekli örnek alımını sağlamak amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.5: Midyeden hemolenf çekimi.

3.6.5.1.Dolaşımdaki Total Hemosit Sayısı

Havuz yapılan hemolenf örneklerinden 300'er μl alınarak ependorflara aktarılmış ve tüpler gün içerisinde Thoma lamında sayımları yapılmak üzere $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır. Ardından sayımlar gerçekleştirilerek dolaşımdaki total hemosit sayısı açısından deney grupları arasındaki farklar değerlendirilmiştir.

3.6.5.2.Hemosit Yaşayabilirliği

Hemosit yaşayabilirliği tripan mavisini ile muamele edilen hücrelerin inkübasyon sonrasında ölü hücrelerin total hücre sayısına oranı ile ifade edilmektedir (Bianchi ve diğ., 2019). Stres

durumlarına maruz kalan hücrelerde tripan mavisi ile muamele sonucu hücre yaşayabilirliği düşerken, sağlıklı hücreler bu muameleye karşı daha dayanıklı ve yüksek yaşayabilirlik yüzdesi göstermektedir.

Hemosit yaşayabilirliği Bianchi ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmaya göre gerçekleştirilmiştir. Her deney grubundan 100 µl hemolenf, 500g +4 °C’de 20 dk. boyunca hümmoral kompartımanı elemine etmek için santrifüjlenmiştir. Ardından hücreler tekrardan aynı hacimdeki alseve medyumı ile resüspande edilmiştir. Hücre süspansiyonu 50 µl %0,2 tripan mavisi boya eklenerek karıştırılmış ve +4 °C’de 5 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Anlatılan işlem her deney grubu için tekrarlı şekilde yapılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler Thoma lamına aktarılarak ışık mikroskobu (Olympus SZ 51) altında yaşayan hücrelerin total hücre sayısına oranı % olarak hesaplanmıştır.

3.6.5.3.Lizozomal Membran Stabilizasyonu

Deney kapsamında protokol Bianchi ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmaya göre uygulanmış olmakla beraber kısmen modifiye edilmiştir. Özetle; 28 mg nötral kırmızı 1 ml DMSO’ya eklenmiş ve bu solüsyon fizyolojik salin ile 500 kat seyreltilerek çalışma solüsyonu (200 µM) hazırlanmıştır. Her deney grubu için ortak havuz yapılan hemolenf içeriğinden 300 µl’lik miktar tekrarlı şekilde alınmış ve 150 µl çalışma solüsyonu örnekler eklenmiştir. Hücre süspansiyonu hafifçe karıştırıldıktan sonra 1 saat boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 800g 10 °C’de 5 dk. santrifüjlenmiş, sonrasında hücreler 1 ml Alseve medyumı ile yıkanmıştır. Elde edilen pellete ekstraksiyon tamponu (distile suda %1 asetik asit, %50 ethanol) eklendikten sonra tüpler ağızları kapalı şekilde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 150 µl süpernatant düz dipli 96-well platelere aktarılmıştır. Absorbans okuması 550 nm dalga boyunda (Biotek µQuant™) gerçekleştirilmiş, sonuçlar µg protein başına düşen optik yoğunluk (OD_{550nm}/µg protein) şeklinde sunulmuştur (Bradford, 1976). Blank okumaları için DMSO kullanılmış ve tüm işlem aynı şekilde uygulanmıştır.

Nötral kırmızı alım deneyi (Neutral Red Uptake Assay) toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak da kullanılan nötral kırmızı tutunma deneyinin (Neutral Red Retention Assay) mikropate okumasına adapte edilmiş halidir ve lizozomal membran stabilitesini ve hücrelerin pinositoz etkinliğini değerlendirmek için uygulanmaktadır (Bianchi ve diğ., 2019; Matozzo ve

diğ., 2012a). Nötral kırmızının katyonik özelliğinden ötürü, hemositlerin bu boya ile muamelesinin ardından lizozomlar nötral kırmızıyı hücre içine almaya başlamaktadır. Hücrelerin buz üstünde nötral kırmızı ile inkübasyonu süresince, bir kısım hücrenin lizozomları boyanın toksik özelliğinden dolayı destabile olmakta ve boya sitozole sızarak hücreyi patlatmaktadır. Stresörlerden etkilenen hücrelerin membran stabilizasyonu daha kırılgan olduğu için bu hayvanların hücrelerinde söz konusu olay daha sık gerçekleşmektedir. Nitekim santrifüj aşamaları ile patlayan hücreler ve ekstraselüler kompartımandaki boya konsantrasyonu uzaklaştırılarak geriye sadece yaşayan hücrelerin ihtiva ettiği nötral kırmızının kalması sağlanmaktadır. Ekstraksiyon tamponu ile de bu kalan hücreler tahrip edilerek farklı deney gruplarındaki hayvanların pinositik alımı değerlendirilmektedir.

3.6.6. Antioksidan Batarya ve Lipid Peroksidasyonu

Çevresel kirleticilere maruziyet organizma hemostazına etki ederek canlılarda birtakım tahribatlara neden olmaktadır. Hücre içinde ROS artışına paralel olarak oksidatif hasarı minimize etmek üzere antioksidan savunma sistemi harekete geçmektedir. Serbest radikallerin oluşumu hücre içi enerji üretimi gibi doğal süreçlerle kaynaklanabildiği gibi ksenebiyotiklerin etkisi ve fagositik aktivitedeki yükselişe paralel olarak da artış göstermektedir (Pittura ve diğ., 2018). Serbest radikaller hücre içinden uzaklaştırılmadığı takdirde oksidatif hasar meydana gelmekte ve DNA kırılmaları gibi genotoksik çıktılar oluşmaktadır (Avio ve diğ., 2015; Paul-Pont ve diğ., 2016; Ribeiro ve diğ., 2017). Antioksidan savunma ise enzim ve enzim olmayan komponentlerden oluşmaktadır. Enzim yapısındaki antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon reduktaz (GR) enzimleridir ve enzimatik antioksidanlar oldukça spesifik reaksiyonları katalizlemektedir. Bu reaksiyonlar birçok hücreyel yolakla ilintili olduğundan hücreyel düzeyde toksisiteye dair önemli göstergelerdir. Enzimatik olmayan ancak hücreyel kompartımanlarda bolca bulunan diğer bir sitosolik süpürücü ise hem ROS'ların nötralizasyonunda hem de antioksidan enzimler için kofaktör olarak rol oynayan bir tripeptit olan indirgenmiş glutatyondur (Regoli ve Giuliani, 2014).

Örneğin süperoksit dismutaz enzimi (SOD), dismutasyon tepkimesinde katalizör olarak rol oynamaktadır ve süperoksit radikallerini oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürmektedir. Kloroplast ve peroksizomlarda bulunan bu enzim ayrıca son ürün olarak hidrojen peroksiti oluşturarak CAT ve GPx enzimleri için substrat sağlar. Nitekim bu nedenle de çoğu zaman

SOD ile CAT ve GPx aktiviteleri korelasyon göstermektedir (Regoli ve Giuliani, 2014). Diğer bir antioksidan enzim ise katalaz (CAT) enzimidir. Peroksizomlarda bulunan yüksek katalizleme yeteneğine sahip bu enzim hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırmakta ve oluşabilecek lipid peroksidasyonunu engellemektedir (Jemec ve diğ., 2010). Hidrojen peroksidi substrat olarak kullanan diğer bir antioksidan glutatyon peroksidaz enzimi çokça sitozol ve mitokondride yer almaktadır. Katalaz ve glutatyon peroksidazın indüklenmesi de yine oksidatif stresin birer göstergesidir. Diğer bir antioksidan enzim olan glutatyon redüktaz ise glutatyon peroksidaz tepkimesi sonucu oluşan okside glutatyonu indirgenmiş glutatyonla katalizlemektedir. Detoksifikasyon ve hücre içi taşımada önemli rol sahibi bir antioksidan enzim Glutatyon S-transferaz (GST) ise reaktif ara ürünleri katalizlemektedir.

Özetle, antioksidanlar tepkime zincirlerini koparma, peroksidasyonu baskılama, onarma ve süpürme olmak üzere birtakım hücre içi fonksiyonlara sahiptir (Keleştemur ve Özdemir, 2011). Eksikliklerinde lipid peroksidasyonu meydana gelebilmekte ve hücrede geri dönüşümsüz etkiler vuku bulabilmektedir.

Lipid peroksidasyonu ise serbest radikallerin zincir reaksiyonlarıdır ve biyolojik membranlarda gerçekleşmektedir. Membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin otokatalitik süreçlerle oksidasyonu serbest radikallerin artışına oldukça duyarlıdır. Bu yapılar ROS ile tepkime oluşturarak lipid radikalleri meydana getirmektedir. Lipid radikallerin moleküler oksijenle etkileşimi sonucu lipid hidroperoksitler meydana gelmektedir ve bu yapıların yıkımı ise aldehitler, epoksitler ve alkanlar gibi oldukça reaktif yan ürünleri oluşturmaktadır. Bu reaktif ürünler protein yapılarında agregasyona, parçalanmaya ve yine DNA yapısında hasara sebebiyet vererek bu döngünün sürekliliğine yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu komplike bir süreç olmakla birlikte, başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere 3 kısımdan meydana gelir. Başlangıç aşamasında eğer antioksidan savunma yetersiz kalır ve serbest radikaller intraselüler çevreden uzaklaştırılmazsa; lipidler membran yapılarının disfonksiyonuna yol açacak olan yeni karbon bağları meydana getirir. Lipid peroksidasyonu normalde doğal bir süreç olmakla birlikte stres şartları altında artış göstererek metabolik proseslerde rol sahibi biyomolekülleri inhibe edebilmektedir. Lipid peroksidasyonu neticesinde oluşan hasar geri dönüşümsüzdür.

3.6.6.1. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Lipid Peroksidasyonunun Tayini

3 ayrı deney tekrarında uygulanmıştır. Antioksidan bataryayı değerlendirebilmek için her deney grubundaki 6 bireyden solungaç ve sindirim bezi alınmıştır. Her üç midyenin sindirim bezi ve solungaç dokuları ortak havuzda biriktirilerek her deney grubu için havuz oluşturulmuştur. Dokular falkonlara konularak analiz zamanına kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Enzim aktivitelerinin ölçümü için dokuların homojenizasyonunda ekstraksiyon tamponu olarak; 0,01 M PBS (0,02 M NaH₂PO₄, 0,08 M Na₂HPO₄, %9 NaCl), 1mM EDTA, %0.1 Triton X-100 kullanılmış ve taze olarak hazırlanmıştır. 0,1 g doku örneği 500 µl ekstraksiyon tamponu ile Ultra-turrax kullanılarak buz üzerinde homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından örnekler 1,000g +4 °C’de 10 dk. ve 10,000g +4 °C’de 45 dk. olmak üzere santrifüje alınmıştır. Protein özütü temiz ependorflara aktarılarak hızlıca CAT aktivitesi ölçümleri yapılmış, örnekler diğer analizler için -80 °C’ye kaldırılmıştır.

Ekstraksiyon Tamponu:

0,01 M PBS (0,02 M NaH₂PO₄, 0,08 M Na₂HPO₄, %9 NaCl)

1mM EDTA

%0.1 Triton X-100

3.6.6.1.1. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

CAT aktivitesinin tayini substrat olarak kullanılan hidrojen peroksidin 240 nm dalga boyundaki absorbans azalmasına dayanarak gerçekleştirilmektedir. CAT aktivitesinin ölçümü için kullanılan deney tamponu 0,2 M fosfat tamponu (0,2 M NaH₂PO₄ ve 0,2 M Na₂HPO₄; pH:7,2) ve 40 mM H₂O₂’den oluşmaktadır. Ölçümler BioTek Eon™ Microplate okuyucuda gerçekleştirilmiştir. 96-well UV platede 136 µl deney tamponu + 96 µl H₂O₂ (40mM) + 8µl protein özütü ile reaksiyon başlatılarak 2 dk boyunca 10 saniye aralıklarla okuma gerçekleştirilmiş, meydana gelen absorbans farkı hesaplanmıştır. Deneyde kullanılan protein özütü 10 kat seyreltilerek ölçümler alınmıştır. Blank olarak ise protein özütü yerine ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. Sonuçlar U/mg protein şeklinde ifade edilirken, 1 U dakikada 1 µmol H₂O₂’nin katalizlenmesi için gereken enzim miktarıdır.

CAT Aktivitesi Tayininde Kullanılan Reaksiyon İçeriği:

0.2 M Fosfat Tamponu	196 µl
40 mM H ₂ O ₂	96 µl
Protein Özütü	8 µl

3.6.6.1.2. GSH Konsantrasyonlarının Saptanması

İndirgenmiş glutatyon tayini Beutler ve diğ. (1955) referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Doku özütlerindeki serbest sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu kompleksin 412 nm’de absorbans okuması yapılmıştır. Bunun için 50 µl homojenata, 75 µl proteinsizleştirme çözeltisi (0,2 M Metafosforik asit, 2.7 mM EDTA-disodyum tuzu ve 5 M NaCl) eklenmiş ve vortekslenen solüsyon 5 dk. beklemeye bırakılmıştır. Bu süreyi takiben solüsyon +4 °C 1,000 g’de 10 dk. boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında 50 µl supernatanta, 200 µl 0,3 M Na₂HPO₄ ve 50 µl Ellman ayırıcı (1 mM 5-5’-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB); %1’lik trisodyum sitrat dihidrat çözeltisi içinde hazırlanır) eklenerek 5 dk. içinde 412 nm’de spektrofotometrede (Biotek µQuant™) okuma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değeri GSH standartları kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar µg GSH/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

3.6.6.1.3. Malondialdehit (MDA) Tayini

Lipid peroksidasyonunun şiddetini belirlemede kullanılan en yaygın yöntemlerden biri tiyobütirik asitle reaksiyona giren maddelerden (Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TBARS) biri olan lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA) kullanılarak yapılan ölçümlerdir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu toksik MDA meydana gelmektedir. MDA hücre membranlarının redoks dengesini modüle edebilmekte ve protein yapılarının hasara uğramasına yol açarak genotoksik çıktılara yol açabilmektedir. Dahası MDA meydana gelen dokudan uzak bölgelere de yayılarak oksidatif hasara sebep olabilmektedir.

Toplamda 3 deney tekrarında değerlendirilen lipid peroksidasyonu Ringwood ve diğ. (2003) referans alınarak gerçekleştirilmiştir. -80 °C’den çıkarılan dokular tartıma alınmış, 4 hacim kadar (w/v=1/4) ekstraksiyon tamponu (50 mM K₂PO₄; pH:7,0) ile buz üzerinde Ultra-turrax kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından dokular 13,000g +4 °C’de 5

dk. boyunca santrifüje alınmıştır. Santrifüjü takiben 100 µl süpernatant, 1,400 µl TBA solüsyonu (0,25 N HCl; %0,0375 Tiyobütirik asit, %15 Trikloroasetik asit (TCA)) ve 14 µl Butylated Hidroxytoluene (ethanol içerisinde, %2) bir araya getirilerek vortekslenmiş, 100 °C'de 15 dk. boyunca su banyosunda ısıtılmıştır. İnkübasyonun ardından örneklerin oda sıcaklığında soğumasına izin verilmiş ve 13,000g de ve oda sıcaklığında 5 dk. boyunca bir kez daha santrifüjlendikten sonra 532 nm'de (BioTek Eon™ Microplate Spectrophotometer) okuma gerçekleştirilmiştir. Blank olarak ekstraksiyon tamponu uygulanırken, standartlar 10 mM stok MDA (1,1,3,3-tetrametoksipropan, Sigma-Aldrich) ve K₂PO₄ kullanılarak hazırlanmıştır. Sonuçlar ıslak ağırlıkta gram doku başına düşen nmol MDA (nmol MDA/g f.w.) şeklinde ifade edilmiştir.

3.6.6.1.4. Total Protein Ölçümü

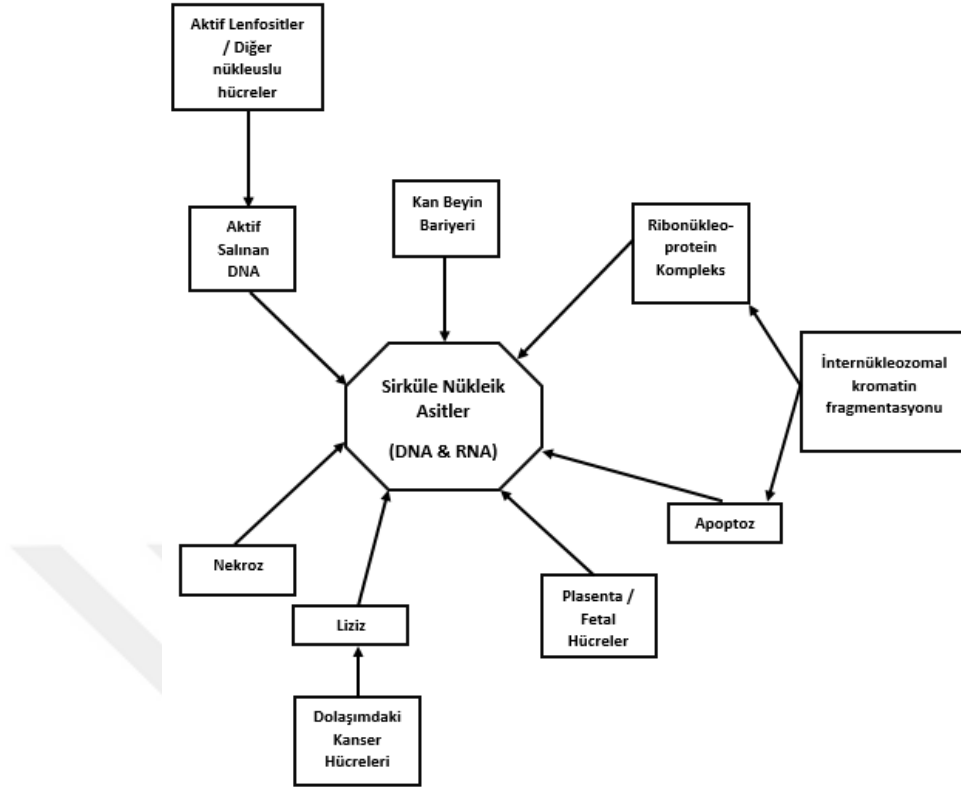
CAT ölçümünün ardından aynı doku homojenatında protein ölçümü gerçekleştirilmiştir. Protein tayini Bradford (1976)'a göre yapılmış ve 595 nm'de absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Blank olarak saf su kullanılmıştır. Sonuçlar BSA (Bovine serum albumin) kullanılarak oluşturulan standart eğriye göre hesaplanmış ve örneklerin mg/ml protein ifadesinde miktarları belirlenmiştir.

3.6.7. Dolaşımdaki Hücre Serbest Nükleik Asitlerin Kantitasyonu

Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitler (circulating cell free nucleic acids) plazmada ya da diğer vücut sıvılarında serbest halde bulunmaktadır. Sirküle nükleik asitlerin tarihi 1940'lı yıllara kadar uzanmakta olup ilk Mandel ve Metais (1948) tarafından plazmada serbest halde nükleik asitlerin varlığının ortaya konulması ile keşfedilmiştir. Ne yazık ki o dönemde bu keşif göz ardı edilmiş ve sonraki 30 yıl boyunca konuyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. 1970'li yıllara gelindiğinde ise Leon ve diğ. (1977) kanserli hastaların sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek sirküle nükleik asit düzeylerine sahip olduklarını ve kemoterapi sonrası bu düzeylerin azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu gözlemin ardından konu ile ilgili çalışma sayısı giderek artış göstermiş ve son yıllarla beraber felç, diyabet, travma ve kanser gibi konuların patolojisi bağlamında dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin varlığı ve etkileşimlerine dönük ciddi ilerleme kaydedilmiştir (Lo ve diğ., 2000; Rainer ve diğ., 2003; Schwarzenbach ve diğ., 2011; Guay ve Regazzi, 2013). Günümüzde ise artık vücut sıvılarında dolaşan hücre serbest nükleik asitlerin konsantrasyonlarından

hastalıkların teşhisi ve tedavi süreçlerine yönelik hızlı ve duyarlı biyobelirteçler olarak faydalanılmaktadır (Schwarzenbach ve diğ., 2011; Creemers ve diğ., 2012)

Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitler çeşitli yollarla orjinlenebilmektedir. Çeşitli hücrelerden kompleksler halinde salınabilir ya da immunoglobulinler gibi spesifik nükleik asit bağlama özelliğine sahip proteinler aracılığıyla hücre yüzeylerine bağlı halde bulunabilmektedir (Laktionov ve diğ., 2004). Dahası proteolipidlerle kompleks oluşturabildiği gibi (Wieczorek ve diğ., 1985), apoptotik veziküllere gömülebilir (Lichtenstein ve diğ., 2001) ve çeşitli proteinlerle de kompleks oluşturabilmektedir (Van Der Vaart ve Pretorius, 2008). Apoptoz ve nekroz süreçleri dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitler açısından başlıca orjinlerden biridir ve başta yüksek hücre ölümüne neden olan patolojik süreçlerde meydana gelen serbest DNA fragmentleri dinamik yapıdaki dolaşım sıvısına geçebilmektedir (Jahr ve diğ., 2001). Bununla beraber kanser hücrelerinin proliferasyonu sonucu aktif ya da spontan şekilde salınan DNA'nın da hücre dışı nükleik asitlerin bir diğer kaynağı olduğu belirtilmiştir (Anker ve diğ., 1975). Örneğin tümör varlığında DNase I ve II'nin aktiviteleri azalmaktadır ve normal şartlarda sirkülasyondaki DNase-I ve II enzimleri DNA'yı degrade etmektedir. Sağlıklı bireylerde düşük düzeylerde seyreden plazma DNA konsantrasyonlarına karşılık hasta bireylerin plazmalarında daha yüksek nükleik asit düzeyleri görülmektedir (Swarup ve Rajeswari, 2007). Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin diğer bir köken aldığı kaynak ise genomik DNA'nın enzimatik yıkımıdır ve DNA'dan spontan olarak serbestlenen nükleozomal yapılar vücut sıvılarında saptanabilmektedir (Adams ve diğ., 1997; Wataganara ve Bianchi, 2004). Şekil 3.6'da sirküle DNA ve RNA'nın orjinlendiği başlıca yollar gösterilmiştir.



Şekil 3.6: Dolaşım sıvısına geçen nükleik asitlerin kökenlendiği çeşitli yollar (Swarup ve Rajeswari, 2007).

RNA interferans (RNAi) diye bilinen işlem küçük kılavuz RNA'lara ve spesifik etkileşimli proteinlere dayanan, evrimsel olarak korunan bir gen susturma mekanizmasıdır (Gammon ve Mello, 2015). Mikro RNA'lar (miRNA) yaklaşık 22 nükleotidden oluşan tek zincirli kodlanmamış RNA molekülleridir ve gen ifadesinin düzenlemesinde rol oynamaktadırlar (Bartel, 2004). İlk miRNA keşfi 1990lı yılların başlarına dayansa da 2000li yıllarla beraber miRNA'lar patolojilere ve terapi süreçlerine dönük biyobelirteç olabilme potansiyellerinden ötürü dikkatleri üstüne çekmiştir (Friedländer ve diğ., 2014; Creemers ve diğ., 2012). Tek bir gen yüzlerce miRNA bağlanma bölgesi içerebilmekte ve tek bir miRNA yüzlerce mRNA'yı etkileyebilmektedir (Bushati ve Cohen, 2007). miRNA'ların hücresel fonksiyonlarda, proliferasyon, apoptoz, metastaz, stres cevapları ve hücresel değişimlerde rol oynayan genleri hedef aldığı bilinmektedir (O'connel ve diğ., 2010).

DNA, RNA ve miRNA'lar doku örneklerinde saptanabilir olmalarının yanı sıra dolaşım ve diğer vücut sıvılarında da saptanabilmekte ve bu kompartımanlarda da stabil kalabilmektedir (Çağlar ve Çayır, 2018; Weber ve diğ., 2010). Elde etmedeki kolaylıkları, tekrar edilebilirlikleri, oda sıcaklığına ve çözünme-donma döngülerine karşı dirençleri nedeniyle

dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin kantitasyonu biyobelirteç olarak oldukça efektif bir yaklaşımı temsil edebilir (Reid ve diğ., 2011). Bu nedenle bu çalışma kapsamında midye hemolenf sıvılarında dolaşımdaki hücre serbest DNA, RNA ve miRNA kantitasyonu yapılmış ve stres durumlarının bahsi geçen parametrelerde bir farklılığa neden olup olmadığı incelenmiştir.

Dolaşımdaki hücre serbest DNA, RNA ve miRNA miktarlarının belirlenmesine dönük protokol Çağlar ve Çayır (2018) tarafından yapılan çalışma temel alınarak uygulanmıştır. Herhangi bir medyum olmadan her hayvanın posterior adüktör kaslarından 150 µl hemolenf 21G uçlu tek kullanımlık steril şırıngalar kullanılarak çekilmiş ve DNas-free ependorflara aktarılmıştır. Daha sonra tüpler 3,000g +4 °C’de 10 dk. santrifüjlenmiş, süpernatant başka bir DNas-free tüpe aktararak 16,000g +4 °C’de 10 dk. boyunca tekrar santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant analiz zamanına kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Analiz zamanı hemolenf örneklerindeki total nükleik asit kantitasyonu Quant-iT™ DNA assay kit (Quant-iT™ microRNA Assay Kit) ve Qubit florometre (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak belirlenmiştir. Qubit 2.0 florometre DNA, RNA ve miRNA düzeylerini kantite etmede kullanılmıştır. Her bireyin dolaşımdaki hücre serbest DNA, RNA, miRNA düzeyleri, konsantrasyonları bilinen standartlara göre değerlendirilmiştir. Örnekler iki tekrar olarak analiz edilmiş olup nihai konsantrasyon bu iki değerin ortalaması şeklinde belirlenmiştir.

3.7.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Kolmogrov-Smirnov testinden faydalanılırken, varyansların homojenliğini belirlemek için ise Levene testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar normal dağılım göstermeyen sonuçlar için parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis ve post hoc Dunn testi ile ya da normal dağılım gösteren sonuçlar için parametrik test olan One Way Anova ve post hoc Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ortalama ve standart sapma ya da standart hata değerleri ile birlikte sunulmuştur. Tüm istatistikler IBM SPSS 22.0 programı kullanılarak yapılmış olup grafiklerin çiziminde ise Graphpad Prism ve Excel programlarından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma farklı tekrarlar da çeşitli kriterlere bakılan totalde dört ardışık kopyadan meydana gelmiştir. Histopatolojik değerlendirme tek tekrar üzerinde gerçekleştirilmiş olup, cıva ve mikroplastik ölçümleri, antioksidan batarya, dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin kantitasyonu ve hemosit yaşayabilirliği ve dolaşımdaki total hemosit sayısı üç tekrarda incelenmiş; nötral kırmızı deneyi ise iki tekrarda ele alınmıştır.

4.1.PARTİKÜL SAYISI

Mikroplastik ana stoğundan alınan örnek sayım lamına aktararak tekrarlı şekilde floresan mikroskop altında sayılmıştır. Sayım sonuçlarına göre boyutları 10-45 µm arasında değişen ve ağırlıkça 25 µg/l 'ye tekabül eden mikroplastik konsantrasyonunun ml'de 144 ± 27 partikül içerdiği görülmüştür.

4.2.HAYATTA KALIM

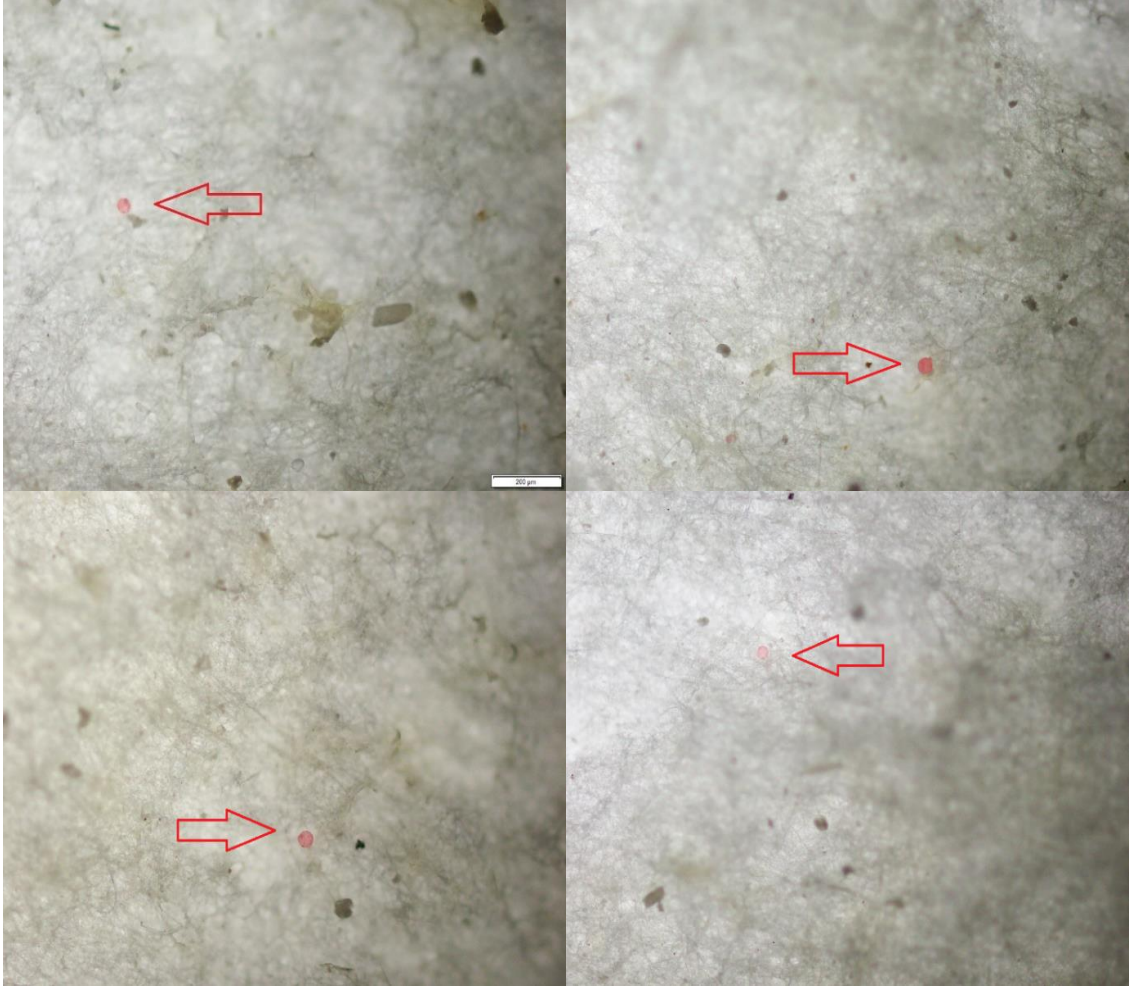
Çalışma boyunca toplamda 4 hayvan ölümü gerçekleşmiştir. Tüm tekrarlar ile birlikte değerlendirildiğinde ölüm oranları açısından deney grupları arasında bir farklılık bulunmamaktadır. ($p>0,05$).

4.3.MİKROPLASTİK ALIMI VE BİYODAĞILIMI

Toplam üç tekrarda tüm deney gruplarından 3 hayvan; sindirim bezi, solungaç, manto ve kalan dokular olmak üzere dört fraksiyona ayrılarak ortak havuz yapılmış ve bu dokular %10 KOH ile sindirildikten sonra filtrelerde biriktirilerek sayımları gerçekleştirilmiştir. Tüm tekrarlarla beraber her deney grubu için 9, toplamda ise 45 midye incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de ort. $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur.

Tablo 4.1: Bir hafta süresince polietilen mikrobuncuklara maruz bırakılan midyelerde mikroplastiklerin dokulara göre dağılımları (Filtre sayısı=3).

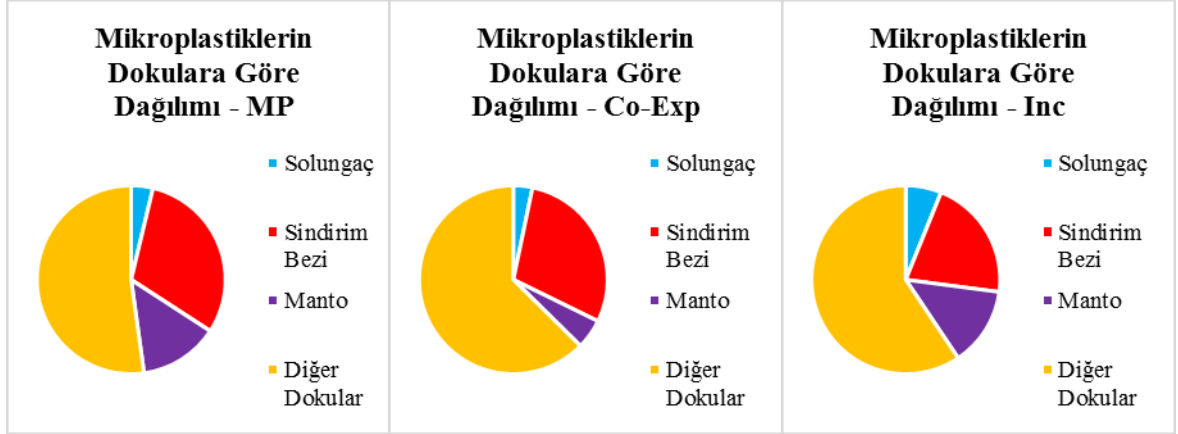
Deney Grubu	Solungaç	Sindirim Bezi	Manto	Kalan Dokular	Total
C	-	-	-	-	-
Hg	-	-	-	-	-
MP	4,00 ± 4,58	32,67 ± 16,26	14,67 ± 11,06	56,00 ± 17,58	107,3 ± 13,20
Co-Exp	2,33 ± 1,53	20,67 ± 7,57	3,67 ± 0,58	44,67 ± 18,01	76,00 ± 17,44
Inc	4,67 ± 3,79	16,00 ± 3,00	10,33 ± 2,08	45,53 ± 5,132	76,33 ± 10,79



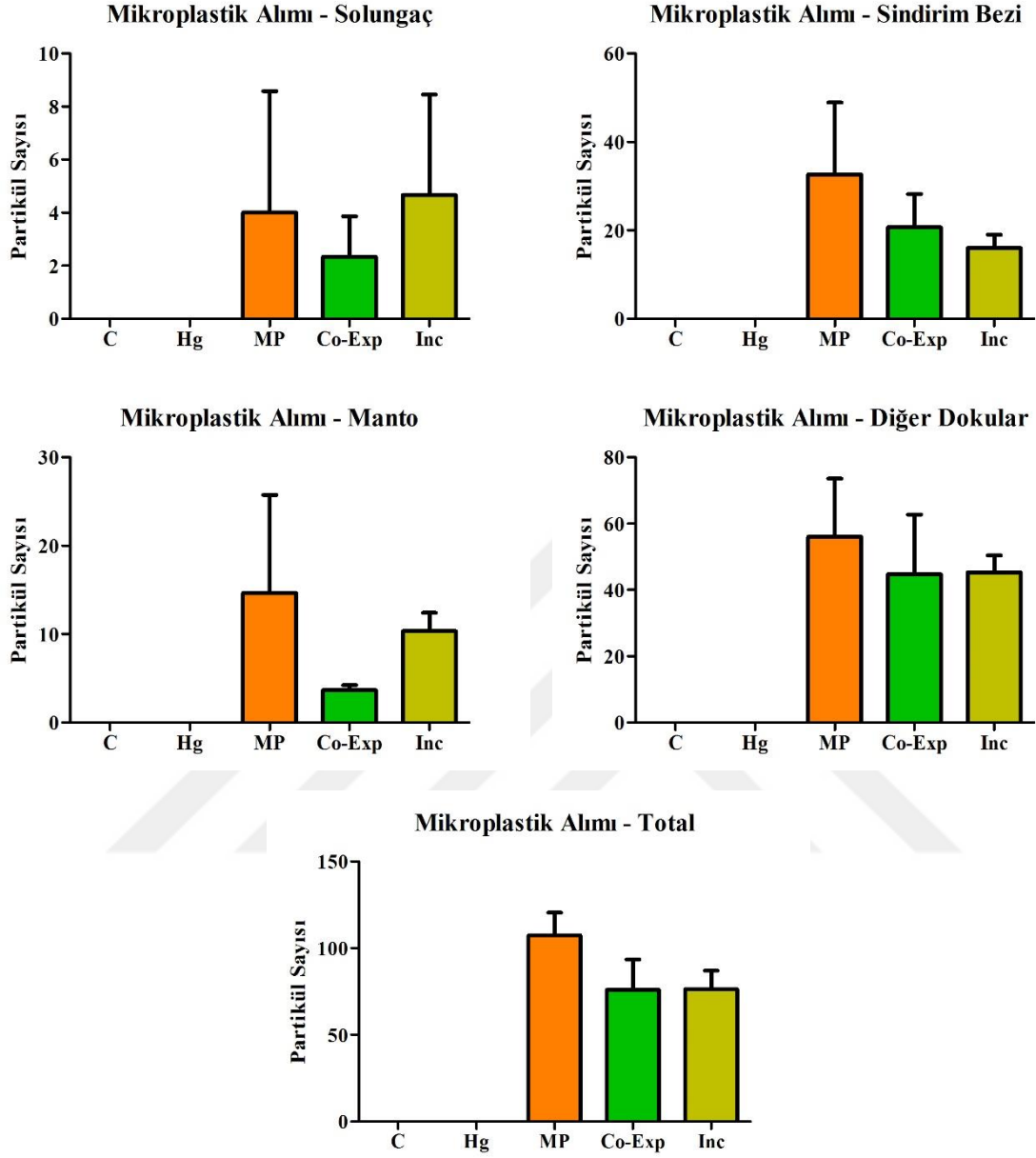
Şekil 4.1: Doku sindiriminin ardından filtrelerde biriktirilen kırmızı floresan mikrobuncuklar; Bar 200 µm.

Sonuçlara göre mikroplastik içeren tüm deney gruplarında mikrobuncukların midyeler tarafından filtre edildiği ve hatta bu partiküllerin diğer dokulara da transloke olabildiği ve

birlikte deney grupları arasında herhangi bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bununla beraber sonuçlara bakıldığında cıva varlığının (kombin ya da inkübe şekilde) midyelerin mikroplastikleri bünyelerine almasını baskıladığı görülmektedir.



Şekil 4.2: Maruziyet sonrası deney gruplarında mikrobuncukların dokulara göre % dağılımı. Midyeler tarafından alınan mikroplastiklerin organlara göre dağılımı karşılaştırıldığında ise tüm deney gruplarında en yüksek mikroplastik birikimi sırasıyla kalan dokular ve sindirim bezinde görülürken, en düşük sayıda mikroplastığa ise sırasıyla solungaç ve mantoda rastlanılmıştır. Dokularda saptanan mikroplastik sayıları deney gruplarında değişse de herhangi bir doku ele alındığında deney grupları arasında anlamlı bir farka rastlanılmamıştır.



Şekil 4.3: Maruziyet sonrası farklı dokulardaki mikrobuncuk birikimi.

4.4.CIVA ALIMI VE BİYODAĞILIMI

Toplam üç tekrarda tüm deney gruplarından 3 hayvan; sindirim bezi, solungaç, manto ve kalan dokular olmak üzere dört fraksiyona ayrılarak ortak havuz yapılmış ve bu şekilde cıva ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4-2, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de ort. $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur.

Balık pazarından laboratuvara getirilen midyeler ortam şartlarına uyum sağlaması için alıştırmaya periyoduna alınmış ve bu süreçte gerek cıva gerekse de ihtiva ettikleri diğer

kirleticiler açısından bir nevi atılım sürecine tabii tutulmuş ve bu kirleticileri bünyelerinden uzaklaştırmaları mümkün olmuştur. Lakin deneye başlamadan önce hayvanlarda cıva ölçümü gerçekleştirilmemiştir. Bununla birlikte iki deney grubu (C ve MP) deney süresince cıva ile herhangi bir şekilde muamele görmemiş, bu deney gruplarından midyelerde cıva konsantrasyonları birbirine oldukça yakın bulunmuş ve hayvanların deney senaryosunun dışında herhangi bir strese neden olmayacak düzeyde cıva içerdikleri doğrulanmıştır. Bu midyelerde saptanan cıva konsantrasyonları organizmalar açısından etki aralığı oldukça düşük değerlerdir ve kirlilikten etkilenmemiş lokasyonlardaki konsantrasyonlara karşılık gelmektedir (Long ve diğ., 1995; Moschino ve diğ., 2011).

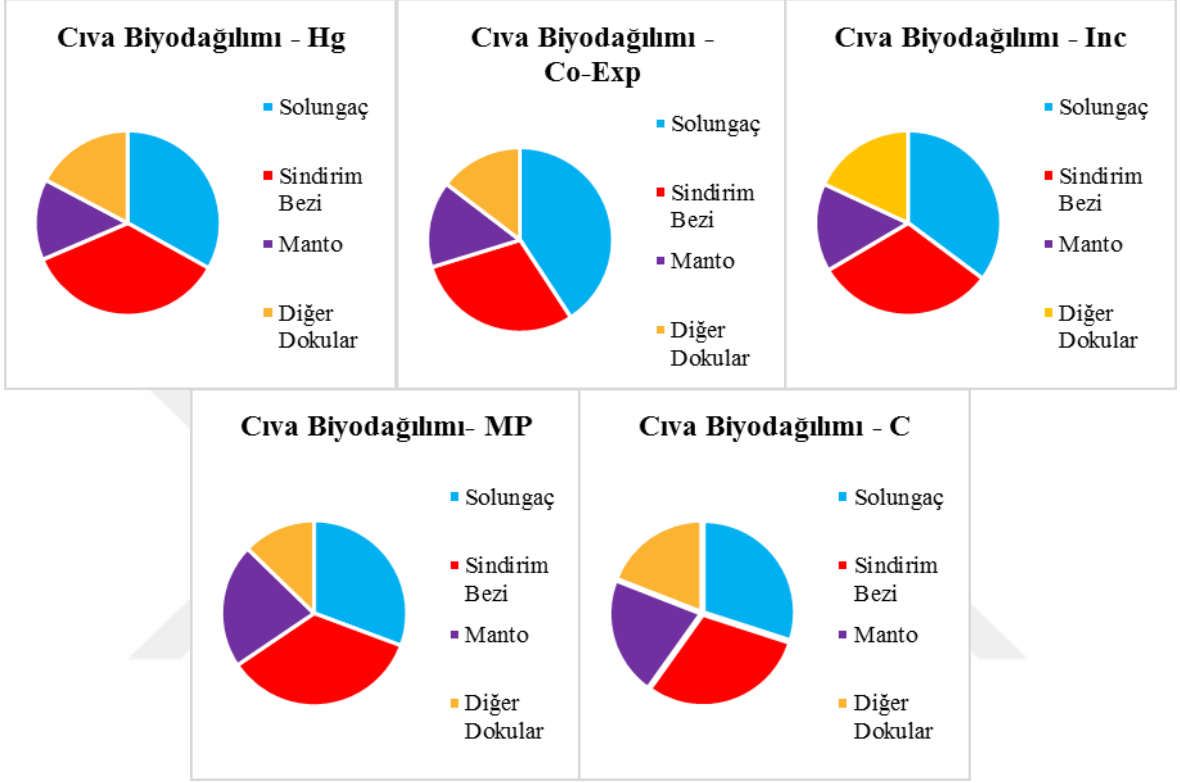
Tablo 4.2: Maruziyet sonrası midye dokularındaki cıva konsantrasyonları, ng/g d.w.⁻¹, (n=3).

Deney Grubu	Solungaç	Sindirim Bezi	Manto	Kalan Dokular	Total
C	1,09 ± 0,04	1,09 ± 0,06	0,77 ± 0,02	0,693 ± 0,416	3,64 ± 0,05
Hg	655,4 ± 17	701,5 ± 130	281 ± 36	342 ± 116,6	1980 ± 39
MP	1,3 ± 0,15	1,477 ± 0,22	0,92 ± 0,14	0,540 ± 0,382	4,24 ± 0,66
Co-Exp	647,1 ± 13	466,9 ± 123,5	240,6 ± 48,9	231,8 ± 99,15	1586 ± 191
Inc	6,877 ± 0,22	6,110 ± 0,69	3,013 ± 0,209	3,53 ± 0,52	19,53 ± 0,98

Sonuçlara bakıldığında cıvaya sudan maruz kalan deney gruplarından (Hg ve Co-Exp) midyelerde cıva birikiminin oldukça yüksek seyrettiği ve hayvanların hayli yüksek konsantrasyonlarda bu kirleticiyi bünyelerinde biriktirdiği görülmektedir. Co-Exp deney grubuna bakıldığında ise su ortamındaki mikroplastik varlığının midyelerin cıva alımlarına etki ederek birikimlerinde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Bununla beraber Hg ve Co-Exp deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$).

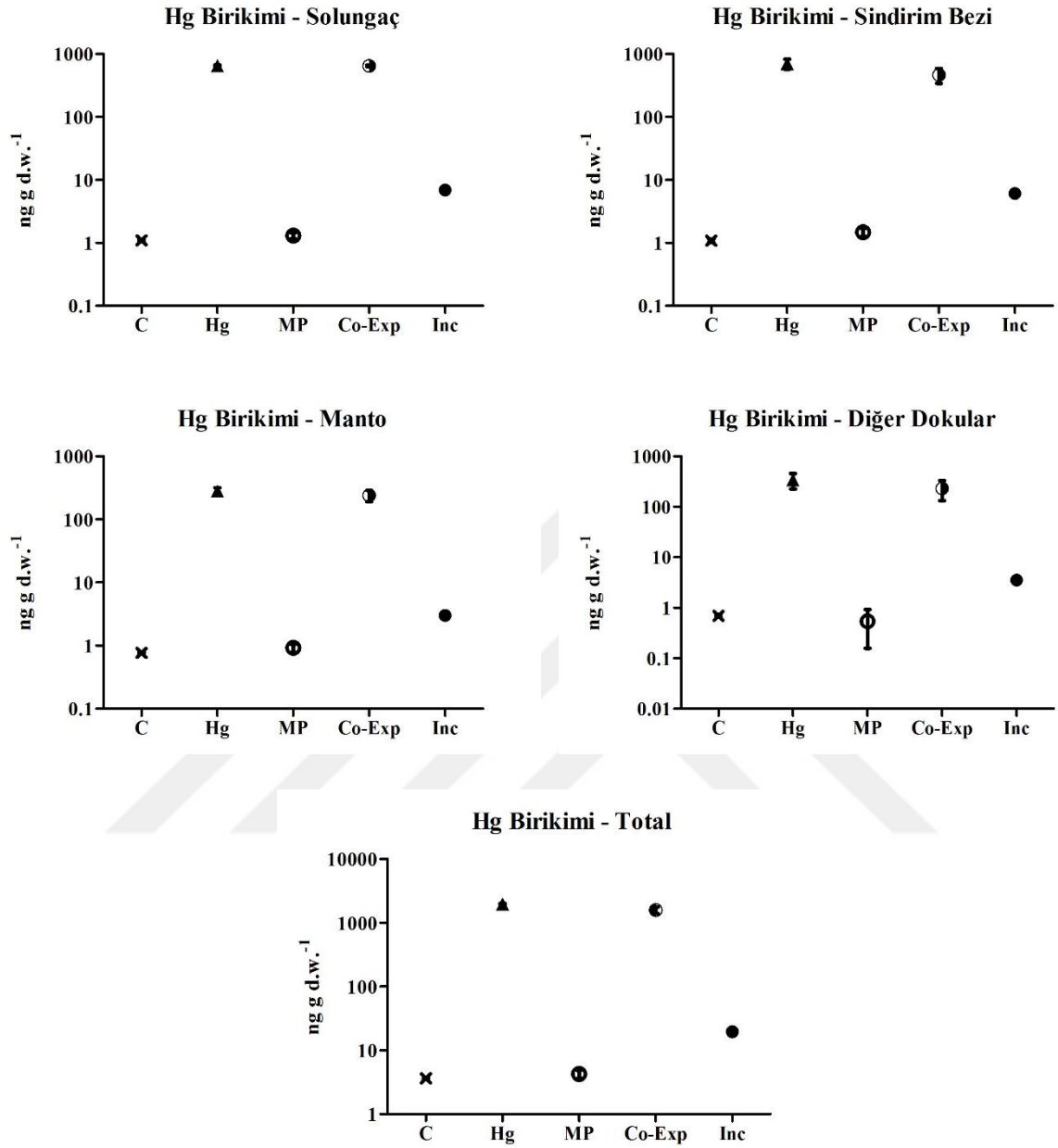
Inc deney grubunda ise cıva maruziyeti sadece PE mikroboncukların yüzeyinden doğru gerçekleşmiştir. Bu deney grubunda midyelerin mikroplastikleri bünyelerine aldıkları görülmüştür. Nitekim mikroplastiklerden doğru bünyelerine aldıkları cıva konsantrasyonlarının sudan alıma kıyasla çok düşük kaldığı görülmektedir. Diğer yandan herhangi bir nitelik değerlendirilmesi yapılmamakla beraber (psödo-)feçesler mikroskop altında incelenirken (psödo-)feçeslere gömülü en yüksek mikroplastik sayısının Inc deney grubunda olduğu gözlenmiştir. Bu durumun da Inc deney grubunda cıva birikiminin düşük

olmasına neden olan etmenlerden biri olduğu söylenebilir. Sonuç olarak mikroplastiklerden doğru cıva alımında midyelerde cıva konsantrasyonları artış gösterse de anlamlı bir farka sebep olacak kadar birikime yol açmamış, saptanan konsantrasyonlar sudan alıma kıyasla çok daha düşük seyretmiştir.



Şekil 4.4: Deney gruplarında cıvanın dokulara göre % dağılımı.

Hg, Co-Exp ve Inc deney gruplarında en yüksek cıva birikimleri yine sırasıyla solungaç ve sindirim bezinde görülmektedir. Hg deney grubunda solungaç ve sindirim bezinde birbirine yakın konsantrasyonlara rastlanırken, mikroplastik içeren deney gruplarında ise solungaçta sindirim bezine kıyasla daha yüksek konsantrasyon görülmektedir. Bu durum midyelerin partikül alımını reddetmesi ve (psödo-)feçes üretimini arttırmasıyla açıklanabilir. Netice olarak yüksek (psödo-)feçes üretimi artan cıva eliminasyonuna yol açacaktır. Ek olarak Hg deney grubunda solungaç ve sindirim bezinin yakın konsantrasyonlar göstermesi ise asimile edilen cıvanın sindirim bezinde detoksifikasyonunun gerçekleşmesi amacıyla birikim artışı gösteriyor olabilir.

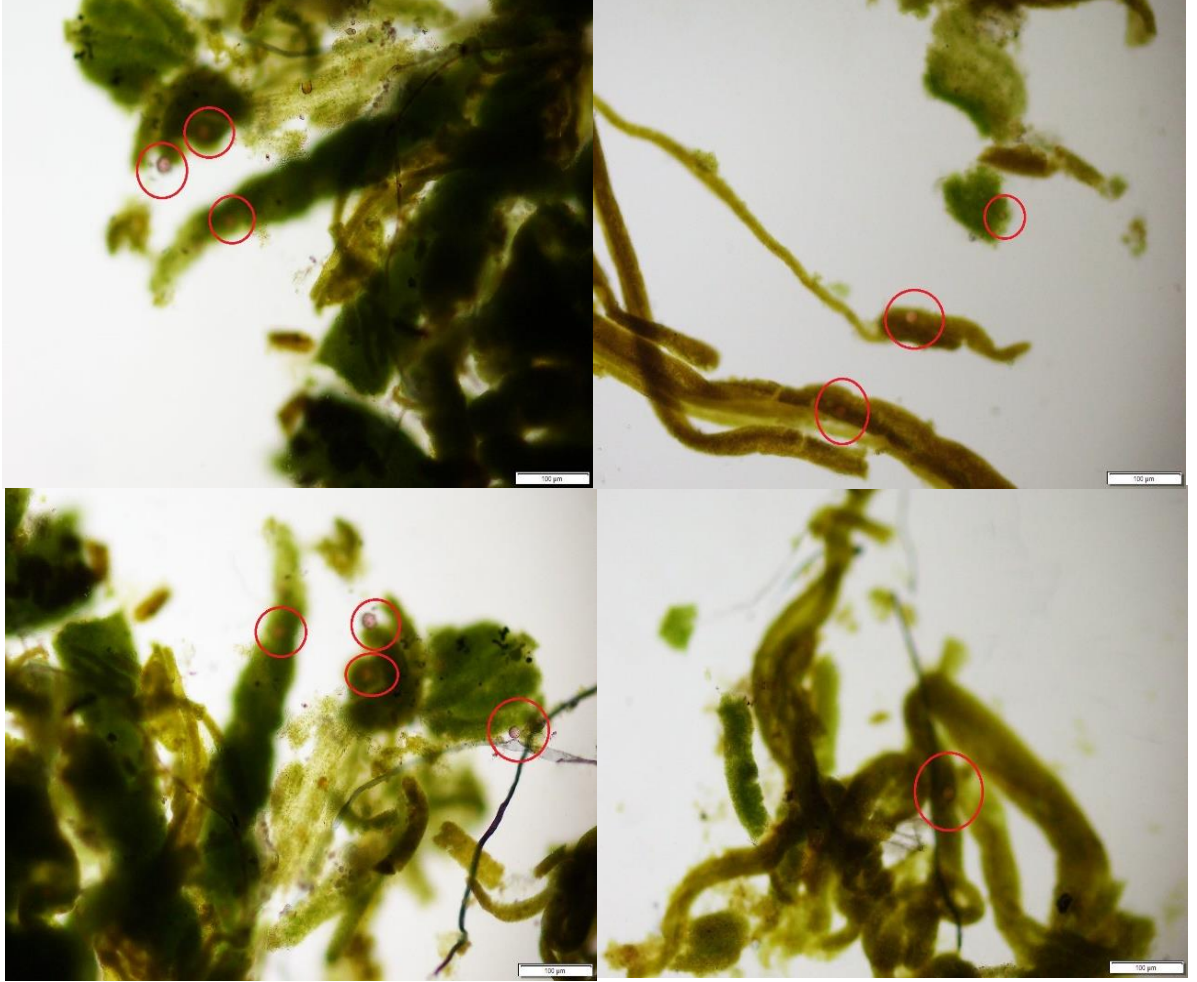


Şekil 4.5: Dokulardaki cıva biyobirikimi.

4.5.FEÇES VE PSÖDOFEÇESLERDE MİKROPLASTİK VARLIĞI

Bu deney kapsamında her ne kadar midyelerin psödofeçes ve feçes üretimi kantitatif olarak değerlendirilmemiş olsa da sular değiştirilmeden ve stresörler güncellenmeden önce mikroplastik içeren deney gruplarından (psödo-)feçesler toplanıp mikroskop altında incelendiğinde mikroplastik varlığı görülmüştür. Saptanan mikroplastiklerin bu dışkılarına gömülü bir şekilde olması bu partiküllerin akvaryum içerisinde dışkı yüzeylerine yapışmalarından ziyade midyeler tarafından filtre edilip uzaklaştırıldığını göstermektedir.

Ayrıca mikroplastiklerin (psödo-)feçes yapılarına gömülü olmaması da onların midyeler tarafından filtre edilip uzaklaştırılmadığı anlamına gelmemekte, ancak gömülü bir halde olması bu durumu doğrulamaktadır (Karakolis ve diğ., 2018).



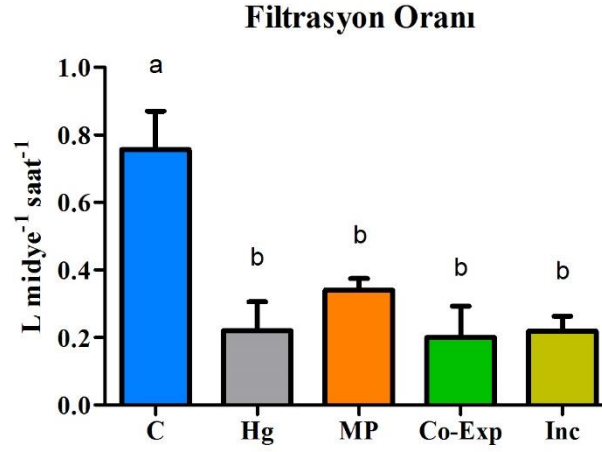
Şekil 4.6: Psödofeçes ve feçes ile uzaklaştırılan mikrobuncuklar. Bar: 100 µm.

4.6.FİLTRASYON ORANLARI

Deney grupları filtrasyon oranları açısından incelendiğinde C deney grubunun en yüksek filtrasyon düzeyini gösterdiği; mikroplastik ve cıvaya yalnız, birlikte ve inkübe şekilde maruziyet sonucunda ise manila kum midyelerinin filtrasyon oranlarının kontrole kıyasla önemli şekilde düşüş gösterdiği görülmektedir ($p < 0,05$). Sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.7’de $\text{ort} \pm \text{std. sapma}$ olarak sunulmuştur.

Tablo 4.3: Filtrasyon oranları, l midye⁻¹saat⁻¹.

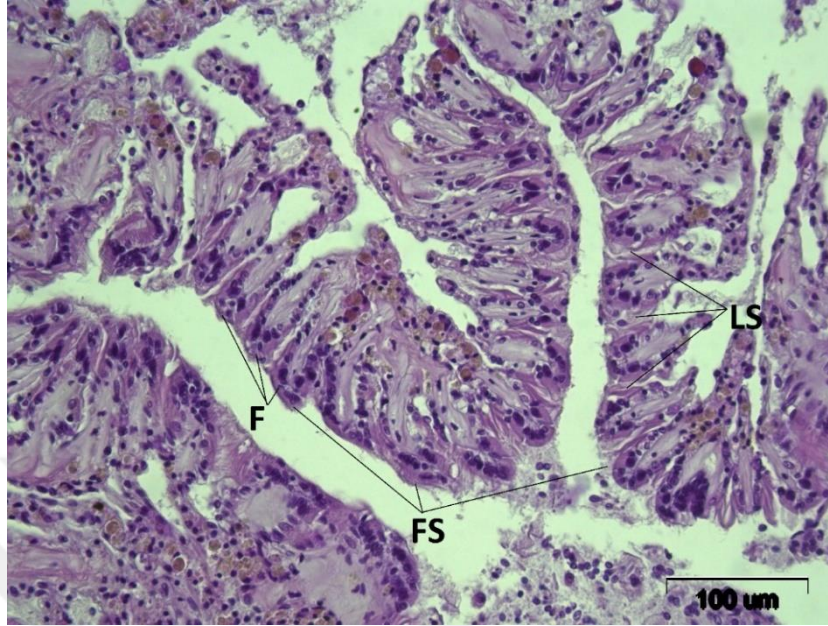
Deney Grubu	Filtrasyon oranı (l midye ⁻¹ saat ⁻¹)
C	0,76 ± 0,11
Hg	0,22 ± 0,08
MP	0,34 ± 0,03
Co-Exp	0,20 ± 0,09
Inc	0,22 ± 0,04

**Şekil 4.7:** Filtrasyon oranları.

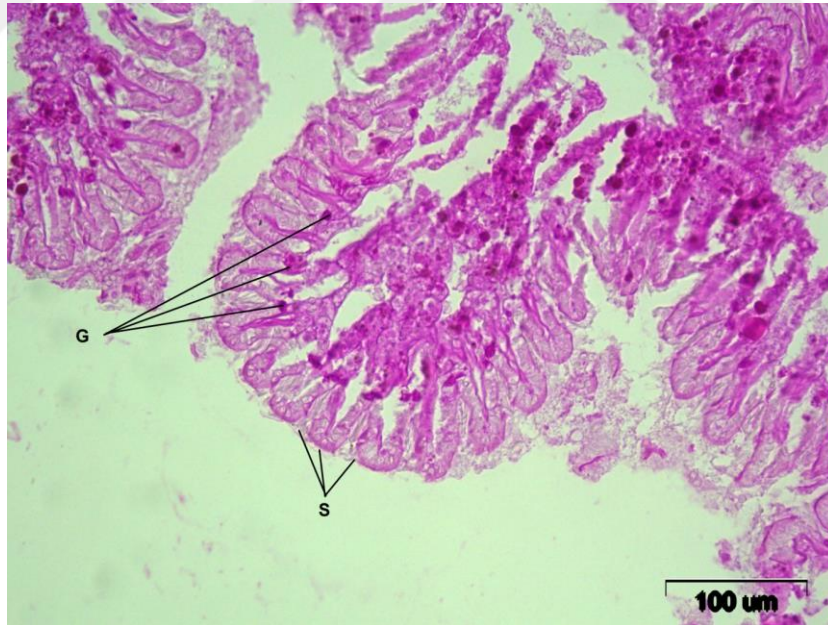
4.7. HİSTOPATOLOJİ

Doku kesitlerinin mikroskopik incelenmesi sonucu stresör baskısı altındaki midyelerin hem solungaç hem de sindirim bezi dokularında histolojik hasar bulguları göze çarpmıştır. Kontrol grubundan alınmış olan solungaç ve sindirim bezine ait histolojik kesitlerde dokunun genel görünümü hakimdi. H&E boyası uygulanan kesitlerde solungaç filamentleri tek tabakalı silindirik epitelden oluştuğu ve her bir filamentin lateral ve frontal siller ile orta kısmında hemolenf sinüsleri içerdiği görülmüştür. Sindirim bezinde ise sil içeren primer ve silsiz epitele sahip sekonder sindirim tübülleri ayırt edilmiştir. Sindirim tübülünün epitelinde nükleusları koyu mor boyanan bazofilik hücreler ve daha açık pembe renkte boyanan vesikül içeren eozinofilik hücreler dikkati çekmiştir (Şekil 4.8; Şekil 4.18). PAS reaksiyonu uygulanan solungaç ve sindirim bezi dokularında düzenli sil yapısı ve solungaç filamentleri

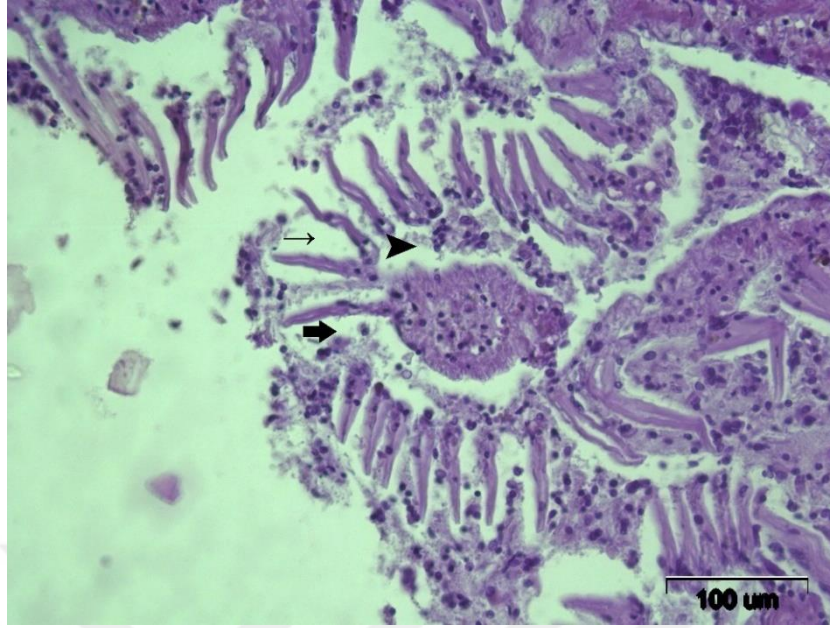
arasında kuvvetli kontak ve goblet hücreleri dikkati çekmiştir (Şekil 4.9; Şekil 4.19.). Hg deney grubunda solungaç yapısının bütünlüğünde bozulmalar, sil kaybı ve solungaç filamentleri arasındaki interlameller köprülerde meydana gelen kopmalar sebebi ile filamentler arasında kontak kaybı gözlenmiştir. Yine aynı deney grubundan midyelerin sindirim bezinde ise tübüler atrofiye ve nekrotik alanlara rastlanmıştır (Şekil 4.10; Şekil 4.20). PAS reaksiyon ile solungaç ve sindirim bezi dokularında goblet hücresi sayısı ve PAS+ reaksiyon şiddetinde ise kontrole göre azalma ve filament yapısında dejenerasyon olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.11; Şekil 4.21). Mikroplastığe maruz kalan midyelerin (MP Deney Grubu) solungaç filamentlerinin epitel dokusunda bozulmalar ve hemosit infiltrasyonu gözlenmiş ancak genel itibariyle hem solungaç hem de sindirim bezinde genel görünüm kontrole yakın olarak dikkat çekmiştir (Şekil 4.12; Şekil 4.22). PAS reaksiyonu ile goblet hücrelerinin sayısı ve reaksiyon şiddeti kontrole yakın gözlenmiştir (Şekil 4.13; Şekil 4.23). Co-Exp deney grubunda da solungaç epitelinde ve sil yapısında bozulmalar ve filamentler arasında kontak kaybı gibi histopatolojik bulgular hakimdi (Şekil 4.14; Şekil 4.15). Aynı deney grubunda sindirim bezinde hemosit infiltrasyonu göze çarparken, genel görüntü kontrol grubuna benzerdi. PAS reaksiyonu ile her iki dokuda da goblet hücrelerinin sayısında ve PAS+ reaksiyon şiddetinde kontrole göre azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24; Şekil 4.25). Mikroplastiklerin vektör rolünün değerlendirildiği Inc deney grubunda da yine solungaç filamentleri arasında kontak kaybı ve hemosit infiltrasyonu gözlenmiş, sindirim bezi dokularında ise tübüler atrofiye, hemosit birikimine ve nekrotik alanlara rastlanmıştır (Şekil 4.16; Şekil 4.26). PAS reaksiyonu ile her iki dokuda da goblet hücrelerinin sayısında kontrole göre azalma olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.27).



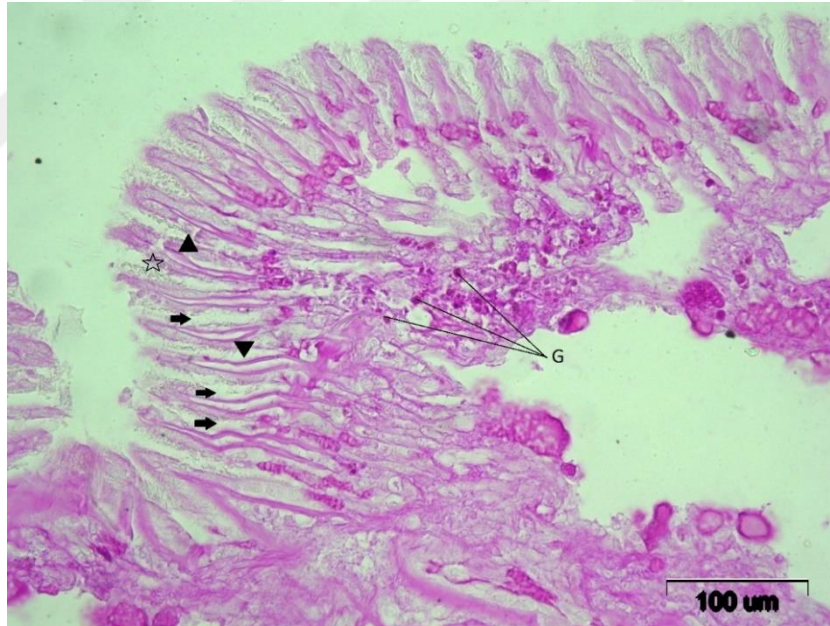
Şekil 4.8: C Deney Grubu: Solungaç dokusunun genel görünümü. F: Solungaç filamentleri; LS: Lateral siller; FS: Frontal siller. Düzenli sil yapısı ve solungaç filamentleri arasında belirgin kontak. H&E, Bar: 100 µm.



Şekil 4.9: C Deney Grubu: Solungaç dokusunun genel görünümü. S: Siller; G: Goblet hücrelerinde gözlenen şiddetli PAS+ reaksiyon. Düzenli sil yapısı ve solungaç filamentleri arasında belirgin kontak. PAS, Bar: 100 µm.



Şekil 4.10: Hg Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. →: Sil yapısında bozulma ve kayıp; ⇨: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ►: Nekroz. H&E, Bar: 100 μm.



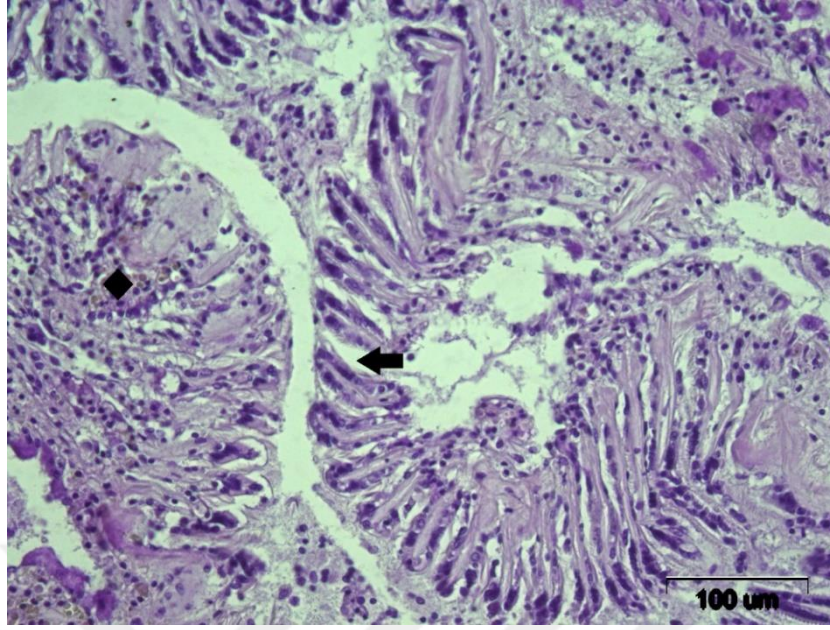
Şekil 4.11: Hg Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ►: Lateral sil kaybı; ⇨: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ☆: Filament yapısında dejenerasyon; G: Goblet hücresi sayısında ve PAS+ reaksiyon şiddetinde azalma. PAS, Bar: 100 μm.



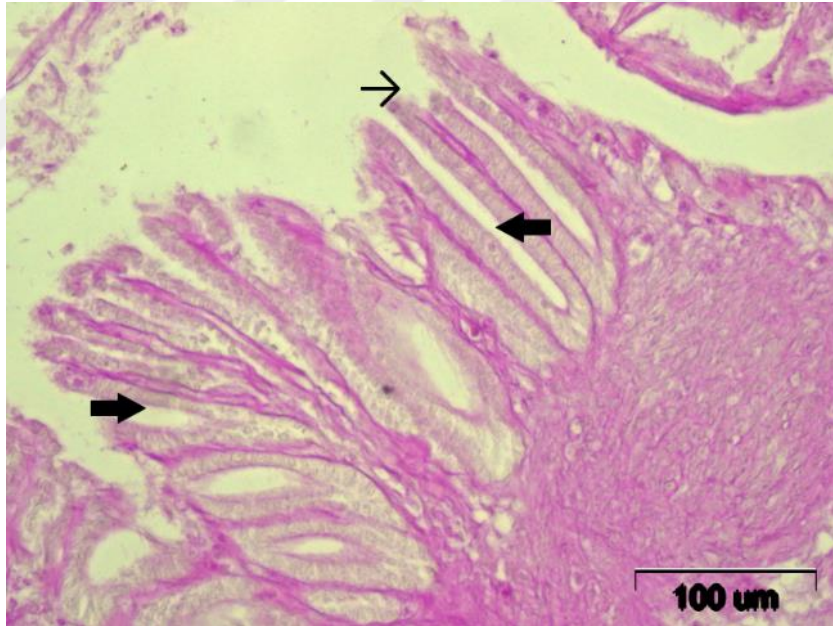
Şekil 4.12: MP Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ☆: Filament yapısında dejenerasyon; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 µm.



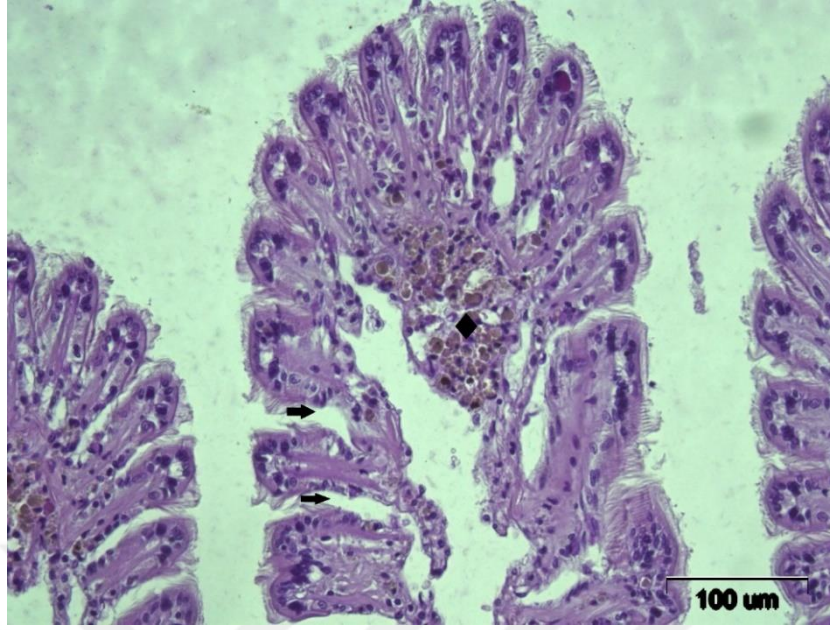
Şekil 4.13: MP Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; G: Goblet hücreleri ve kuvvetli PAS+ reaksiyonu. PAS, Bar: 100 µm.



Şekil 4.14: Co-Exp Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 μm.



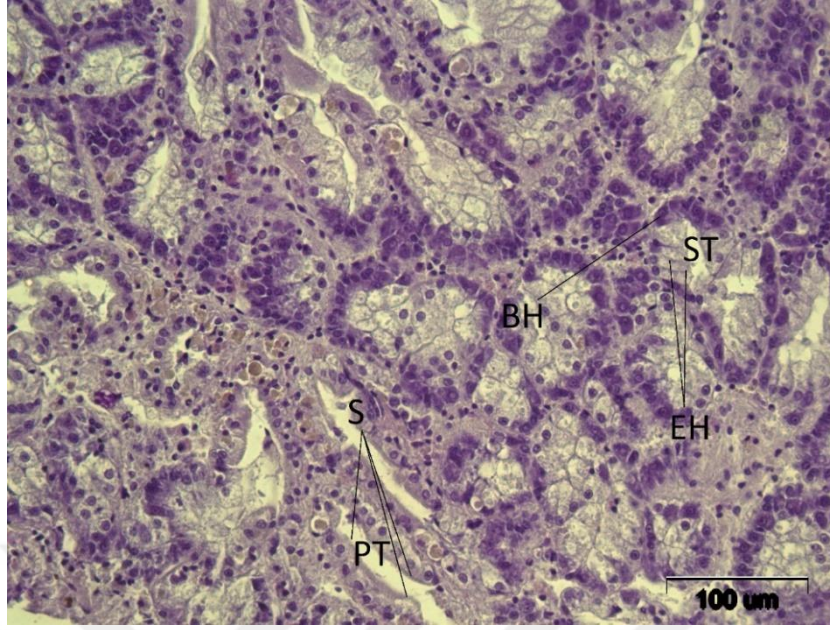
Şekil 4.15: Co-Exp Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; ➡: Sil yapısında bozulma ve kayıp. Goblet hücreleri sayısında ve PAS+ şiddetinde azalma. PAS, Bar: 100 μm.



Şekil 4.16: Inc Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ◆: Hemosit infiltrasyonu; ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı. H&E, Bar: 100 µm.



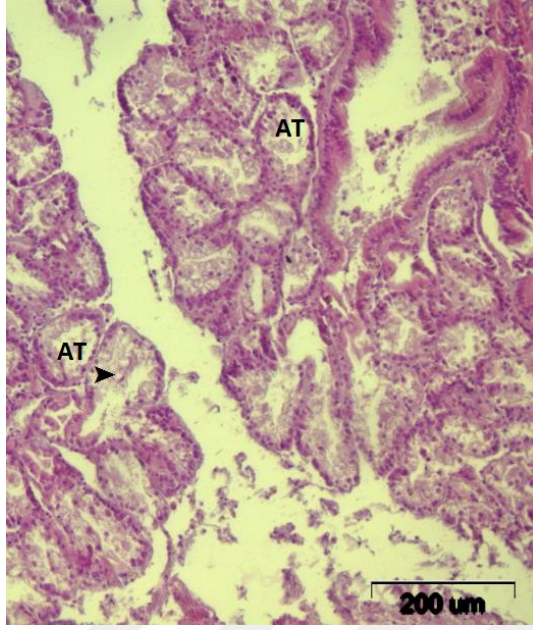
Şekil 4.17: Inc Deney Grubu. Solungaç dokusunun genel görünümü. ➡: Solungaç filamentleri arasında kontak kaybı; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 100 µm.



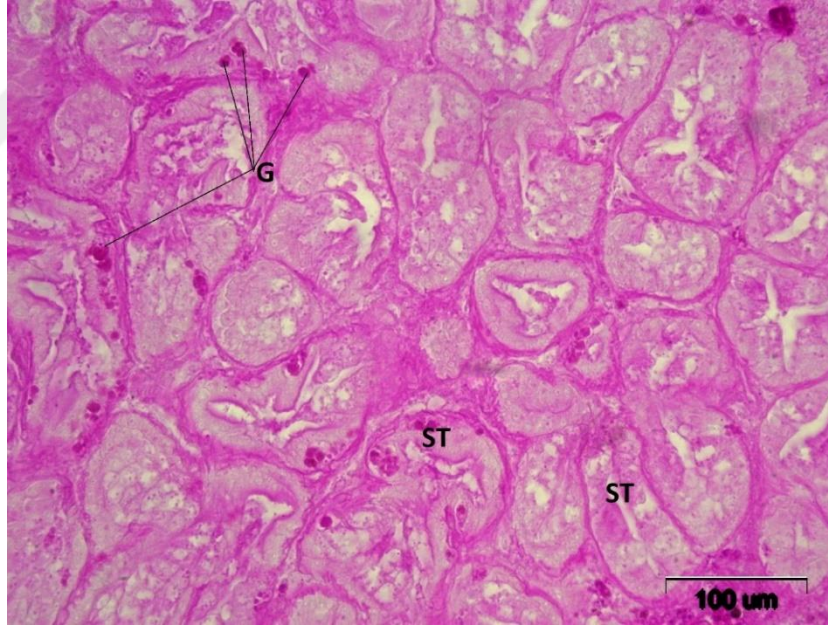
Şekil 4.18: C Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; PT: Primer tübül; S: Sil yapıları; BH: Bazofilik hücreler; EH: Eosinofilik hücreler. H&E, Bar: 100 μm.



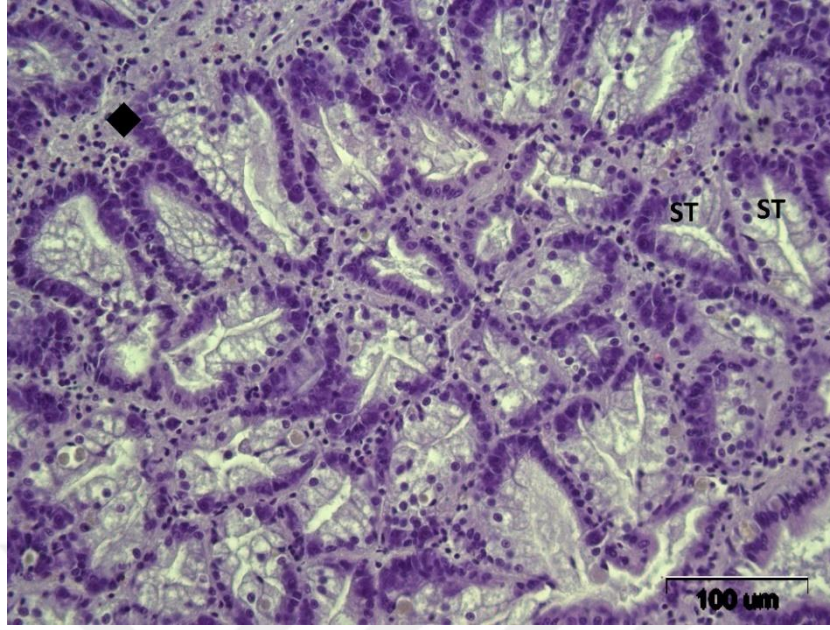
Şekil 4.19: C Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; TL: Tübül lümeni; S: Sil yapıları; E: Epitel tabaka; G: Goblet hücreleri ve kuvvetli PAS+ reaksiyon. PAS, Bar: 100 μm.



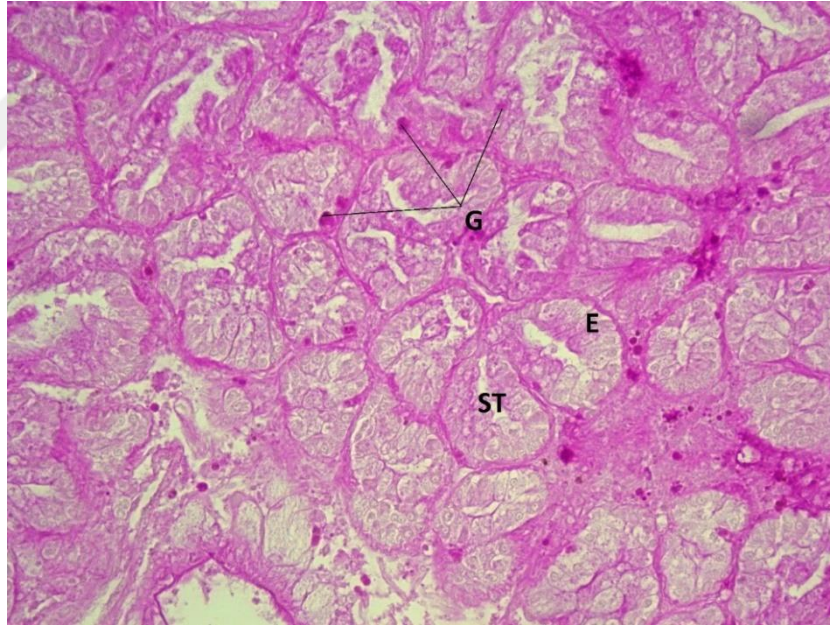
Şekil 4.20: Hg Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ►: Nekroz; AT: Tübüler atrofi. H&E, Bar: 200 µm.



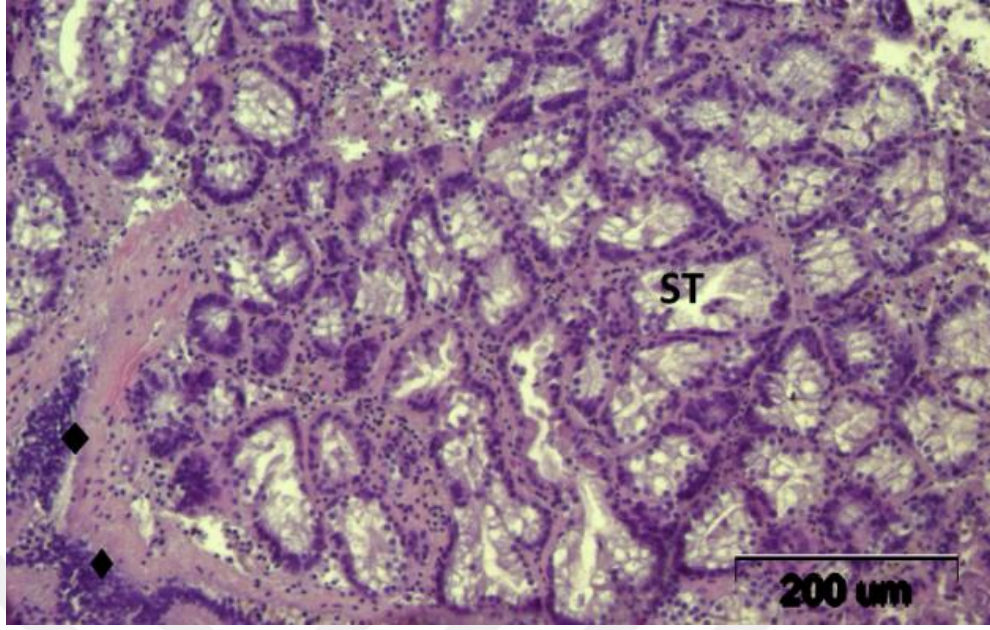
Şekil 4.21: Hg Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 100 µm.



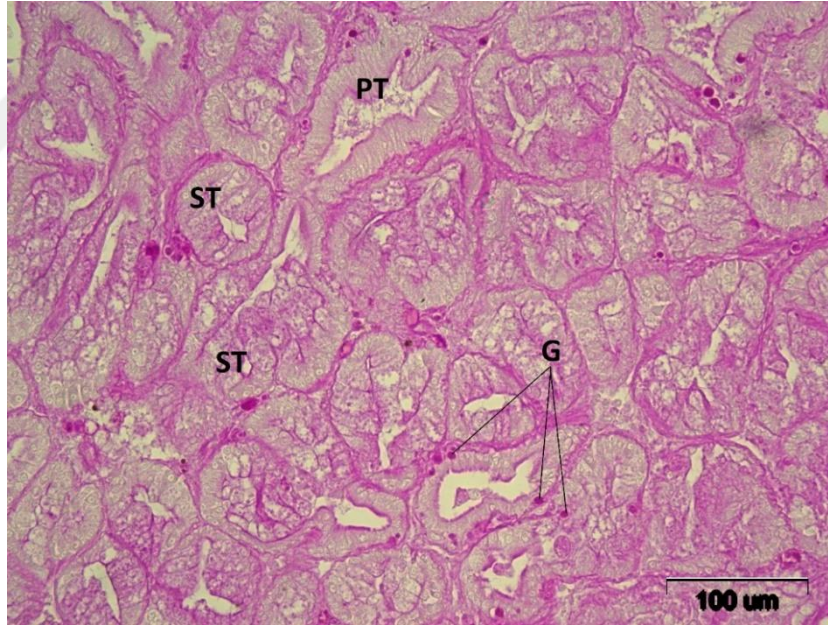
Şekil 4.22: MP Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 100 μm.



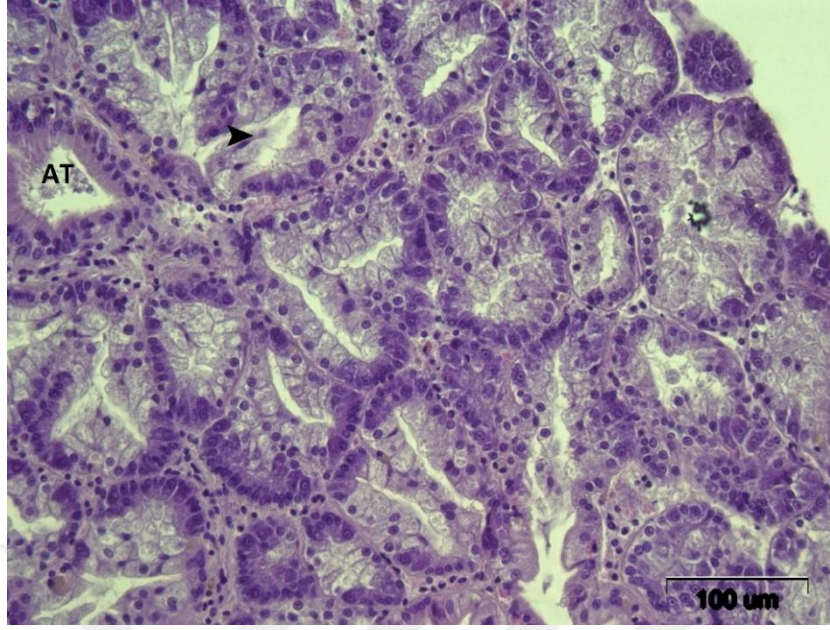
Şekil 4.23: MP Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; E: Epitel tabaka; G: Goblet hücreleri. PAS, Bar: 200 μm.



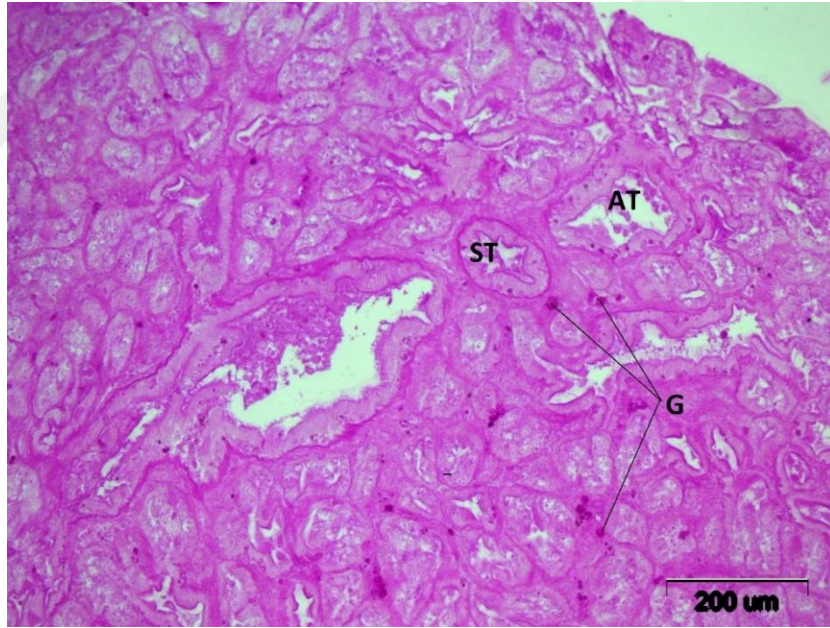
Şekil 4.24: Co-Exp Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; ◆: Hemosit infiltrasyonu. H&E, Bar: 200 μ m.



Şekil 4.25: Co-Exp Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. ST: Sindirim tübülü; PT: Primer tübül; G: Goblet hücreleri sayısında ve PAS+ reaksiyon şiddetinde azalma. PAS, Bar: 200 μ m.



Şekil 4.26: Inc Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. AT: Tübüler atrofi; ►: Nekrotik alan. H&E, Bar: 100 µm.



Şekil 4.27: Inc Deney Grubu. Sindirim bezinin genel görünümü. AT: Tübüler atrofi; ST: Sindirim tübülü; G: Goblet hücreleri sayısında azalma. PAS, Bar: 200 µm.

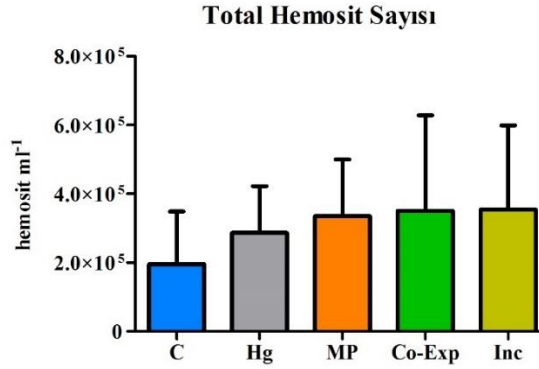
4.8.İMMÜNOMODÜLASYON

4.8.1. Dolaşımdaki Total Hemosit Sayısı

Dolaşımdaki total hemositlerin sayımı posterior adüktör kastan çekilen hemolenf sıvısında Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.28’de ort $\pm$ std. sapma olarak sunulmuş olup, deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.4: Dolaşımdaki total hemosit sayısı, hemosit ml hemolenf⁻¹.

Deney Grubu	Total Hemosit Sayısı
C	195833 $\pm$ 152198
Hg	286000 $\pm$ 60918
MP	335000 $\pm$ 164408
Co-Exp	350000 $\pm$ 278101
Inc	354286 $\pm$ 245024



Şekil 4.28: Dolaşımdaki total hemosit sayısı.

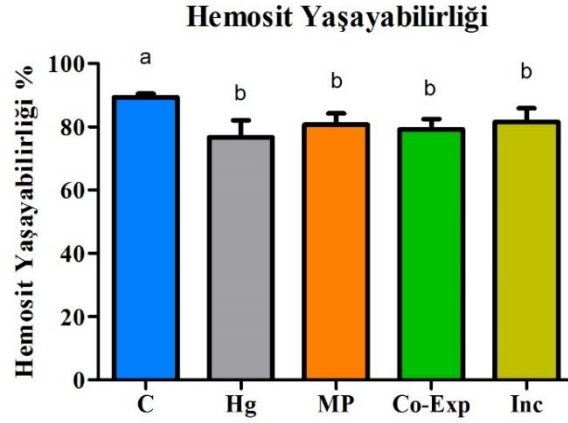
4.8.2. Hemosit Yaşayabilirliği

Deney seti hemosit yaşayabilirliği açısından değerlendirildiğinde mikroplastik ve cıvaya yalnız, birlikte veya inkübe şekilde maruz kalan midyelerin hemosit yaşayabilirliğinde kontrole kıyasla anlamlı şekilde düşüş görüldüğü belirlenmiştir ($p<0,05$). Stresör baskısı

altındaki deney grupları arasında ise istatistiki olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.29’da ort $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur.

Tablo 4.5: Hemosit yaşayabilirliği, %.

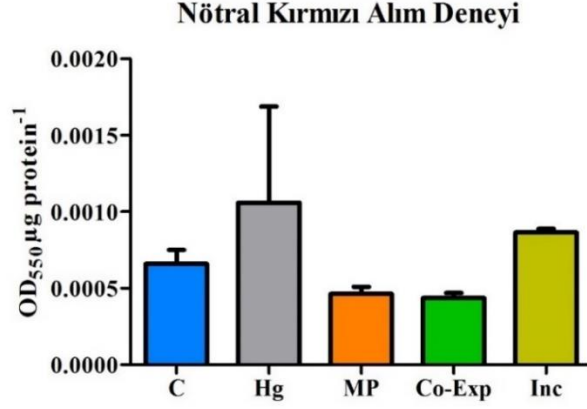
Deney Grubu	Hemosit Yaşayabilirliği (%)
C	89,4 $\pm$ 1,0
Hg	76,7 $\pm$ 5,3
MP	80,7 $\pm$ 3,4
Co-Exp	79,2 $\pm$ 3,3
Inc	81,6 $\pm$ 4,3



Şekil 4.29: Hemosit yaşayabilirliği.

4.8.3. Lizozomal Membran Stabilizasyonu

Midyelerin hemosit hücrelerinde lizozomal membran stabilizasyonunun Nötral Kırmızı Alım deneyi ile incelenmiş olup uygulanan bu assay iki tekrar üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamış, kullanılan konsantrasyonların model organizma üzerinde bir etki göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar Şekil 4.30’da ort $\pm$ std. hata olarak sunulmuştur.



Şekil 4.30: Lizozomal membran stabilizasyonu.

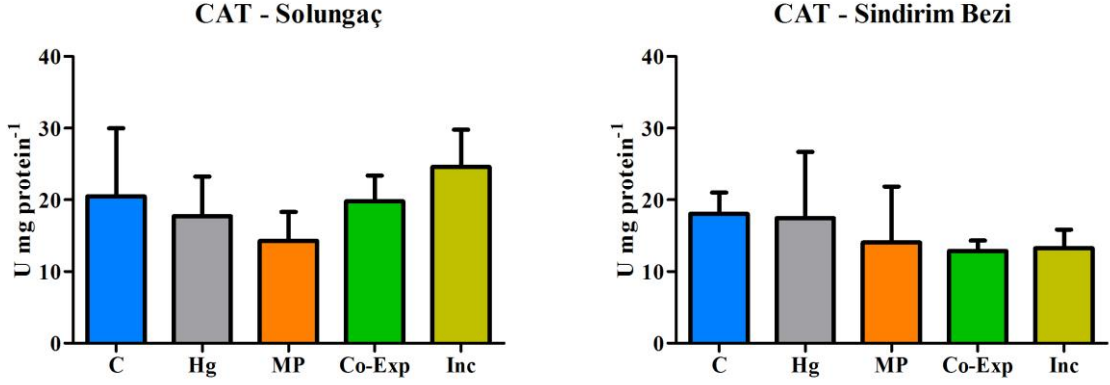
4.9.ANTİOKSİDAN BATARYA

4.9.1. CAT

CAT aktivitesi solungaç ve sindirim bezi için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6 ve Şekil 4.31’de ort $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur. Deney grupları arasına CAT aktivitesi açısından her iki dokuda da anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.6: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan CAT aktiviteleri, U mg protein⁻¹.

Deney Grubu	Solungaç	Sindirim Bezi
C	20,48 $\pm$ 9,50	18,05 $\pm$ 2,96
Hg	17,72 $\pm$ 5,54	17,46 $\pm$ 9,21
MP	14,29 $\pm$ 4,04	14,06 $\pm$ 7,79
Co-Exp	19,80 $\pm$ 3,58	12,88 $\pm$ 1,43
Inc	24,60 $\pm$ 5,19	13,24 $\pm$ 5,84



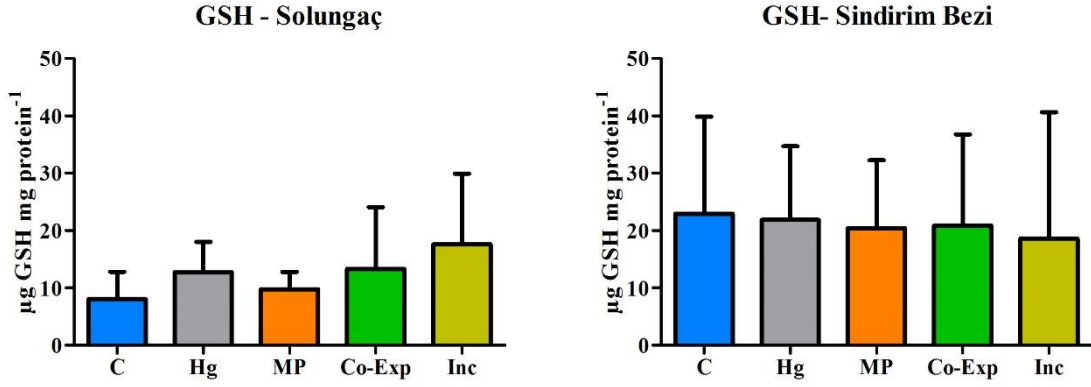
Şekil 4.31: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan CAT aktiviteleri.

4.9.2. GSH

Midyelerdeki GSH konsantrasyonları solungaç ve sindirim bezi için ayrı ayrı değerlendirilmiş olup her biri üç tekrar üzerinden ele alınmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.32’de ort $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde hem solungaç dokusunda hem de sindirim bezinde GSH konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark saptanmazken ($p>0,05$), yine de GSH düzeylerinin doku spesifik cevaplar geliştirdiği görülmektedir. Söz konusu stresörlere bir hafta süren maruziyeti takiben solungaç dokusunda GSH düzeyleri Inc>Co-Exp>Hg>MP>C şeklinde seyrederken, sindirim bezi için ise bu sıralamanın C>Hg>Co-Exp>MP>Inc şeklinde olduğu görülmüştür.

Tablo 4.7: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan GSH düzeyleri, $\mu\text{g GSH mg protein}^{-1}$.

Deney Grubu	Solungaç	Sindirim Bezi
C	8,0 $\pm$ 4,8	22,9 $\pm$ 16,9
Hg	12,7 $\pm$ 5,3	21,8 $\pm$ 12,8
MP	9,8 $\pm$ 3,0	20,4 $\pm$ 11,9
Co-Exp	13,3 $\pm$ 10,7	20,8 $\pm$ 15,9
Inc	17,6 $\pm$ 12,3	18,6 $\pm$ 22,1



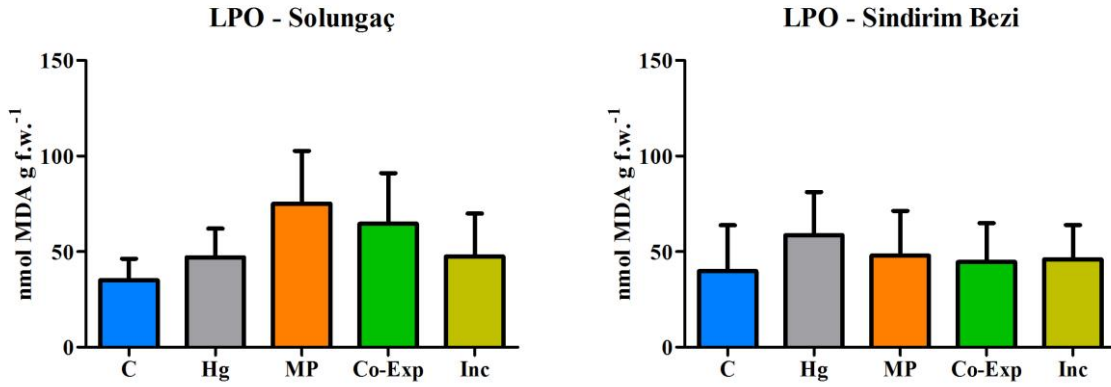
Şekil 4.32: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan GSH düzeyleri.

4.9.3. LPO

Farklı deney gruplarında oluşabilecek lipid peroksidasyonu MDA ölçümüne dayanarak incelenmiş olup hem solungaç hem de sindirim bezinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.8 ve Şekil 4.33’de ort $\pm$ std. sapma şeklinde sunulmuştur. Sonuçlara göre her iki dokuda da en düşük MDA düzeyleri kontrol grubunda görülse de deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.8: Solungaç ve sindirim bezinde saptanan MDA düzeyleri, nmol MDA g f.w.⁻¹.

Deney Grubu	Solungaç	Sindirim Bezi
C	35,0 $\pm$ 11,3	39,8 $\pm$ 23,1
Hg	47,1 $\pm$ 15,0	58,6 $\pm$ 22,6
MP	75,0 $\pm$ 27,7	47,9 $\pm$ 23,3
Co-Exp	64,6 $\pm$ 26,4	44,6 $\pm$ 20,3
Inc	47,4 $\pm$ 22,6	45,9 $\pm$ 18,0



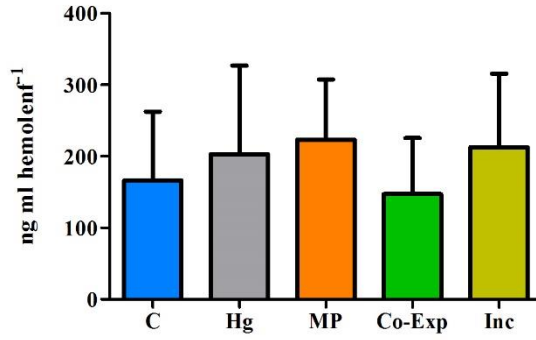
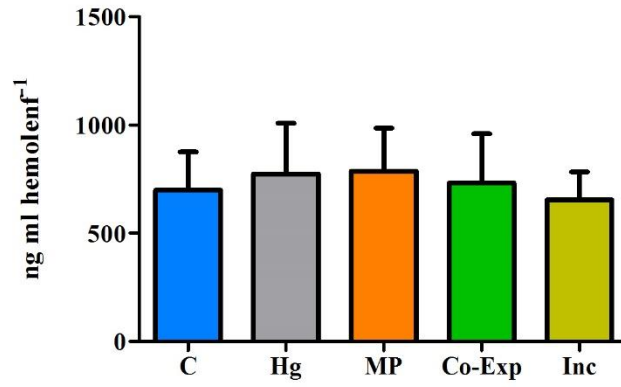
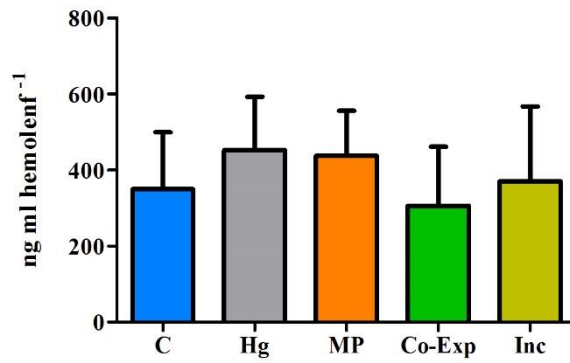
Şekil 4.33: Solungaç ve sindirim bezinde lipid peroksidasyonu.

4.10. DOLAŞIMDAKİ HÜCRE SERBEST NÜKLEİK ASİTLERİN KANTİTASYONU

Midyelerin posterior adüktör kaslarından çekilen hemolenf sıvılarında hücre serbest nükleik asitlerin kantitasyonu gerçekleştirilmiş ve deney grupları arasında dolaşımdaki hücre serbest DNA, RNA ve miRNA konsantrasyonları açısından herhangi bir anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Sonuçlar Tablo 4.9, Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da ort $\pm$ std. sapma olarak sunulmuştur.

Tablo 4.9: Hemolenf sıvısında saptanan hücre serbest nükeik asit (DNA, RNA, miRNA) konsantrasyonları, ng ml hemolenf⁻¹.

Deney Grubu	Dolaşımdaki Hücre Serbest DNA Konsantrasyonu		Dolaşımdaki Hücre Serbest RNA Konsantrasyonu		Dolaşımdaki Hücre Serbest miRNA Konsantrasyonu	
	n	ng ml hemolenf ⁻¹	n	ng ml hemolenf ⁻¹	n	ng ml hemolenf ⁻¹
C	13	166,3 $\pm$ 96,3	13	699,3 $\pm$ 176,8	12	349,3 $\pm$ 150,3
Hg	14	202,7 $\pm$ 124,2	15	774,7 $\pm$ 233,8	11	452,4 $\pm$ 140,9
MP	14	223,2 $\pm$ 84,4	13	786,5 $\pm$ 198,5	14	437,9 $\pm$ 118,2
Co-Exp	16	147,3 $\pm$ 78,1	17	731,6 $\pm$ 227,3	17	306,6 $\pm$ 155,2
Inc	14	212,5 $\pm$ 102,9	15	654,5 $\pm$ 128,4	13	371,0 $\pm$ 196,6

Dolaşımdaki Hücre Serbest DNA Konsantrasyonu**Şekil 4.34:** Dolaşımdaki hücre serbest DNA konsantrasyonu.**Dolaşımdaki Hücre Serbest RNA Konsantrasyonu****Şekil 4.35:** Dolaşımdaki hücre serbest RNA konsantrasyonu.**Dolaşımdaki Hücre Serbest miRNA Konsantrasyonu****Şekil 4.36:** Dolaşımdaki hücre serbest miRNA konsantrasyonu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroplastik kirliliği son yılların önemli çalışma konularından birisidir. Plastik kirliliğine dönük ilkin çalışmalar 1970’li yıllara kadar uzansa da (Carpenter ve Smith, 1972) 2000’li yıllarda mikroplastiklerin tanımlanmasıyla (Thompson ve diğ., 2004) sorun daha geniş bir boyutta ele alınmaya başlanmış ve çalışmaların sayısı da lineer olarak artmaya devam etmiştir (do Sul ve Costa, 2014). Yine de bu stresörlerin gerek biyota ile doğrudan etkileşimleri gerekse de potansiyel vektör etkilerine dönük daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu tez kapsamında mikroplastiklerin su ortamında manila kum midyesi üzerine etkileri ve cıva alımı açısından oynadığı rol araştırılmıştır.

5.1. STRESÖRLERİN ALIMI

Denizel çevrede rapor edilen mikroplastik konsantrasyonlarına bakıldığında Atlantik Okyanusu’nda $\sim 0,5$ partikül/ml (Enders ve diğ., 2015); Güney Afrika sahillerinde ~ 1 partikül/ml (Nel ve Froneman; 2015) konsantrasyonları yüksek değerler olarak göze çarparken, Baltık Denizi’nde 10 partikül/ml’e (Gorokhova, 2015) kadar çıkabilen konsantrasyonlar saptanmıştır. Bu deneyde ise manila kum midyeleri ortalama olarak 144 partikül/ml konsantrasyonunda mikroplastığa maruz bırakılmıştır. Bununla beraber bu çalışmada kullanılan konsantrasyonun nüfus baskısı altındaki kıyı bölgeleri için ekstrem hava olayları sonrasında saptanabilir bir değer potansiyeli olmakla birlikte, gelecek projeksiyonlar dikkate alındığında ve çevresel kompartımanlarda tespitlere dönük metodolojik gelişmelerle beraber düşünüldüğünde çok yüksek bir değer olmadığı görülmektedir. Örneğin gerçekleştirilen bir tahmine göre 2100 yılına gelindiğinde denizel ortamda yüzen mikroplastik miktarı en iyi tahminle $2,5 \times 10^7$ ton, en kötü senaryoda ise $1,3 \times 10^8$ ton olacağı yönündedir ve bu tahmin 2010-2100 yılları arasında total mikroplastik miktarında 50 katlık bir artışı ifade etmektedir. Ağırlığa dayalı bu veri dönüştürüldüğünde ise 2010 yılında $0,2-0,9$ partikül/m³ arasında değişen ortalama konsantrasyon 2100 yılında en iyi tahminle ortalama $9,6$ partikül/m³, en kötü senaryoda ise $48,8$ partikül/m³ düzeyine yükseleceği yönündedir (Everaert ve diğ., 2018). Buna ek olarak bu çalışmada uygulanan konsantrasyonlara ağırlıkça benzer değerler başka laboratuvar çalışmalarında da uygulanmış ve toksisite göstergelerinde gözlenebilir değişimler saptanmıştır (Sussarellu ve diğ., 2016; Paul-Pont, 2016).

Partikül tipi açısından değerlendirilecek olursa bu deneyde stresör olarak floresan mikrobuncuklar kullanılmıştır. Esasında mikrobuncuk tipli partiküllere, doğada fibril ya da fragment tiplerine kıyasla daha az rastlanılmaktadır ve bu partiküller item sayısı açısından okyanuslardaki toplam plastiğin çok düşük bir kısmına tekabül etmektedir (Boucher ve Friot, 2017). Primer mikroplastiklerin küresel üretimdeki payı ağırlık açısından total plastik miktarının sadece %0.1'ne karşılık gelmektedir (Barnes, 2019). Bununla birlikte mikrobuncukları ekotoksikoloji bağlamında önemli kılan detay ise bu materyallerin çevresel kompartımanlardaki miktarının tamamen plastik üretimi ve tüketim alışkanlıklarına dönük davranışlarımızla ve plastik kirliliğine dair aldığımız önlemlerle çok açık bir şekilde korelasyon göstermesidir (Dauvergne, 2018). Bu nedenle bu materyallerin biyotaya vereceği zararların aydınlatılması mikrobuncukların çevresel kompartımanlara girişine dönük çok daha sıkı önlemlerin alınmasına dair bir zemin oluşturacağı aşıkardır.

Filtre ederek beslenen kabuklularda çevresel kontaminantların bünyeye alımında 3 temel mekanizma söz konusudur. Bunlar; çoğunlukla solungaç, kısmen manto ve bağırsak duvarı olmak üzere dış yüzeyler ile, transmembran iyon taşıma kanalları ile aktif bir şekilde ve endositoz ile alım şeklindedir. Bu alım mekanizmaları maruziyet yolağı, kirleticinin formu gibi biyoerişebilirliğe dönük fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilenmektedir (Beyer ve diğ., 2017). Mikroplastikler ile organizmaların etkileşimi ise su ortamında üç şekilde olmaktadır: Eksternal (mikroplastikler dış iskelete ya da epidermise yapışır); internal (solunum ya da sindirim sistemi vasıtasıyla partiküller bünyeye alınır ve dokulara transloke olabilir) ya da her iki şekilde olabilir (Gambardella ve diğ., 2018). Eksternal etkileşimler ekstremitte kayıpları ve organizma düzeyinde etkilere daha çok neden olurken, internal etkileşimler oksidatif stres ve doku patolojilerine sebebiyet vermektedir (Ziajahromi ve diğ., 2017; Bråte ve diğ., 2018b). Farklı dokulara transloke olan mikroplastiklerin fagositozu ise yapışma ve hücre içine almak üzere iki aşamadan meydana gelmektedir. Organizmaların mikroplastikleri alımında partikül şekli ve büyüklüğü önemli bir etmendir ve bunlara bağlı olarak toksisiteleri değişebilmektedir. Canlılarda genellikle <150 µm partiküller bağırsak boşluğu aracılığıyla absorbe edilirken, 20 µm'den küçük partiküller dokular tarafından penetre edilebilmekte, 0,1-1 µm boyutlarındakiler ise hücre membranını, kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilmektedir (Lusher ve diğ., 2017a). Yine partiküllerin bünyede kalma süreleri ile yol açacağı toksiste arasında korelasyon olduğu Jeong ve diğ. (2016) tarafından gösterilmiş olup 6 µm boyutundaki partiküllerin 0,05 ve 0,5 µm büyüklüğündeki partiküllere kıyasla

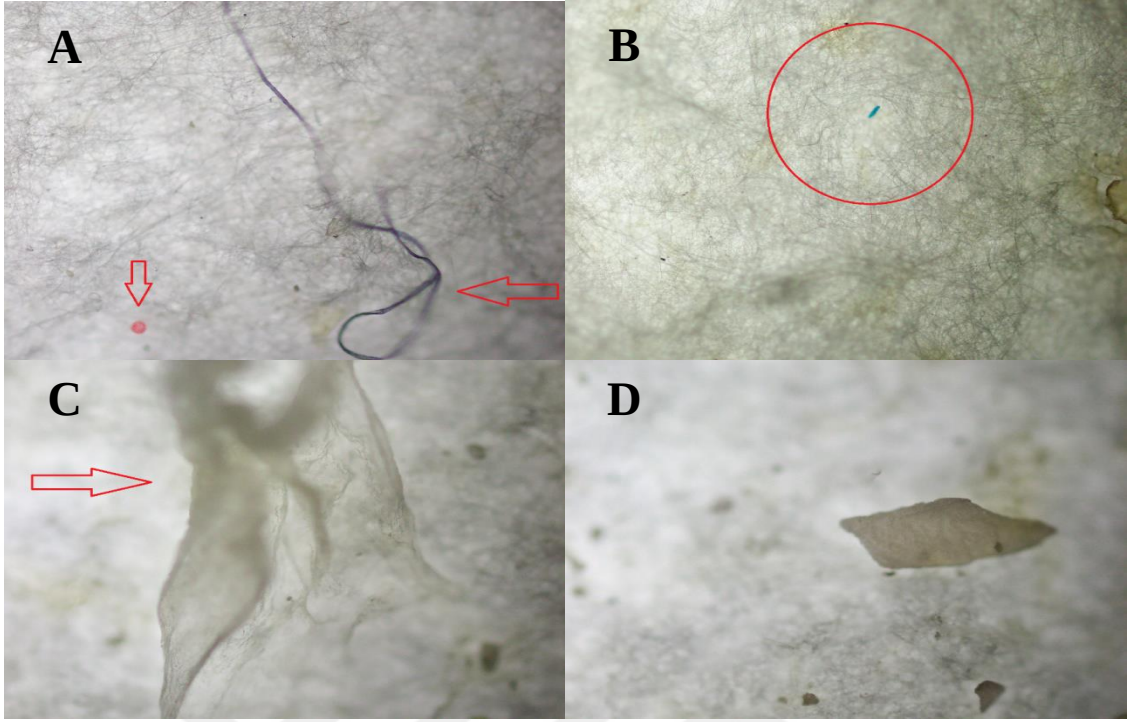
gastrointestinal sistemde daha kısa süre kaldığı ve daha küçük partiküllerin daha yüksek toksisiteye yol açtığı bildirilmiştir. Bununla birlikte *O. edulis* üzerinde nanoplastiklerin biyolojik membranları tahrip ederek spermatozoalarda subletal toksisiteye neden olduğu gösterilirken (Tallec ve diğ., 2018), mikron boyutlu partiküllere maruziyet sonrası böyle bir etki henüz gözlenmemiştir.

Mikroplastiklerin boyutlarındaki değişimle beraber yüzey hacim oranı da değişeceğinden kirleticiler açısından vektör potansiyeli de artabilmektedir. Örneğin *D. magna* ile yapılan bir çalışmada 50 nm ve 10 µm büyüklüğündeki partiküllerin fenantren ile kontamine edilmesinin ardından maruziyet durumu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre canlılarda fenantren biyobirikiminin yanı sıra nano boyutlu partiküllerin daha fazla kirletici adsorbe ettiği gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2016). Benzer durum bir endokrin yıkıcı olan α -ethynylestrdiol (EE2)'un 50 nm ve 45 µm boyutlarındaki partiküller ile birlikte etkileri ele alındığında da görülmüş ve nanoplastiklerin mikron boyutlu partiküllere kıyasla daha fazla EE2 adsorbe ettiği ve daha yüksek toksisiteye neden olduğu ifade edilmiştir (Chen ve diğ., 2017).

Bu tez kapsamında ise midyeler 10-45 µm boyutunda plastik partiküllere maruz bırakılmış ve PE mikroboncukların midyelerin farklı dokularında birikim gösterdiği görülmüştür. Tüm dokulardaki birikim ele alındığında en fazla mikroplastik alımının sırasıyla MP, Co-Exp ve Inc deney gruplarında gerçekleştiği görülmektedir. Bununla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermese de cıva varlığının mikroplastiklerin alımını negatif etkilediği ve cıva mevcudiyetiyle mikroplastik alımının düşüş gösterdiği göze çarpmaktadır.

Mikroplastik alımı bakımından tekrarlar arasında filtre edilen partikül sayımı sonuçlarının gerek tüm midyede gerekse organlar özelinde değişkenlik gösterdiği göze çarpmaktadır. Buna neden olan etmenlerden biri örneklem sayısının azlığıdır. Tüm tekrarlarla birlikte 27'si mikroplastik içeren deney gruplarından olmak üzere totalde 45 midye (15 havuz, 15 filtre), her deney grubundan ise toplamda 9 midye (3 havuz, 3 filtre) üzerinde mikroplastik varlığı incelenmiştir. Ancak mikroplastik alım düzeylerinin kantitasyonu havuz yapılarak değil fraksiyonların tek tek sindirilmesi ile yapılsaydı daha sağlıklı sayım sonuçları verebileceği görülmektedir. Diğer bir etmen uygulanan sindirim metodu olabilir. Bazı örneklerde filtrede az da olsa renk değişimine yol açacak ve görsel sayımı zorlaştırabilecek doku kalıntılarının varlığı görülmüştür. Literatüre bakıldığında birtakım sindirim metotları mevcuttur. Bunlar kuvvetli asit ya da baz varlığında doku sindirimi ya da çeşitli enzimler kullanılarak yapılan

sindirme işlemleridir (De Witte ve diğ., 2014; Wan Cauwenberghe ve Janssen, 2014; Rochman ve diğ., 2015; Catarino ve diğ., 2017; Rist ve diğ., 2019). Lusher ve diğ. (2017b) yayınladıkları derlemede en etkili ve yaygın olarak kullanılan sindirme işlemlerinin %10 KOH ile 60 °C’de bir gece ya da enzimatik sindirime dayanan prosedürlerle gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bununla beraber bu çalışmada sindirme işlemi sırasında 60 °C yerine 40 °C sıcaklık uygulanmıştır. Dahası sindirilen dokularda maruz bırakılan mikroboncukların haricinde de midyelerde mikroplastik varlığı saptanmıştır. Bu partiküller için herhangi bir karakterizasyon yapılmamış, sadece sıcak iğne testi uygulanmıştır. Her ne kadar bir çevresel izleme çalışması olmaması ve midyelerin maruz bırakıldığı mikroplastik niteliğinin oldukça ayırt edilebilir olmasından dolayı atmosferik ve prosedürel blank uygulanmamış olsa da filtrelerde görülen fragment partiküllerin sayısındaki fazlalık da bu önermeyi doğrulayabilir (Şekil 5.1). Çünkü yapılan izleme çalışmalarında blank kullanımı kritik önemde olmakla birlikte blank örneklerinde genelde mikrofibrillere rastlandığı ve diğer mikroplastik tiplerinin oldukça az olduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (Nuelle ve diğ., 2014; Wesch ve diğ., 2017; Catarino ve diğ., 2018). Bu çalışmada ise midyelerinin sindiriminin ardından mikrofibrillerin yanı sıra çokça fragment yapıdaki mikroplastiklere de rastlanılmıştır. Dolayısıyla midyelerin 19 gün (12 gün alıştırma + 7 gün maruziyet) süresince yapay deniz suyunda yaşatılmasının, laboratuvara getirilmeden önce bünyesine aldığı mikroplastiklerin uzaklaştırılmasına yetmediği söylenebilir. Bu durum da midyelerin mikroplastikleri alımına etki eden bir sebep olabilir. Ayrıca uygulanan deney düzeni teknik yetersizliklerden dolayı aynı anda yapılamamıştır. Bunun yerine tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla hayvanların alıştırma periyoduna konulma aralıklarındaki zamansal değişime bağlı olarak biyolojilerinden kaynaklı bir değişken de söz konusudur. Zamansal değişimlerin sucul ortamdaki mikroplastik kontaminasyonu oranlarını değiştirdiği daha önce farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (Yonkos ve diğ., 2014; Cheung ve diğ., 2016). Örneğin Ferreira ve diğ. (2019) yürüttükleri araştırmada mevsimsel değişimler ile artan habitat kontaminasyonuna bağlı olarak canlılardaki mikroplastik mevcudiyetinin artış gösterebildiğini belirtmişlerdir. Dolayısıyla tüm bu önermelerin birlikte değerlendirilmesinin midyelerin mikroplastik alımlarına müdahale ederek deneyin sonuçlarına etki edebilecek birer not olarak belirtmek önem teşkil etmektedir. Dolayısıyla ileriki çalışmaların daha uzun süren alıştırma periyodu ve sayımların daha fazla örneklem ile gerçekleştirilmesi önerilebilir.



Şekil 5.1: Midyelerde maruz bırakılan mikrobuncuklar haricinde saptanan diğer mikroplastikler. A: Mavi mikrofibril ve mikrobuncuk; B: Mavi fragment; C: Renksiz film; D: Renksiz fragment.

Solungaç dokusunda mikroplastik varlığı mikroplastığe maruz kalan tüm deney gruplarında kalan dokulara kıyasla çok daha düşük görülmektedir. Bu durum mikroplastiklerin solungaç dokusundan mümkün olduğunca az alıkonulduğunu göstermektedir. Ayrıca sindirim bezinde de cıva varlığında, yokluğuna kıyasla mikroplastik sayısının azaldığı görülmektedir. Sindirim bezinde bulunan mikroplastikler hayvanlar tarafından sindirilemeyen materyallerdir ve dolayısıyla bu partiküllerin vücuttaki varlığı ve uzaklaştırılmaları enerji kaybı anlamına gelmektedir (Sussarellu ve diğ., 2016). Bununla beraber mikrobuncukların bu dokulardan tamamen uzaklaştırılamama nedeni meydana gelen histolojik lezyonlarla da ilintili olabilir.

Kıyasal ekosistemlerde gerek su ortamına bir şekilde giriş yapan metal vb. kirleticilerin gerekse mikroplastiklerin nihai olarak sonlanacağı ve birikim göstereceği ortam sedimenttir. Bu çalışmada ise sediment-bağlı cıvanın alımından ziyade sudan cıva alımı (waterborne) ve bir matris olarak PE mikrobuncuklardan doğru cıva alımı değerlendirilmiştir. Bununla beraber model organizma olarak seçilen infaunal bivalv türü *R. philippinarum* sedimentin içine girerek yaşamaktadır ve bu katmandaki suyu filtre ederek daha çok partikül formlardaki metalleri absorbe etmektedir. Kullanılan konsantrasyon sudaki cıva değerleri açısından bakıldığında yüksek olmasa bile (Serfor-Armah ve diğ., 2005; Higuera ve diğ., 2006),

sedimentdeki cıva konsantrasyonları göz önünde tutulduğunda da bu canlıların maruziyeti açısından çevresel bir değer olduğu yine görülmektedir (Leipe ve diğ., 2013; Covelli ve diğ., 2012).

Biyokonsantrasyon faktörü terimi spesifik bir terimdir ve bir kirleticinin sudan alımını ifade etmektedir. Bu çalışma kapsamında her ne kadar biyokonsantrasyon faktörü değerlendirilebilir olsa da mikroplastiklerin vektör rolünü incelemek üzere kurulan akvaryumda (Inc deney grubu) cıvanın alımı sudan değil mikroplastiklerden doğru gerçekleşmektedir. Bu nedenle biyokonsantrasyon faktörü açısından farklılıklar cıva içeren deney grupları arasında değerlendirilmemiş, sadece cıva biyobirikimleri ele alınmıştır.

Bir metalin biyolojik kullanılabilirliği (bioavailability) üç temel prosesi kapsamaktadır. Bunlar biyoerişebilirlik (bioaccessibility), absorpsiyon ve metabolizmadır. Bir bileşiğin biyoerişebilirliği yukarıda değinilen mekanizmalarla bünyeye alınarak çözünebilir hale gelebilecek fraksiyonu kapsar. Absorpsiyon terimi dolaşım sıvısına karışan ve artık biyolojik olarak kullanılabilir bileşiğin hareketini tanımlarken, metabolizma ise tüm bu süreçler sonucu asimile edilen fraksiyonu, yani bir bileşiğin biyolojik kullanılabilirlik derecesini ifade eder (Bradley ve diğ., 2017). Biyolojik olarak kullanılmayan kirleticiler ise zaten organizma tarafından özümsemeden psödoфеçes vb. süreçlerle uzaklaştırılmaktadır. Organizmalarda metallerin alımı ile hücre içi taşıma ve uzaklaştırılma süreçlerini yöneten özelleşmiş mekanizmalar mevcut olsa da esansiyel olmayan metallerin toksisitesi moleküler mimikri, rekabet ve oksidatif stresi indüklemeye kapasitelerine göre değişim göstermektedir (Varotto ve diğ., 2013). Örneğin bir laboratuvar çalışmasında cıva ve metil cıvanın radyoizleyici formları ($^{203}\text{Hg}(\text{II})$ ve Me^{203}Hg) kullanılarak, 5 farklı bivalv türü (*Chlamys nobilis*; *Perna viridis*; *Ruditapes philippinarum*; *Septifer virgatus* ve *Saccostrea cucullata*) üzerinde her iki cıva formunun biyobirikimi ve alım-atılım kinetikleri incelenmiştir. Çalışma neticesinde farklı türlerin farklı detoksifikasyon stratejileri geliştirdiği ve bunun sonucunda MeHg ve Total-Hg (THg) ihtivalarına bağlı olarak değişen birikim paternleri sergilediği vurgulanırken, türler arasında MeHg/THg değişimlerinin Hg ve MeHg'nin atılım oranları arasındaki farklılığa göre şekillendiği belirtilmiştir (Pan ve Wang, 2011). Yine bir başka çalışmada Metian ve diğ. (2008); su, besin ve sediment olmak üzere farklı yollarla radyoizletli cıvaya maruziyet sonrasında *Pecten maximus* türü deniz kabuklusunun alım atılım kinetiklerini ve cıvanın subseleüler dağılımını incelemişlerdir. Çalışmada cıvanın daha çok sindirim bezi ve

solungaçların sitosolik fraksiyonunda biriktiği görülürken, cıva biyobirikiminin alım yolağına bağlı olarak değiştiği, sudan alım neticesinde cıvanın en çok solungaç dokusunda birikim gösterdiği ifade edilmiştir. Besin ile alım neticesinde ise sudan alımın aksine en çok cıva lokalizasyonunun sindirim bezinde saptandığı belirtilmiştir (Metian ve diğ., 2008).

Bu çalışmada ise cıva ölçümleri üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. En yüksek birikimin mikroplastiklerin yokluğunda sudan cıva alımı neticesinde (Hg deney grubu) gerçekleştiği görülmektedir. Aynı deney grubunda en yüksek birikim ise manila kum midyesinde de Metian ve diğ. (2008)'nin sonuçlarına benzer şekilde solungaç dokusunda görülmüştür. Yine aynı deney grubunda sindirim bezinde görülen yüksek cıva birikiminin asimile edilen cıvanın detoksifikasyona edilmek üzere biriktirildiğine dair bir gösterge teşkil ettiği söylenebilir.

Su ortamında mikroplastik mevcudiyetinin başta metaller olmak üzere diğer kirleticilerin alım kinetiklerine etki edebildiği daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin Wen ve diğ. (2018), ciklet balığı *Symphysodon aequifasciatus* türünde PS partiküller (32-40 µm) ve Cd'nin yalnız ve birlikte etkilerini 30 gün süren maruziyetin ardından incelemiş, kombin deney grubunda mikroplastik alımının daha fazla ve Cd alımının ise daha az olduğunu belirterek her iki stresörün birlikte maruziyet sonucunda antagonistik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bunun aksi sonuçları ise aynı polimer tipinde ancak daha küçük boyutlu (5 µm) mikroplastiklere ve Cd'ye 3 hafta süren maruziyet sonucunda Lu ve diğ. (2018) *Danio reiro* üzerinde gözlemlemiştir. Artan mikroplastik konsantrasyonuna bağlı olarak Cd biyobirikiminin de önemli şekilde arttığı, organlar arasında birikimin solungaç>bağırsak>karaciğer şeklinde gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ayrıca incelenen diğer biyobelirteçler ile değerlendirildiğinde mikroplastik mevcudiyetinin Cd toksisitesini arttırdığını rapor etmişlerdir (Lu ve diğ., 2018). Başka bir araştırmada ise bir kaya balığı türü olan *Pomatoschistus microps* üzerinde PE mikrobuncuklar ile Cr (IV)'un yalnız ve birlikte etkileri incelenmiş, birlikte maruziyet sonucu yırtıcı performansının %67'lere kadar düşüş gösterebildiği ortaya konulmuştur (Luís ve diğ., 2015).

Bu çalışmadaki sonuçlar ele alındığında ise Hg ve Co-Exp deney grubunda oldukça yüksek cıva birikimi görülmektedir. Bununla beraber Co-Exp deney grubuna bakıldığında mikroplastik varlığında cıva alımının azaldığı görülmektedir. Keza aynı deney grubunda mikroplastik alımının da MP deney grubuna kıyasla daha düşük seyrettiği göze çarpmaktadır.

Bu durum midyelerin partikül alımından vazgeçmeleriyle ilintili olabilir. Midyelerin toksik maddelerin alımını azaltmak için filtrasyon oranlarını düşürdüğü bilinen bir adaptasyondur (Wegner ve diğ., 2012; Tran ve diğ., 2007). Nitekim filtrasyon oranları sonuçlarına bakıldığında da yine Co-Exp ve Inc deney gruplarının düşük düzeyler gösterdiği görülmektedir. Azalan filtrasyon oranıyla beraber daha az partikül filtre edilmekte ve bu da bünyeye alınan mikroplastik sayısını azaltmakta ve yine cıva birikiminde de düşüşe neden olmaktadır. Bir diğer faktör ise mikroplastiklerin uzaklaştırılması için artan feçes ve psödofeçes üretimi olabilir. Aynı tepki cıva alımına dönük bir adaptasyon da olabilir. Dolayısıyla tüm bu etmenler mikroplastik varlığında cıva birikiminin neden az olduğunu açıklayabilir. Sonuç olarak ortamdaki mikroplastik varlığının midyelerin cıva alımını modüle edebildiği söylenebilir.

Literatür incelendiğinde bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer sonuçların olduğu görülmektedir. Örneğin Barboza ve diğ. (2018a) tarafından yapılan çalışmada *Dicentrarchus labrax* türü balıklar üzerinde 1-5 µm boyutlu PE mikropartiküller ile cıvanın yalnız ve birlikte etkileri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada kullanılan mikroplastik konsantrasyonlarının yapılan bu tez çalışmasındaki konsantrasyonlardan ağırlıkça 10 ve 27 kat yüksek olduğu görülmektedir. Söz konusu çalışmadan elde edilen sonuca göre yüksek mikroplastik konsantrasyonunda yüzme aktivitesinin kombin deney grubunda %87'lere kadar azalma gösterebildiği ve organizmaların düzensiz ve uyuşuk yüzme davranışı sergiledikleri belirtilmiştir. Aynı çalışmanın devamında çeşitli biyobelirteçler ele alındığında ise yüksek mikroplastik konsantrasyonunda kombin deney grubunun daha fazla toksisite gösterdiği ifade edilmiştir (Barboza ve diğ., 2018b). Ancak söz konusu çalışmadaki deney düzeni açısından belirtmeli ki kullanılan mikroplastik konsantrasyonu ağırlıkça da çevresel düzeylerin üstünde olmakla beraber, partikül sayısı bakımından düşünüldüğünde de gerçekçi bir senaryoyu yansıtmayacağı ve sadece bir model olarak değerlendirilebileceği belirtilmelidir. Bir diğer çalışmada ise *C. fluminea* üzerinde yine eş boyutlarda mikroplastik (1-5 µm) ve cıvaya yalnız ve birlikte maruziyet sonucunda partikül varlığının cıva alımına etki ettiği, cıvanın biyokonsantrasyon faktörü (BCF) değerinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Oliveira ve diğ., 2018a). Gerçekleştirilen çalışmada kullanılan cıva konsantrasyonu (30 µg/l) çevresel bir aralıkta olmasına rağmen incelenen mikroplastik konsantrasyonu ağırlıkça bu deneyde kullanılanın 5 katından fazla (130 µg/l) olmakta ve yine partikül sayısı açısından ele

alındığında partikül boyutunun küçük olmasından ötürü çok daha fazla mikroboncuğa tekabül ettiği ortadadır.

Mikroplastiklerin çevresel kompartımandaki cıvayı adsorbe eden ve yüzeyinde biriktiren bir matris olarak rol oynadığı birkaç çalışmada belirtilmiştir (Graca ve diğ., 2014; Oliveira ve diğ., 2018a). Fernández ve diğ. (2018) ise gerçekleştirdikleri bir laboratuvar çalışmasında mikroplastik ve *I. galbana* (clon t-ISO) türü alglerin sorbsiyon ve desorbsiyon kinetiklerini incelemiştir. Sonuçlara göre cıvanın mikroalglerle sorbsiyonu ve desorbsiyonu mikroplastiklere olana kıyasla daha yüksek gerçekleşse de her iki matrisin de cıvanın organizmaya taşınımında potansiyel bir vektör olabileceği ifade edilmiştir. Rivera-Hernández ve diğ. (2019) ise *M. galloprovincialis* midyeleri sudan (waterborne), *I. galbana*'ya ve mikroplastiklere adsorbe haldeki cıvaya maruz bırakmış; sudan alım sonucunda en çok cıva birikiminin solungaçlarda görüldüğünü, partikül formlarla alım sonucunda ise en yüksek birikimin sindirim bezinde saptandığını belirtmişlerdir. Bununla beraber mikroplastikler ile alım neticesinde cıvanın %70'den fazlasının organizmalar tarafından elemine edildiği ifade edilirken, mikroalgler ile alım neticesinde cıvanın dokularda alıkonulduğu belirtilmiştir (Rivera-Hernández ve diğ., 2019). Benzer şekilde Khan ve diğ. (2015) ise *D. reiro* üzerinde toksik bir metal olan gümüşün alımında ve lokalizasyonunda mikroplastiklerin vektör rolünü incelemiştir. Araştırmada balıklar sadece radyoizotoplu gümüş (^{110m}Ag), sadece mikroplastik ve gümüşün ön bir işlemle mikroplastiklere adsorbe edildiği deney grupları ile maruziyete alınmıştır. Sonuç olarak mikroplastiklerden doğru gümüş alımının sudan alıma göre çok daha az olduğu görülmesine rağmen, bu deney grubunda gümüş birikimi zamana bağlı olarak azalmış ve intestinal dokuda Ag birikiminin ise arttığı görülmüştür. Bundan dolayı araştırmacılar mikroplastiklerin metallerin alım rotalarını ve biyolojik kullanımlarını değiştirebileceğini ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada ise Inc deney grubunda; diğer deney gruplarına uygulanana eş konsantrasyonda (10 µg/l) cıva, 25 µg/l konsantrasyonunda 10-45 µm boyutlu PE partiküllere ön bir prosesle adsorbe edilerek, bu partiküllerden cıva taşınımı ele alınmış ve potansiyel vektör rolleri değerlendirilmiştir. Çalışma dahilinde PE yüzeylere ne kadar cıvanın adsorbe olduğu belirlenmemiş, sadece bu yüzeylerde biriken potansiyel cıva adsorbisyonunun canlılarda ne ölçüde birikim göstereceği ölçülmüştür. Sonuç olarak mikroplastik yüzeylerden midyelere cıva taşınımının çok düşük düzeyde seyrettiği görülmüştür. Benzer bir sonucu Frydkjær ve

diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada hidrofobik organik kirleticiler için belirtilmiş ve bu kirleticilerin biyotaya taşınımında mikroplastiklerin çok düşük düzeyde bir katkısının olduğunu ifade etmişlerdir. Bu duruma bu deney set-up'ı dahilinde birkaç etmen neden olmuş olabilir. Bunlardan ilki filtre edildikten sonra akvaryumlara verilen cıvanın PE yüzeylerden suya desorbisyonu sonucu partikül yüzeylerdeki konsantrasyonun düşmesi gösterilebilir. Diğer bir etmen midyelerin filtrasyon oranında düşüş göstermesi sonucu azalan partikül alımı olabilir. Son olarak mikroplastiklerin bünyeye alınması sonucu artan psödofeçes ve feçes üretimi neticesinde plastik yüzeylerden taşınan cıvanın asimile edilmeden uzaklaştırılması önerilebilir. Bu önerme Rivera-Hernández ve diğ. (2019)'nin mikroplastik yüzeylerden alınan cıvanın büyük oranda elemine edildiğine dönük bulgularıyla da doğrulanmaktadır. Nitekim her ne kadar kantitatif olarak ele alınmamış olsa da bir gözlem olarak (psödo-)feçeslere gömülü haldeki en yüksek mikroplastik sayısının Inc deney grubunda görüldüğü not alınarak kaydedilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, sadece mikroplastik ve cıvanın yalnız ve birlikte etkilerini değil inkübasyon süreci ile mikroplastiklerin vektör potansiyelini aydınlatmasından ötürü, dahası görece çevresel düzeylerdeki stresör konsantrasyonları ile planlanmasından dolayı her iki kirleticinin birikim modellerine dair önemli sonuçlar sunmaktadır. Özetlemek gerekirse denizel ortamdaki PE mikrobuncukların varlığı organizmaların başta cıva olmak üzere diğer kirleticilerin alımına ve absorpsiyonlarına müdahale edebilmekle beraber, filtrasyon oranlarında düşmelere, feçes ve psödofeçes üretimiyle canlıların daha az besin almalarına yol açabilmektedir. Yine PE mikrobuncukların biyotaya cıva taşımında vektör rollerinin ise düşük düzeyde olduğu ve birlikte maruziyet sonucunda ise cıva alımını azalttığı görülmektedir.

5.2. BİYOBELİRTEÇLER

5.2.1. Filtrasyon Oranı

Partikül seçimi bivalvlerin diyet kalitesini ve enerji alımını optimize etmekte kullandıkları bir stratejidir ve bu canlılar partikülleri büyüklüğü, şekli ve yoğunluğu gibi özelliklerine göre filtre etmektedirler (Zhao ve diğ., 2018). Bununla birlikte midyeler üzerinde mikrobuncukların mikrofibrillere kıyasla yüksek oranda biriktirildiği daha önce gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2018; Qu ve diğ., 2018). Yine karidesler üzerinde Gray ve Weinstein (2017) partiküllerin vücuttan uzaklaştırılma sürelerinin fragment>mikrobuncuklar>mikrofibriller

şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Frydkjær ve diğ. (2017) ise düzensiz şekilli mikroplastiklerin muntazam partiküllere kıyasla daha yavaş vücuttan uzaklaştırıldığını belirtmişlerdir. Bu sonuçları doğrulayacak şekilde bu deney kapsamında kullanılan mikroboncuklar da manila kum midyeleri tarafından kolaylıkla filtre edilmiş ve hem dokularda hem de feçes ve psödofeçeslerde bu partiküllere rastlanılmıştır.

Filtrasyon oranı organizma düzeyinde değerlendirilen ve metabolizma hızına dair önemli bir etkilenme göstergesidir. Beslenme canlılar için kritik önemdedir ve bünyelerine aldıkları besini büyüme, üreme ve vücut dengesi için kullanmaktadırlar. Beslenmedeki herhangi bir olumsuzluk bu parametrelerin negatif etkilenmesine yol açacaktır. Örneğin bir tatlı su kabuklusu olan *C. fluminea* türü bivavler 1-5 µm boyutlarında mikroplastiklere maruz bırakıldıklarında filtrasyon oranlarında önemli azalmalar kaydedilmiştir (Oliveira ve diğ., 2018a). Aynı tür üzerinde benzer sonuçlar daha düşük konsantrasyonlara maruziyet sonucunda Guilhermino ve diğ. (2018) tarafından da saptanmıştır. *Paracentrotus lividus* türü deniz kestanesi larvaların ise 5.5 µm büyüklüğündeki mikroplastiklere 2 gün maruz kaldıklarında hem mikroalgleri hem de mikroplastikleri aktif olarak filtre edebildikleri görülmüş, *I. galbana* ve mikroplastiklerin filtre edilme oranlarının benzer oldukları ifade edilmiştir (Beiras ve Tato, 2019). *C. helgolandicus* türü kopepodlar mikroplastik baskısı altında beslenme stratejilerinde değişikliğe giderek daha az karbon biyokütlesi bünyelerine alırken (Cole ve diğ., 2015); *Pinctada margaritifera* türü istiridyelerin ise artan mikroplastik konsantrasyonuna bağlı olarak asimilasyon verimlerinin azalma gösterdiği rapor edilmiştir (Gardon ve diğ., 2018). Bu sonuçların aksine ise *Ostrea edulis* türü istiridyeler 60 gün süresince mikroplastiklere maruziyet sonrasında filtrasyon oranı açısından bir farklılık göstermezken (Green, 2016), *Crassostrea gigas* türü istiridyelerde maruz kalan canlılar daha yüksek alg tüketimi sergilemiştir (Sussarellu ve diğ., 2016). Yine Rist ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmada Akdeniz midyelerinin sudaki partikül sayısındaki artışa paralel olarak bir filtrasyon adaptasyonu göstermediği ifade edilmiştir. Wegner ve diğ. (2012) ise nano boyuttaki PS partiküllerin varlığında *Mytilus edulis* midyelerin valflerini kapatma eğilimi sergilediğini gözlemlemiş olup bunun sonucu olarak azalan filtreleme ve artan psödofeçes üretimi gösterdiklerini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmaların bazılarında uygulanan mikroplastiklerin etkilerinin gözlenip diğerlerinde gözlenmemesinin nedeni mikroplastiklerin partikül boyutlarının yanı sıra kullanılan konsantrasyon ve maruziyet sürelerinin farklı olması etkili olabilmektedir.

Cıva maruziyeti organizmaların solungaç dokularında fonksiyon kaybına sebebiyet verebilmektedir. Örneğin bir çalışmada *C. fluminea* türü bivalvlerde cıva maruziyetinin oksijen tüketim oranlarında önemli dalgalanmalara yol açtığı gösterilmiştir (Oliveira ve diğ., 2018b). *Perna perna* türü bivalvlerde de cıva maruziyetinin ardından oksijen tüketim oranları önemli şekilde düşüş göstermiştir (Anandraj ve diğ., 2002). Yeterli oksijenin temin edilememesi ile canlılarda metabolik fonksiyonların da sekteye uğramasına yol açacağı aşıkardır. Oksijen temininin haricinde filtre ederek beslenen organizmalarda solungaçlar, aynı zamanda besin alımı için de elzem organlardır. Dolayısıyla cıva maruziyeti sonucunda solungaçlarda meydana gelebilecek histopatolojik hasarlar bu fonksiyonun da ketlenmesi anlamına gelmektedir. Nitekim cıva maruziyeti sonrasında bu gibi histopatolojik değişimler oluşabileceği daha önce gösterilmiştir (Sheir ve diğ., 2010). Örneğin bir çalışmada 24 saat süren cıva maruziyetini takiben *M. edulis* bireylerin filtre etme kapasiteleri düşüş göstermiştir (Duchemin ve diğ., 2008). Yine diğer bir kabuklu türü *P. perna*'da da cıva maruziyetinin ardından filtrasyon oranlarında önemli düşüşler görülürken, atılıma alınan canlılarda bu oranların yeniden artmaya başladığı rapor edilmiştir (Anandraj ve diğ., 2002).

Solungaç fonksiyonlarındaki (filtrasyon ve oksijen tüketim oranları vb.) değişiklikler birkaç etmenden dolayı olabilir. Bunlardan ilki yukarıda da sözü edilen histolojik lezyonlarla ilintili etkilenmelerdir. Bir diğer etmen ise; sudaki kirleticilerin varlığında canlıların maruziyetten korunmak amaçlı valflerini kapatma eğilimi sergilemeleridir (Wegner ve diğ., 2012). Örneğin Tran ve diğ. (2007) *C. fluminea* türü kabukluların cıva alımından kaçınmak için valflerini uzun süre kapalı tutma ve hızlı açıp-kapama davranışları sergilediklerini rapor etmişlerdir. Yine bir diğer neden metallerin biyotransformasyonu amacıyla artan oksijen talebi ya da metabolik taleplerin karşılanabilmesi için artan filtreleme davranışı olabilir (Anandraj ve diğ., 2002).

Bu çalışmada filtrasyon oranlarındaki değişimler incelendiğinde ise mikroplastik ve cıvaya maruziyetin midyelerin filtrasyon oranlarını anlamlı şekilde düşürdüğü görülürken, stresör baskısı altındaki deney grupları arasında ise anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu durum her iki stresörün de filtrasyon oranını düşürdüğünü göstermektedir. Filtrasyon oranlarındaki bu düşüş tartışmanın yukarıki kısımlarında değinildiği gibi midyelerin partikül alımından kaçınmasıyla ilintili olabileceği gibi histolojik lezyonlarla da ilintili olabilir. Nitekim histolojik olarak

incelenen doku örnekleriyle de bu önerme doğrulanmakta ve solungaçlarda fonksiyon kaybına sebep verebilecek patolojilere rastlanmaktadır.

5.2.2. Psödofeçes ve Feçeslerde Mikroplastik Varlığı

Canlıların feçes ve psödofeçes üretimlerindeki dalgalanmalar, organizma düzeyinde diğer stresörlerden etkilenme göstergesidir. Mikroplastiklerin bünyeden uzaklaştırılmasında feçes ve psödofeçes üretimi önem teşkil etmektedir. Nitekim Wegner ve diğ. (2012), artan psödofeçes üretiminin partiküllerin bünyeden uzaklaştırılması açısından geliştirilen bir adaptasyon olsa da azalan filtrasyon oranı ile beraber düşünüldüğünde enerji rezervlerinde ciddi yıkımlara yol açacağını belirtmişlerdir. Örneğin *Carassius auratus* türü balıklarda maruziyet sonrası feçeslerde mikrofibrillere rastlanılmış (Jabeen ve diğ., 2018), juvenil *Sebastes schlegelii* türü balıklarda da bünyeye alım sonrası feçeslerde mikroplastik varlığı doğrulanmıştır (Yin ve diğ., 2018). 3 saat süren mikrofibril maruziyetinin ardından *M. edulis* bireylerin mevcut partiküllerin %71'ini psödofeçesle uzaklaştırırken, %1'den daha azını feçesle uzaklaştırdığı belirtilmiştir (Woods ve diğ., 2018). Midyeler seçici beslenen canlılardır ve istemsiz filtre ettikleri partiküllerin uzaklaştırılması psödofeçes üretimi ile gerçekleştirilir. Bu açıdan sudan besin alımında ilkin bariyer olan solungaçları takiben, istenmeyen mikropartiküller bağırsak yoluna aktarılmadan psödofeçes ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. *Atactodea striata* türü bivalvlerin mikroplastiklere 10 gün süren maruziyeti sonucu psödofeçes üretiminin maruz kalınan konsantrasyona bağlı olduğu; feçeslerdeki mikroplastik miktarının ise yine geçen güne ve konsantrasyona bağlı olarak önemli şekilde değiştiği belirtilmiştir (Xu ve diğ., 2017). Gonçalves ve diğ. (2019) ise Akdeniz midyesinde bağırsak dokularında fiziksel anomali görülmemesinin bir nedeni olarak partiküllerin hızlı bir şekilde bünyeden uzaklaştırılmasını önermişlerdir. PE mikrobuncuklar normalde suda batmama eğilimindedir. Ancak doğada biyofilm formasyonu ve dalga hareketleri gibi etmenler ile su kolonu boyunca hareket ederek biyoerişebilirlikleri değişebilmektedir. Bu çalışmada ise deneyin gerçekleştiği akvaryum sisteminde biyofilm formasyonu göz ardı edilmiş olsa da feçeslerde mikrobuncuklara rastlanması, uygulanan pompa sisteminin partikülleri su kolonu boyunca dağıttığını ve canlılar açısından bu partiküllerin erişilebilir olduğunu doğrulamaktadır. Nitekim midye dokularında mikroplastiklerin saptanması da mikroplastiklerin biyoerişilebilir olduğunu göstermektedir. Suda süspanse olan partiküllerin her ne kadar feçes ve psödofeçes yapılarına yapışacağı düşünülse de partiküllerin yapışmadan

ziyade bu yapıların içine gömülü olması onların midyeler tarafından filtre edilip uzaklaştırıldığını göstermektedir.

5.2.3. Histopatolojik Değerlendirme

Mikroplastik maruziyetinin canlılarda histopatolojik lezyonlara ve doku yıkımlarına sebebiyet verdiği farklı türler üzerindeki çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Romano ve diğ. (2018) *Barbodes gonionotus* türü balıklarda <400 µm PVC partiküllere 96 saat süren maruziyetin ardından histopatolojik etkileri incelemişlerdir. Çalışmada balıkların proksimal ve distal bağırsaklarında plastik partiküllere rastlanılmış ve bunun sonucu olarak da kullanılan konsantrasyonla paralel şekilde mukozal epitel tabakanın kalınlaştığı belirtilmiştir. Araştırmacılar mukozal epitel tabakanın kalınlaşmasının besin absorpsiyonunu negatif etkileyeceğini ve artan dışkılama süresine neden olacağını; sonuç olarak partiküllerin bünyede daha uzun süre kalarak daha fazla toksik etki göstermesine sebep olabileceğini ifade etmişlerdir (Romano ve diğ., 2018). *Danio reio* üzerinde ise farklı polimer tiplerindeki partiküllere maruziyetin histopatolojik sonuçlarını ele alan bir çalışmada; PA, PE, PP, PVC partiküllere maruziyet sonucu villuslarda anomali görülse de solungaç, karaciğer ve böbreklerde herhangi bir olumsuzluğa rastlanılmadığı ve polimer tipleri açısından ise önemli bir farklılığın oluşmadığı belirtilmiştir (Lei ve diğ., 2018). *Zacco temminckii* türü balıklarda ise nano PS partiküllere maruziyet sonrasında karaciğer dokusunda vakuol oluşumu görüldüğü rapor edilmiştir. (Chae ve diğ., 2018). Yine *Carassius auratus* türü balıklar besin yoluyla mikrofibril, fragment ve pelet tipli plastik partiküllere maruz bırakıldığında da önemli sonuçlar görülmüştür. Mikrofibril maruziyeti sonrasında organlarda birikime de rastlanırken, balıkların karaciğerinde enflamatuvar cevaplar meydana gelmiştir. Fragment ve pelet partiküller her ne kadar yutulmamış olsa dahi çiğneme işleminin balıklarda çene hasarına yol açabileceği de ifade edilmiştir (Jabeen ve diğ., 2018). Dolayısıyla sucul canlılarda mikroplastik maruziyetinin ardından; histopatolojik hasarlar sonucu besin asimilasyonunun azalması, beslenme aktivitesindeki düşüş, artan dışkılama süreleri ve hücresel nekroz süreçleri sonucu vücut hemostazının bozulması uzun vadede potansiyel açlığa, kondisyon faktöründe düşüslere ve üreme üzerine negatif etkilere neden olarak popülasyon düzeyinde ciddi olumsuzluklar doğurabileceği ortadadır.

Mikroplastik maruziyeti sadece balık türleri üzerinde değil omurgasızlar üzerinde de histolojik lezyonlara sebep olmaktadır. Örneğin bir çalışmada *M. galloprovincialis* midyelerin

10 µm büyüklüğündeki PS partiküllere maruziyeti sonrasında gastrik epitelyumda hemosit infiltrasyonu görüldüğü belirtilmiştir (Gonçalves ve diğ., 2019). Yine *M. galloprovincialis* midyelerin 50-570 µm PE partiküllere 21 gün süren maruziyetinin ardından manto ve gonad dokularında ciddi nekroz görüldüğü, solungaç dokusunda ise lamellerde kontak kaybı ve sil kusurlarının yanı sıra sindirim bezinde hemosit infiltrasyonu meydana geldiği rapor edilmiştir (Bråte ve diğ., 2018b). Benzer sonuçlar bu çalışmada da görülmüş yalnız, kombin ya da inkübe senaryolarla mikroplastiklere maruziyet neticesinde solungaçlarda epitel dokuda bozulmalar, filament yapıları arasında kontak kaybı ve hemosit infiltrasyonu meydana gelirken; sindirim bezinde de tübüler atrofi, hücresel nekroz ve hemosit infiltrasyonu gibi patolojilere rastlanılmıştır. Tüm bu durumlar her iki organda meydana gelen mikroplastik birikiminin bir sonucu olabilir. Keza yumuşak doku sindiriminin ardından da her iki dokuda da mikroplastik birikiminin olduğu görülmüştür. Ayrıca PAS reaksiyonu doku karbonhidratlarının varlığını gösteren bir indikatördür (Bancroft ve Stevens, 1982). PAS pozitif maddelerin yapılarındaki ve miktarlarındaki değişiklikler rengin şiddetini değiştirebilir (Dahlquist ve diğ., 1965). Hücre örtüsü ve goblet hücrelerindeki mukusu oluşturan materyaldeki yapı taşlarının miktarının azalması veya kimyasal yapısının bozulması PAS(+) reaksiyonun azalmasının nedeni olabilir. Zira cıva maruziyetinin canlıların karbonhidrat metabolizmasına müdahale edebildiği bilinmektedir (Velez ve diğ., 2016). Bu çalışmada da cıva birikimiyle birlikte dokularda böylesi etkilenmeler göze çarpmaktadır.

Organizmalar üzerinde meydana gelebilecek histopatolojik etkilenmeler canlı biyolojisi (yaş, kondisyon faktörü vs.), maruz kalınan stresör konsantrasyonu ve maruziyet süresi, biyoreşebilirliğe dönük faktörler (partikül büyüklüğü ya da kimyasal form vs.), başka kirleticilerin varlığı, alım yolağı, atılım periyodunun uygulanması vb. etmenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir (de Oliveira Ribeiro ve diğ., 2002; Fairbrother ve diğ., 2007; Rochman ve diğ., 2014b; Jabeen ve diğ., 2018; Jovanović ve diğ., 2018). Cıva canlılar için oldukça toksik bir metaldir ve bu metale maruziyet sonucunda organizmalar üzerinde önemli histolojik hasarlar meydana geldiği birçok çalışmada rapor edilmiştir. Literatür incelendiğinde *Salvelinus alpinus*, *Dicentrarchus labrax*, *Ostrea edulis*, *Perna perna* ve *Mytilus edulis* gibi çeşitli sucul organizmalar üzerinde cıva maruziyetinin önemli doku patolojilerine neden olduğu görülmektedir (Bigas ve diğ., 1997; Gregory ve diğ., 1999; de Oliveira Ribeiro ve diğ., 2002; Giari ve diğ., 2008; Sheir ve diğ., 2010). Bu çalışmada da midyelerin hem solungaç hem de sindirim bezinde, cıvaya maruziyet sonucu çeşitli dejenerasyonlara

rastlanılmıştır. Bu durum her iki organda meydana gelen cıva birikimiyle ilişkili olabilir. Örneğin solungaç dokusu gerek organizmaların oksijen talebinin gerekse de filtre ederek beslenen canlılarda ihtiyaç duyulan besinin karşılanması açısından elzem organlardır. Stresör baskısı altında meydana gelen doku patolojileri sonucunda bu organda fonksiyon kaybı gerçekleşebilmektedir. Nitekim deney grupları arasında filtrasyon oranları karşılaştırıldığında da mikroplastik ve cıva maruziyetindeki midyelerin kontrole kıyasla önemli bir azalma sergilediği görülmektedir. Sindirim bezi ise cıva vb. çeşitli kirleticilerin elemine edildiği önemli bir detoksifikasyon organıdır. Bünyede biriktirilen kirleticiler detoksifiye edilmez ya da vücuttan uzaklaştırılmazsa reaktif oksijen türlerindeki artış vb. süreçler sonucu redoks dengesi bozulmakta ve organizmada oksidatif hasar görülebilmektedir. Bu çalışmada midyelerin sindirim bezinde her ne kadar hem mikroplastik hem de cıva birikimi görülmüş olsa da değerlendirilen oksidatif stres parametrelerinde anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Bu durum maruziyet süresi ile ilintili olabilir. Bir hafta maruziyet sonucu her ne kadar organizmalarda oksidatif stres görülmemiş olsa da maruziyetin devamı durumunda, gözlenen doku patolojileri ve çeşitli fonksiyonların ketlenmesiyle beraber hayatta kalıma etki edebilecek düzeyde ciddi olumsuzlukların meydana gelebilmesi söz konusudur.

Sonuç olarak seçili konsantrasyonda mikroplastik ve cıvaya söz konusu deney senaryoları ile bir hafta süren maruziyetin sindirim bezi ve solungaç dokuları üzerinde histolojik değişimlere sebep olabildiği ve bu patolojilerin ilgili organlarda filtrasyon gibi çeşitli fonksiyon kayıplarına yol açarak organizma sağlığını olumsuz etkileyebilecek sonuçlara yol açabileceği görülmektedir. Gelecek çalışmaların daha uzun maruziyet süreleri ile kurgulanması bu kirleticilerin sucul organizmalarda yol açtığı toksikolojik etkilerin daha iyi anlaşılması açısından önemli veriler sağlayacaktır.

5.2.4. İmmünomodülasyon

Bivalvlerde hemositler doku onarımı, kabuk üretimi ve sindirim gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynarlar ve patojenlerin eliminasyonu ve kirleticilerin degradasyonunda önemli role sahiplerdir (Donaghy ve diğ., 2009). Midyelerde kapalı bir dolaşım sistemi olmadığı için bu hücreler bir dokudan diğerine hareket edebilirler ve stres şartları bu gibi durumlara müdahaleler içerir (Martínez-Gómez ve diğ., 2015). Midyelerde immün defans, hücrelerin ya da humoral mekanizmaların düzenlemesiyle meydana gelir ve hemositler tam da burada önem arz etmektedir (Coles ve diğ., 1995). Midyelerin dolaşım sıvısında mevcut olan granülositler;

hücrel nutrientlerin endositoz yolu ile sindirimi ve immün savunmadaki görevleri nedeniyle lizozomca zengin hücrelerdir. Lizozomlar ise dinamik, farklı şekillerde, asidik pH'ya sahip ve birçok hidrolitik enzim ihtiva eden, makromoleküllerin degradasyonundan sorumlu organellerdir (Zhao ve diğ., 2011). Denizel organizmalarda savunma ve detoksifikasyonda önemli rol oynarlar. Bu fonksiyonlar ise membranların işlevselliğine bağlı süreçler olduğu için lizozomal membran stabilizasyonu hücre sağlığına dönük bir gösterge teşkil eder (Luzio ve diğ., 2007). Lizozomal membran stabilitesi hücrelere penetre olan toksik kimyasalların minimal konsantrasyonlarına dahi oldukça duyarlıdır (Canesi ve diğ., 2007). Nötral kırmızı ise katyonik bir boyadır ve lipofilik bir kimyasaldır. Hücrelerin lizozomal kompartımanlarında birikim gösterir. Hemositler tarafından bu boyanın alımı pinositoz ya da pasif difizyon ile gerçekleşir (Matozzo ve diğ., 2012a). Bu boyanın hücreler tarafından alımındaki değişimler hemositlerin plazma membranlarındaki hasar ya da lizozomal kompartımanların hacmindeki artış sonucu meydana gelebilir (Coles ve diğ., 1995). Lizozomal membran destabilizasyonu sonucunda bu boya lizozomdan sitozole sızarak hücrelerin ölümüne sebebiyet verir.

Nötral kırmızı alımı biyotik ya da abiyotik stres durumu oluşturabilme potansiyeline sahip etmenlerin toksisite değerlendirilmesinde kullanılabilir (Munari ve diğ., 2011; Parisi ve diğ., 2017; Bouallegui ve diğ., 2018). Örneğin bir gastropot olan *Halotis tuberculata* türü organizmaların hemositleri in-vitro olarak Cd'ye maruz bırakıldıktan sonra, konsantrasyondaki artışla beraber düşük pinositik aktivite sergilemişlerdir (Ladhar-Chaabouni ve diğ., 2015). *M. edulis* türü midyelerde de Cd maruziyetinin ardından pinositik aktivitede önemli azalmalar bildirilmiştir (Coles ve diğ., 1995). *R. philippinarum* üzerinde ise hem Cu hem de Cd maruziyetinin lizozomal membran destabilizasyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Matozzo ve diğ., 2001). Singaram ve diğ. (2013)'de *Scylla serrata* türü yengeçlerde yaptıkları çalışmada cıva maruziyetinin ardından hemositlerin membran destabilizasyonu sergilediğini belirtmişlerdir. Triclosan üretim süreçlerinde plastiklerin yapısına eklenebilen bir antimikrobiyal bileşiktir ve manila kum midyelerinin bu kimyasala maruziyetinin ardından da hemositlerin nötral kırmızı alımında kayda değer şekilde azalmalar görülmüştür (Matozzo ve diğ., 2012a). Bu sonuçlardan farklı olarak *R. philippinarum* midyeler bir non-steroidal antienflamatuvar ilaç maddesi ibuprofene maruz bırakıldığında, 100 ve 500 µg/l konsantrasyon içeren deney gruplarında nötral kırmızı alımı açısından bir fark saptanmamıştır (Matozzo ve diğ., 2012b). Bir başka araştırmada ise *Crassostrea virginica*

istiridyelerin hepatopankreas hücreleri 50 nm ve 3 µm büyüklüğünde PS partiküllere in vitro (4 saat) ya da in vivo (48 saat) olarak maruz bırakıldığında lizozomal destabilizasyon açısından bir fark görülmemiştir (Gaspar ve diğ., 2018). Yine bu çalışmada da nötral kırmızı alımı açısından deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Dolaşımdaki total hemosit sayısı bivalvlerde stresörlerin negatif etkilerinin değerlendirilmesinde oldukça yaygın kullanılan immünobelirteçlerden biridir (Shi ve diğ., 2018; Ji ve diğ., 2015; Hong ve diğ., 2016). Dolaşım sıvısındaki artan hemosit sayısı, hücre çoğalması ya da hücrelerin dokulardan dolaşım sıvısına taşınımı sonucu olabilirken; azalan hemosit sayısı ise hücrelerin parçalanması ya da hemolenfden dokulara hücre taşınımı nedeniyle olmaktadır (Matozzo ve diğ., 2012a). Metaller gibi kirleticiler ya da patojenler bu taşınım süreçlerine etkiye bulunabilir ve organizma sağlığı açısından olumsuzluklar yaratabilir. Örneğin bir çalışmada *R. philippinarum* türü midyeler Cd'ye maruz kaldıktan sonra dolaşımdaki total hemosit sayısında önemli düşüş gözlenmiştir (Ji ve diğ., 2015). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında kullanılan konsantrasyona eş cıva maruziyetinin ardından *S. serrata* 'da da sirküle hemosit sayısında düşüş görüldüğü belirtilmiştir (Singaram ve diğ., 2013). *Palaemon elegans* türü karideslerde de ağır metal maruziyetinin ardından dolaşım sıvısındaki total hemosit sayısı önemli şekilde azalma gösterilmiştir (Lorenzon ve diğ., 2001). Triclosan maruziyetinin ardından da *R. philippinarum* midyelerde kontrole kıyasla önemli azalma rapor edilmiştir (Matozzo ve diğ., 2012a). Dolaşımdaki total hemosit sayısının azalmasındaki en önemli neden ise hemositlerin aynı zamanda kirleticilerin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonuna dönük oynadıkları rolden ötürüdür ve kirleticileri bünyelerinde biriktirmektedirler. Örneğin Gagnaire ve diğ. (2004) *C. gigas* hemositlerini 24 saat süresince in vitro olarak cıvaya maruz bıraktığında ciddi hücre ölümü gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde *M. edulis* üzerinde de uygulanan konsantrasyona bağlı olarak Ag, Cd, Hg ve Pb maruziyetinin ardından hücre yaşayabilirliğinde düşüş görülmüştür (Rault ve diğ., 2013). *Mytilus* spp. midyeler ise PS-mikroplastikler ve toksik fluoranthene ile kombin şekilde ya da yalnız olarak maruz bırakıldıklarında 7 gün maruziyetin ardından ölü hemosit sayısında kontrole kıyasla önemli artış görüldüğü belirtilmiştir (Paul-Pont ve diğ., 2016).

Bu çalışmada ise dolaşımdaki total hemosit sayısı açısından deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemekle beraber, mikroplastik ve cıva maruziyetinin

manila kum midyesi üzerinde hemosit yaşayabilirliğinde ciddi azalmaya sebep olduğu saptanmıştır.

5.2.5. Antioksidan Batarya

Solunum organı olan solungaçlar midyelerin kirleticiler ile temasında ilkin bariyerlerdir. Sudan maruz kalınan inorganik cıva ya da mikropartiküller bu dokuda hücrel hasarlar meydana getirebileceği gibi, solungaçları geçerek filtre edilen mikroplastikler sindirim sistemine transloke olabilir ve metabolik fonksiyonların gerçekleştiği sindirim bezinde hücrel hasarlara yol açabilir. Ayrıca her iki organın da kontaminantların alımı ve eliminasyonunda role sahip olmalarından ve de farklı fizyolojik işlevleri yerine getirmelerinden dolayı oksidatif hasarı ve doku patolojilerini incelemek için solungaç ve sindirim bezi hedef organlar olarak seçilmiş, toksisite değerlendirmesinde daha anlamlı sonuçlar sağlayacağı düşünülmüştür.

Reaktif oksijen türleri oksijen metabolizmasındaki hücrel tepkimeler sonucu doğal olarak oluşmaktadır ve serbest radikal zincir tepkimelerini indükleyerek bu radikallerin intraselüler ortamda artış göstermesine neden olabilmektedir. Hidrojen peroksit ise bir serbest radikal olmamasına rağmen biyolojik membranlarla kolaylıkla etkileşime girerek HO• radikalini oluşturmaktadır. Katalaz enzimi de hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır. Bu çalışma kapsamında deney grupları arasında CAT enzim aktivitesi açısından farklılıklar ele alınmış ve solungaç ile sindirim bezi için ayrı şekilde yorumlanmıştır. Sonuçlara göre her iki doku için de anlamlı bir fark görülmemekle birlikte sindirim bezinde CAT aktivitesi açısından mikroplastik içeren tüm deney gruplarında kontrole kıyasla daha düşük seyretmiştir. Bu duruma sindirim bezinde görülen mikroplastik lokalizasyonu ve buna bağlı gelişen hücrel stres sebep olabilmektedir.

Cıva formuna bağlı olmakla beraber, hücreler cıvayı ya zengin tiyol içeriğine sahip proteinler olan sistein kompleksi ile birlikte aktif bir şekilde ya da pasif olarak almaktadır. Cıva sülfidril gruplara disülfid bağları ile konjuge olur ve proteinlerin sülfür aminoasit redizülerine bağlandığında, onların tersiyer yapılarını etkileyerek kararlılıklarında değişimlere yol açar. Bu nedenle de lizozom ve mitokondri gibi organeller ile membran yapıları etkilenerek birçok hücrel fonksiyon sekteye uğrayabilir (Bjørklund ve diğ., 2017). Ayrıca Fenton reaksiyonlarında katalist gibi davranarak ROS düzeylerinde artışa sebebiyet verebilir (Lund

ve diğ., 1993). Hücre içi redoks dengesi için mutlak olan enzimatik anitoksidanlar, sülfidril gibi fonksiyonel gruplarla etkileşimleri nedeniyle cıva maruziyetine karşı oldukça hassastırlar. Bunun yanı sıra cıva tiyol grupları için de yüksek afiniteye sahiptir ve bu bileşikler için cıva yakalayıcı anlamında olan merkaptan ismi de kullanılır. Bu nedenle cıva, GPx ve CAT gibi enzimatik anitoksidanların kofaktörü olan GSH ile geri dönüşsüz şekilde kovalent bağ yaparak onun yıkımına neden olur. GSH'ın spesifik olarak cıvaya bağlanması, hücresel proteinlere bağlanmasını önleyerek detoksifikasyon süreçleri açısından ya cıvaya olan afinitesi gibi spontan şekilde ya da bir kısım antioksidan enzimleri katalizlemesiyle gerçekleşir. Dolayısıyla intraselüler ortamda azalan GSH miktarı cıva ile oluşturduğu etkileşim sonucu açıklanabilir. Söz konusu olan bu miktar güncellenmezse GSH'ın süpürücü etkisinin yokluğunda ROS artışı sonucu polisakkarit depolemirizasyonu ile membran yapılarında destabilizasyon, protein yapılarında konformasyonel bozukluklar ile fonksiyonel inhibisyonlar, MDA artışı ve nihayetinde oksidatif hasar, hatta hücre ölümleri kaçınılmaz olarak kendini gösterir.

Bu çalışma kapsamında ise yine solungaç ve sindirim bezinde GSH konsantrasyonları incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında anlamlı bir fark saptanmasa da GSH konsantrasyonları açısından doku spesifik cevaplar geliştiği görülmektedir. GSH düzeyleri sindirim bezinde diğer deney gruplarına kıyasla en yüksek kontrol grubunda görülürken; solungaç dokusunda ise diğer deney gruplarına kıyasla kontrolde daha düşük değerler sergilemiştir. Her iki dokuda gözlenen bu farklı paternlerin nedeni fizyolojik fonksiyonlardaki farklılıklar olabilir. Ayrıca midyelerde sindirim bezi daha çok detoksifikasyon süreçlerinde rol oynarken, solungaç dokusu ise kirleticilerin alım süreçleri ve oksijen metabolizması açısından kritik önemdedir. Dolayısıyla her iki dokunun farklı metabolik kapasitelere sahip olması da GSH düzeylerindeki farklılıklara neden olabilir.

Glutasyon reduktaz (GR) glutasyonun okside ve indirgenmiş formları arasındaki oranın dengesi için temel bir enzimdir. Bu nedenle GR'ın inhibisyonu redoks döngüsünde ve antioksidan savunmada disfonksiyonlara sebep olabilir. GR, NADPH'ı kofaktör olarak kullandığından aktivitesinin azalması durumunda NADP üretimi de azalacaktır (Carugo ve Argos, 1997). Örneğin birçok çalışmada mikropplastik maruziyeti sonrasında çeşitli organizmalar üzerinde IDH (İzositrat Dehidrogenaz) aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Guilhermino ve diğ., 2018; Barboza ve diğ., 2018b; Oliveira ve diğ., 2013). IDH

aktivitesinin azalması NADP ve NADPH azalmasına sebebiyet verir. Nihayetinde GR aktivitesinin inhibisyonuyla sonuçlanan metabolik süreç sonunda buna bağlı olarak glutatyon yıkımı başlar. Glutatyon yıkımı ise Glutatyon S-Transferazı (GST) ve Glutatyon Peroksidazı (GPx) inhibe ederek ROS'ların uzaklaştırılmasını engeller. Dolayısıyla mikroplastik maruziyeti sonrasında GSH aktivitesinin azalması prooksidatif yanıtların çoğalmasına ve nihayetinde lipid peroksidasyonuna sebebiyet verebilir. Aynı durum Hg maruziyeti için de geçerli olmakla beraber bu metale maruziyet sonrasında da organizmalarda IDH aktivitesinde düşüşler görüldüğü bilinmektedir (Oliveira ve diğ., 2018a; Oliveira ve diğ., 2018b). Solungaçlar cıva vb. kirleticilerin sudan alımı neticesinde en çok etkilenen organların başındadır. Nitekim bu dokuda GSH düzeyleri tüm deney gruplarında kontrole kıyasla yüksek seyretmektedir. Bunun nedeni ise yine artan reaktif oksijen radikallerini elemine etmek amacıyla GSH konsantrasyonlarının yükselmesi görülebilir. Dahası metal maruziyetinin canlılarda MT sentezini indüklediği bilinmektedir (Geret ve Cosson, 2002; Le ve diğ., 2016). MT'ler birçok tiyol grubu içeren sistein zengini ve metal bağlayan detoksifikasyon proteinleridir. Bu çalışmada her ne kadar MT sentezi mercek altına alınmamış olsa da GSH ve diğer antioksidan düzeylerindeki değişimler MT düzeyleri ile ilintili hücresel proseslerle de bağlantılı olabilir.

Antioksidan batarya ile ilgili bu çalışma kapsamında bir diğer parametre olarak yine solungaç dokusu ve sindirim bezindeki MDA düzeyleri değerlendirilmiş ve sonuçlara göre her iki dokuda da deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu durum kullanılan konsantrasyonların çevresel düzeylerde ve çoğu laboratuvar çalışmasında uygulanan konsantrasyonlardan daha düşük olması ve maruziyetin süresinin kısa olmasının yanı sıra manila kum midyesinin kirleticileri elemine etmede yüksek başarı gösterebildiği ve toleransının fazla olması ile açıklanabilir.

Yüksek konsantrasyonlarda cıvaya maruziyetin EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) inhibisyonuna neden olarak sucül canlıların detoksifikasyon kabiliyetlerini kitlediği bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2010; Guilherme ve diğ., 2008). Dahası intraselüler ortamdaki ROS artışına paralel olarak transkripsiyon evrelerinde oksiradikallere karşı duyarlı olan Sitokrom P-450 biyotransformasyon sisteminde de inhibitör etkilere neden olmaktadır (Regoli ve Giuliani, 2014). Dolayısıyla metal bağlama bölgelerinin disfonksiyonu ve ROS artışına karşı yetersiz kalan antioksidan savunma sonucunda MDA düzeylerinde artış kendini

göstermekte ve organizmada oksidatif hasar, hatta doku patolojilerinin görülmesi kaçınılmaz olmaktadır. Ancak bu çalışmada kullanılan konsantrasyonların *R. philippinarum*'da herhangi bir metabolik depresyona seçili maruziyet süresince yol açmadığı görülmektedir.

Literatür incelendiğinde elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir olduğu görülmektedir. Örneğin Coppola ve diğ. (2017) bu çalışmadaki gibi bir sıcaklık değerinde (21 °C) *M. galloprovincialis* midyeleri 250 µg/l konsantrasyonunda cıvaya maruz bıraktığında CAT aktivitesinin yanı sıra lipid peroksidasyonunda da herhangi bir farklılığın görülmediğini rapor etmişlerdir. Velez ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise hem *R. philippinarum* hem de *R. decussatus* türü midyeler cıvaya maruz bırakılmış ve 4 mg/l Hg konsantrasyonuna kadar lipid peroksidasyonunda bir değişim görülmezken, CAT aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı rapor edilmiştir. Ancak belirtmek gerekir ki değişimin başladığı ve artarak devam ettiği konsantrasyon bu çalışmadakinden 20 kat daha yüksek bir değer içermektedir. Başka bir araştırmada *Bathymodiolus azoricus* türü kabuklular üzerinde ise 1 µM cıvaya maruziyetin lipid peroksidasyonunda bir farklılığa yol açmadığı gösterilmiştir (Company ve diğ., 2004). *C. fluminea*'da da 31 µg/l cıva konsantrasyonuna 8 gün süren maruziyet sonrası lipid peroksidasyonu açısından bivalvlerde herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Oliveira ve diğ., 2018b). Dolayısıyla metal maruziyeti sonrası antioksidan batarya üzerinde meydana gelebilecek değişiklikler maruz kalınan konsantrasyon ve maruziyet süresi başta olmak üzere ortam şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir.

Aynı durum mikropplastik maruziyeti açısından da geçerlidir. Örneğin *Scrobicularia plana* türü bivalv üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada 1 mg/l konsantrasyonunda mikropplastik maruziyetinin solungaç dokusunda saptanan CAT aktivitesi açısından bir farka sebep olmadığı görülmüş, 7 gün maruziyetin ardından ise sindirim bezinde CAT aktivitesi önemli şekilde azalırken 14 gün maruziyet sonrasında bir fark göstermemiştir (Ribeiro ve diğ., 2017). *M. galloprovincialis* midyeler 10 mg/l konsantrasyonunda 20-25 µm boyutundaki mikropplastiklere maruz bırakıldığında ise hem t-GSH hem de CAT düzeyleri açısından herhangi bir maruziyet süresinde fark görülmemiştir (Pittura ve diğ., 2018). Diğer yandan *Dreissena polymorpha* türü kabuklularda ise CAT aktivitesinin maruz kalınan konsantrasyona bağlı olarak değişebildiği, lipid peroksidasyonunun ise maruz kalınan süreye bağlı olarak bir değişim göstermediği rapor edilmiştir (Magni ve diğ., 2018). Bunun tersi sonuçlar ise O'Donovan ve diğ. (2018) tarafından sunulmuş ve maruziyet süresinin antioksidan

parametreler üzerinde dalgalanmalara neden olabileceği ifade edilmiştir. Dolayısıyla mikroplastik maruziyeti açısından da maruz kalınan süre ve konsantrasyona ek olarak mikroplastiklerin boyutları, tipi, diğer kirleticilerin varlığı ve diğer abiyotik faktörler hücresel stres göstergelerinde dalgalanmalara yol açabilecek etmenler olarak kendini göstermektedir (Fonte ve diğ., 2016; Paul-Pont ve diğ., 2016; O'Donovan ve diğ., 2018; Oliveira ve diğ., 2018a; Lu ve diğ., 2018; Wen ve diğ., 2018).

5.2.6. Biyobelirteç Olarak Dolaşımdaki Hücre Serbest Nükleik Asit Kantitasyonunun Değerlendirilmesi

Mikroplastik maruziyeti sonucu çeşitli organizmalar üzerinde genotoksisite içeren etkiler görüldüğü laboratuvar deneyleri ile doğrulanmıştır. Mikronükleus sıklığı, Komet, qRT-PCR gibi farklı analizler uygulanarak değerlendirilen çalışmalarda sırasıyla kromozomal hasarlar, DNA kırılmaları ya da hücresel süreçleri modüle eden genlerin ifadelerinde değişimler gözlenmektedir. Örneğin *Hediste diversicolor* türü poliketler 250 µm büyüklüğündeki PVC partiküllere sedimentten doğru maruz bırakıldığında sölomositlerde DNA fragmentasyonu gözlenmiştir (Gomiero ve diğ., 2018). *Scrobicularia plana* türünde ise 14 gün süren 20 µm boyutlu mikroplastiklere maruziyeti takip eden 7 gün atılım süresi sonunda DNA kırılmaları saptanmıştır. Nitekim aynı çalışmada araştırmacılar 7 gün atılım süresinin mikroplastiklerin bünyeden uzaklaştırılmasına yeterli olmadığını da belirtmiştir. (Ribeiro ve diğ., 2017). Avio ve diğ. (2015) *M. galloprovincialis* midyelerin <100 µm mikroplastiklere maruziyeti sonrasında kontrole kıyasla DNA kırılmalarının fazla olduğunu bildirmişlerdir. Magni ve diğ. (2018) ise *Dreissena polymorpha* midye türünde mikroplastik maruziyeti sonrası kromozom kırılmalarını değerlendirmiş ve çekirdek materyalin onarılamaz etkiler göstermediğini belirtmişlerdir. Erişkin *Danio reio* üzerinde mikroplastik maruziyetinin immün sistemle ilintili genlerin ifadelerinde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir (Jin ve diğ., 2018). *M. galloprovincialis* 'de ise 24 saat süren kısa süreli maruziyet sonrasında dahi gen ifadelerinde %67 civarında değişim belirlenirken; metabolizma, immünite, apoptoz ve oksidatif stres ile ilintili genlerin ekspresyonlarında dokulara bağlı olarak değişimler görüldüğü rapor edilmiştir (Détrée ve Gallardo-Escarete, 2017). Yine *M. galloprovincialis* larvalarında 3 µm boyutlu PS partiküllere 48 saat süren maruziyetin ardından antioksidan cevaplar ve nöroendokrin sinyaller ile ilintili transkriptlerin daha erken aşamalarda (24 hours post-fertilization) değişim sergilediği kaydedilirken, daha geç larval aşamalarda lizozomal cevaplar ve kabuk biyogenezi

ile ilintili transkriptlerin ifadelerinde değişimler göze çarpmıştır (Capolupo ve diğ., 2018). *Cyprinodon variegatus* balık türünde de mikropplastik maruziyetini takiben immünite, apoptoz ve oksidatif stresle ilintili genlerin ifadelerinde değişimler rapor edilmiştir (Choi ve diğ., 2018).

Cıva maruziyeti de organizmalar üzerinde genotoksik çıktılarına sebep olmaktadır. Örneğin bir poliket türü *Perinereis aibuhitensis* organizmalar 50 ve 500 µg/l cıvaya maruz bırakıldığında sölomosit hücrelerinde DNA kırılmaları, yine artan konsantrasyona bağlı olarak mikronükleus sıklığında da artış görüldüğü rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2017b). Başka bir çalışmada ise bir deniz salyangozu türü *Planaxis sulcatus*'da da cıvaya maruziyet sonrasında solungaç hücrelerinde DNA kırılmaları meydana geldiği gösterilmiştir (Bhagat ve Ingole, 2015). Ayrıca cıva maruziyetinin organizmaların gen ifadelerinde değişimlere sebep olduğu (Zhang ve diğ., 2016) ve bivalv türlerinde de gen ekspresyonlarına müdahale ederek metabolik süreçleri modüle edebildiği bilinmektedir (Varotto ve diğ., 2013).

Bu çalışmada ise dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin kirleticilerin baskısı altındaki deniz canlılarında stresörlerden etkilenme durumunu belirlemede yeni bir moleküler biyobelirteç olabilme potansiyelleri mercek altına alınmıştır. Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asit düzeyleri klinik olarak kanser, inme, travma ve diyabet gibi organizma hemostazına etki edebilecek patolojilerin değerlendirilmesinde bir süredir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Schwarzenbach ve diğ., 2011; Gilad ve diğ., 2008). Ancak ekotoksikoloji bağlamında böylesi bir yaklaşım henüz bir laboratuvar deneyi üzerinden değerlendirilmemiştir. Bu bağlamda literatürde sadece 2012 yılında Reddy ve diğ. (2012) tarafından Hindistan'da çeşitli kirleticilerin baskısı altındaki Chambal Nehri'nde, farklı noktalardan farklı mevsimlerde örneklenen *Mystus tengara* türü balıkların sirküle nükleik asit kantitasyonuna dönük bir araştırma bulunabilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar kontrol istasyonundaki bireylerde diğer istasyonlara kıyasla daha düşük sirküle DNA, RNA ve sRNA (small RNA) düzeyleri saptamış ve bu düzeylerin mevsimsel olarak değişebildiğini ortaya koymuşlardır (Reddy ve diğ., 2012). Bu çalışmanın haricinde bu bağlamda başka araştırmaya rastlanılmamıştır.

Bununla beraber dolaşımdaki hücre serbest nükleik asit düzeylerinin mikropplastik ve cıva gibi organizma sağlığını tehdit edebilecek stresörlere karşı hassasiyet taşıma potansiyelleri mevcuttur. Memeli kan hücrelerinin tersine hemositler nükleus içeren hücrelerdir ve

dolayısıyla genetik materyali de ihtiva ederler. Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin ise nükleustan aktif bir şekilde salınım gösterdiği daha önce belirtilmiştir (Stroun ve diğ., 1977). Bu nedenle dolaşım sıvısında saptanan hücre serbest nükleik asitler bu şekilde kökenlenebilmektedir. Bununla birlikte cıva gibi ağır metallerin baskısı altında hemositlerin dinamizmi etkilenmekte ve total hemosit sayısında ve hücre yaşayabilirliğinde değişimler görülebilmektedir. Nitekim bu konuyla ilgili çalışmalara tartışmanın yukarıdaki kısımlarında değinilmiştir. Dolayısıyla hemosit yıkımı ve artan hücre ölümleri dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin kantitasyonuna etki eden faktörlerden bir diğeri olabilir. Ayrıca mikropplastik ve ağır metaller gibi çevresel stresörlerin baskısı sonucu apoptotik yollardaki genlerin ekspresyonlarında değişimler görüldüğü (Sokolova ve diğ., 2004) ve apoptoz süreçlerinin modüle olabildiği bilinmektedir (Châtel ve diğ., 2010; Gomes ve diğ., 2014). Ökaryotik canlılarda sirküle nükleik asitlerin artan hücre ölüm proseslerinden köken aldığı daha önce belirtilmiştir (Choi ve diğ., 2005). Bu nedenle dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin düzeylerindeki artış ya da azalışlar birçok metabolik yanıtın remodülasyonunu da beraberinde getirebilir.

Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin orjinlendiği bir diğeri yolak ise nekroz süreçleridir. Örneğin mikropplastik maruziyeti sonucu *Oryzias latipes* türü balıklarda hücresel nekroz görülmüş ve organizmalarda tümör ve hepatoselüler adenomaya rastlanılmıştır (Rochman ve diğ., 2013b). Mikropplastik maruziyeti invertebratlar üzerinde de benzer negatif etkilere sebep olmaktadır (Bråte ve diğ., 2018b) ve dolaşımdaki hücre serbest nükleik asit düzeylerinde bu durum sonucu değişimler belirebilir. Lipid peroksidasyonu gibi hücresel cevaplar ve oksidatif hasar farklı dokularda yıkımlara yol açabilmektedir. Nitekim cıva ve mikropplastik baskısı altında organizmalarda oksidatif hasar görülebildiği, organizmaların farklı dokularında ciddi patolojilerin meydana gelebileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Sheir ve diğ., 2010; Zhang ve diğ., 2016; Avio ve diğ., 2015; Bråte ve diğ., 2018b; Lei ve diğ., 2018). Nihayetinde dolaşımdaki hücre serbest nükleik asit konsantrasyonları doku yıkımlarına neden olan süreçlere cevap olarak da farklı seyirler gösterebilir (Lo ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2010).

Normalde organizma apoptoz süreçleri ile yaşlanan hücreleri ortadan kaldırır ve bir yandan da hücre bölünmesi devam etmektedir. Yaşlanan hücreler ve hücre fragmentleri fagositik aktivite ile yıkıma uğrar. Fagositoz organizmalarda en önemli immün cevaplardan biridir ve toksik maddelerin hücresel bütünlüğe dönük etkilerini anlamakta kullanılan en önemli

göstergelerdendir (Thiagarajan ve diğ., 2006). Mikroplastik baskısı birçok organizmada fagositik aktivede artışa ya da azalmalara neden olmaktadır. Örneğin *Arenicola marina* türü deniz solucanlarında PVC partiküllere maruziyet sonucu fagositik aktivitede önemli derecede azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Wright ve diğ., 2013b). Yine Paul-Pont ve diğ. (2016) tarafından yapılan çalışmada 7 gün PS partiküllere maruziyeti ve bunu takiben 7 gün atılım süreci sonunda *Mytilus* spp. üzerinde fagositik aktivitede önemli artış olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde cıva maruziyeti de fagositik aktivite üzerine etkilerde bulunmaktadır. Örneğin *Perna viridis* kabukluların Cu ve Hg'ye maruziyeti sonrasında fagositik aktivitede ciddi azalma gözlenmiştir (Thiagarajan ve diğ., 2006). Başka bir araştırmada *Scylla serrata* türü yengeçlerin hemositlerinde de cıva maruziyeti fagositik aktivitede önemli azalmalara sebep olmuştur (Singaram ve diğ., 2013). *Mya arenaria* türü kabuklularda da cıva maruziyeti sonucu fagositik aktivite üzerinde, kullanılan konsantrasyona ve zamana bağlı olarak önemli azalmalar gösterilmiştir (Fournier ve diğ., 2001). Benzer sonuçlar diğer metallerle maruziyet sonrasında da görülmektedir (Matozzo ve diğ., 2001; Rault ve diğ., 2013). Dolayısıyla dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitler fagositoz süreçlerinden köken almakta ve buna bağlı olarak dolaşım sıvısındaki düzeylerinde değişimler görülebileceği olasılığı söz konusu olmaktadır.

Dolaşım sıvısında bulunan miRNA'lar ekstraselüler veziküllerde paketlenmiş halde ya da kompleks moleküller halinde bulunurlar (Turchinovich ve diğ., 2013). Mollusklar özelinde her ne kadar miRNA biyogenezi birçok bilinmeyen içerse dahi miRNA'ların koordinasyonunda immünite, oksidatif stres, redoks fonksiyonları ve apoptoz gibi süreçleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin modüle olabildiği bilinmektedir (Rosani ve diğ., 2016). miRNA'ların çevresel stresörler altında biyogenezi ve toksisitelerine dönük çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte; gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışma konak-patojen etkileşimleri ve ksenobiyotiklerin baskısı altındaki canlılarda miRNA'ların düzenleyici rolünü doğrulamaktadır (Burgos-Aceves ve diğ., 2018; Martín-Gómez ve diğ., 2014). Örneğin *C. gigas* türü kabuklulara *Vibrio splendidus* enjekte edildiğinde, hemosit hücrelerinde invertebrat-spesifik bir gen olan *mir-2d* geni ifade artışı göstermiştir ve buna uyumlu bir şekilde hücre fagositoz oranları da yüksek seyretmiştir (Chen ve diğ., 2016a). *Apostichopus japonicus* türünde de immünolojik cevap olarak *mir-133* aracılığıyla TLR/MyD88/NF- κ B yolağının regüle olduğu rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2016b). *Ostrea edulis* türünde de *Bonamia ostreae* parazitiye maruziyeti takiben aralarında oksidatif hasar ve enflamasyonla

ilintili olduğu bilinen genler de dahi 63 miRNA farklı ekspresyon sergilemiştir (Martín-Gómez ve diğ., 2014). Bao ve diğ. (2014) ise *Tegillarca granosa* türü bivalvlerin hemositlerinde Cd maruziyetinin ardından miRNA ifade değişimlerinin kullanılan konsantrasyona bağlı gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. *Oncorhynchus mykiss* türü balıkta ise bir antideprasan olan fluoxetine maruziyetinin *let-7d*, *miR-140*, *miR-22b* gibi genlerin ifadelerinde önemli değişimlere neden olduğu gösterilmiştir (Karkache, 2014). Tang ve diğ. (2013) bir antioksidan olan E vitamini eksikliği sonucu juvenil *Oreochromis niloticus* türü balıklarda oksidatif stres ilintili *miR-223*, *miR-146a*, *miR-122* genlerinin aşağı regüle olduğunu ve sonuç olarak da balık karaciğerinde SOD aktivitesinin baskılandığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada ise miRNA karakterizasyonu yapılmamış sadece dolaşımdaki hücre serbest miRNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Ancak dolaşım sıvısında bulunan miRNA'lar stresör maruziyetindeki canlılarda çeşitli hücresel yollarda rol oynayan transkriptleri modüle edebilme potansiyeli taşıyabileceğinden ötürü düzeylerindeki artış ya da azalma organizma sağlığına dönük önemli bir biyobelirteç olarak kendini gösterebilir.

Yukarıda bahsedilen tüm önermelere rağmen bu çalışmadaki sonuçlara bakıldığında midye dolaşım sıvısındaki hücre serbest DNA, RNA, miRNA konsantrasyonları açısından deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Buna neden seçili maruziyet konsantrasyonları olabileceği gibi, söz konusu parametrelerde anlamlı bir değişim görülebilmesi açısından maruziyet süresinin kısalığı sayılabilir. Ayrıca söz konusu deney senaryoları ile maruziyete alınan manila kum midyelerinde oksidatif stres gibi organizmada metabolik depresyona yol açabilecek etkiler meydana gelmemiştir. Dolayısıyla dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin ekotoksikoloji çalışmaları dahilinde sucül canlılarda bir biyobelirteç teşkil edip edemeyeceğini söyleyebilmek için düşük ve yüksek stresör konsantrasyonları içeren deneylerin yanı sıra, diğer kirleticiler ve çeşitli model organizmaların kullanıldığı araştırmalara ve çevresel örnekler kullanarak gerçekleştirilen analizlere ihtiyaç vardır.

5.3. SONUÇ

Bu çalışma dahilinde *R. philippinarum* midyelerin görece çevresel konsantrasyonlarda mikropplastik ve cıvaya yalnız, birlikte ve inkübe şekilde farklı deney senaryoları ile maruz bırakılmasını takiben kirleticilerin alım düzeyleri ve biyodağılımının yanı sıra immünomodülasyona ve hücresel strese dönük etkiler çeşitli biyobelirteçler kullanılarak

mercek altına alınmış, histolojik değişimler incelenmiştir. Ek olarak dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin ekotoksikoloji çalışmalarında sucul canlılar üzerinde bir stresörlerden etkilenme göstergesi olabilme potansiyeli manila kum midyesi kullanılarak incelenmiştir.

Sonuçlara göre maruziyet sonrası organizmalarda gerek cıva gerekse de mikroplastiklerin birikim gösterdiği görülmüştür. Her iki stresör açısından da birlikte maruziyetin yalnız maruziyete kıyasla organizma üzerinde birikimlerini azalttığı saptanmıştır. Mikroplastikler açısından en yüksek birikim kalan dokular fraksiyonunda (mide, gonad, bağırsak vs.) saptanırken, cıva konsantrasyonları açısından bakıldığında ise tüm deney gruplarında en yüksek birikimin sırasıyla solungaç ve sindirim bezinde gerçekleştiği görülmüştür. Yine bir alım yolağı olarak mikroplastiklerin vektör potansiyellerini değerlendirmek üzere oluşturulan Inc deney grubunda; söz konusu konsantrasyonlarda PE yüzeylere 96 saat süresince adsorbe edilen cıvanın organizmaya taşındığı görülmüş ancak bu taşınımın sudan alıma kıyasla çok düşük düzeyde seyrettiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada midyeler laboratuvara getirilmeden önce de (bu esnada tüketime hazır durumda olduklarını belirtmek gerekir) çevresel mikroplastikleri bünyelerine alabildikleri görülmüş, her tekrarı 19 gün süren deney periyodunun midyelerin deney başlamadan önce ihtiva ettikleri birtakım mikroplastikleri bünyeden uzaklaştırmaya yetmeyebildiği belirlenmiştir. Bu nedenle gelecek çalışmaların daha uzun süren alıştırmaya periyodu ve daha fazla örneklem ile gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Çalışma kapsamında mikroplastik ve cıvaya maruziyet sonucu manila kum midyelerinin filtrasyon oranlarının kontrole kıyasla önemli şekilde düşüş gösterdiği görülmüştür. Ayrıca hemosit yaşayabilirliğinde de kontrole kıyasla diğer deney gruplarında anlamlı bir azalma saptanırken, dolaşımdaki total hemosit sayısı ve lizozomal membran stabilizasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dolayısıyla söz konusu konsantrasyonlarda stresörlere maruziyetin midyelerin immünomodülasyonuna etki edebildiği görülmüştür. Antioksidan batarya dahilinde ele alınan CAT aktivitesi, GSH ve MDA düzeylerine bakıldığında ise gerek solunum organı gerekse de sindirim bezi açısından deney grupları arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Solungaç ve sindirim bezi dokusunda histolojik etkilenmeler incelendiğinde her iki organda da çeşitli patolojiler gözlenmiştir. Meydana gelen bu histopatolojik etkilenmeler organizmaların kirletici alımlarına etki edebilme potansiyeli taşımanın yanı sıra ilgili organlarda fonksiyon kayıplarına neden olabilmektedir. Nitekim

solungaç dokusunda meydana gelen patolojiler sonucu filtrasyon oranları düşüş göstermiş ve bu da stresörlerin midyeler tarafından alımını negatif etkilemiş görünmektedir. Midye dolaşım sıvısı olan hemolenfde hücre serbest nükleik asitlerin (ccf-DNA, ccf-RNA, ccf-miRNA) kantitasyonları gerçekleştirilmiş ve deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dolaşımdaki hücre serbest nükleik asitlerin ekotoksikoloji çalışmalarında sucul canlılar için stresör baskısından etkilenmeye dönük bir biyobelirteç olup olamayacağını söyleyebilmek için farklı stresörleri de içeren çeşitli model organizmalar üzerinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Özetle, gerçekleştirilen çalışmayla birlikte sucul çevrede mevcut olan iki önemli kirletici cıva ve mikroplastiklerin, görece çevresel değerlerdeki seçili konsantrasyonlarda ve bir hafta süren maruziyetin ardından manila kum midyesi *R. philippinarum* üzerinde çeşitli toksik etkilere sebep olabileceği gösterilmiştir.

Gelecek çalışmalarda mikrofibril ve fragment gibi çevresel kompartımanlarda daha sık karşılaşılan mikroplastik tiplerinin kullanılması, daha uzun süren alıştırma periyodu ve daha uzun maruziyet sürelerinin uygulanması ve su ortamındaki diğer kirleticilerle kombinlenen deney senaryolarının hayata geçirilmesi mikroplastiklerin su ortamında diğer kirleticilerin biyotaya taşınımında vektör rollerinin aydınlatılması açısından gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Keshavarzi, B., Moore, F., Delshab, H., Soltani, N., & Sorooshian, A., 2017, Investigation of microrubbers, microplastics and heavy metals in street dust: a study in Bushehr city, Iran, *Environmental Earth Sciences*, 76(23), 798.
- Ackerman, J. T., Hartman, C. A., Eagles-Smith, C. A., Herzog, M. P., Davis, J., Ichikawa, G., & Bonnema, A., 2015, Estimating mercury exposure of piscivorous birds and sport fish using prey fish monitoring, *Environmental Science & Technology*, 49(22), 13596-13604.
- Adams, D. H., Diaz, N., & Gahan, P. B., 1997, In vitro stimulation by tumour cell media of [3H]-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes, *Cell Biochemistry and Function: Cellular Biochemistry and Its Modulation by Active Agents or Disease*, 15(2), 119-126.
- Ahmad, I., Coelho, J. P., Mohmood, I., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C., & Pereira, E., 2011a, Immunosuppression in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* environmentally exposed to mercury and association with its accumulation, *Chemosphere*, 82(11), 1541-1546.
- Ahmad, I., Mohmood, I., Mieiro, C. L., Coelho, J. P., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A., C. & Pereira, E., 2011b, Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—organ specificities and age effect, *Aquatic Toxicology*, 103(3-4), 150-158.
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., & Keshavarzi, B., 2018, Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in fish muscles from northeast of Persian Gulf, *Environmental Pollution*, 232, 154-163.
- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Jiménez, P. D., Simonneau, A., Binet, S. & Galop, D., 2019, Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment, *Nature Geoscience*, 12, 339-344.

- Al-Jaibachi, R., Cuthbert, R. N., & Callaghan, A., 2018, Up and away: ontogenic transference as a pathway for aerial dispersal of microplastics, *Biology Letters*, 14(9), 20180479.
- Anandraj, A., Marshall, D. J., Gregory, M. A., & McClurg, T. P., 2002, Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132(3), 355-363.
- Andrady, A. L., & Neal, M. A., 2009, Applications and societal benefits of plastics, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977-1984.
- Andrady, A. L., 2011, Microplastics in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Anker, P., Stroun, M., & Maurice, P. A., 1975, Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system., *Cancer Research*, 35(9), 2375-2382.
- Antonelis, K., Huppert, D., Velasquez, D., & June, J., 2011, Dungeness crab mortality due to lost traps and a cost–benefit analysis of trap removal in Washington State waters of the Salish Sea, *North American Journal of Fisheries Management*, 31(5), 880-893.
- Arias-Andres, M., Klümper, U., Rojas-Jimenez, K., & Grossart, H. P., 2018a, Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems, *Environmental Pollution*, 237, 253-261.
- Arias-Andres, M., Rojas-Jimenez, K., & Grossart, H. P., 2018b, Collateral effects of microplastic pollution on aquatic microorganisms: an ecological perspective, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 234-240.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H., 2017, Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions, *Environment International*, 102, 165-176.

- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L. & Regoli, F., 2015, Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels, *Environmental Pollution*, 198, 211-222.
- Aytan, U., Valente, A., Senturk, Y., Usta, R., Sahin, F. B. E., Mazlum, R. E., & Agirbas, E., 2016, First evaluation of neustonic microplastics in Black Sea waters, *Marine Environmental Research*, 119, 22-30.
- Bagheri, A. R., Laforsch, C., Greiner, A., & Agarwal, S., 2017, Fate of so-called biodegradable polymers in seawater and freshwater, *Global Challenges*, 1(4), 1700048.
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C., 2014, Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions, *Environmental Pollution*, 185, 16-23
- Balbi, T., Franzellitti, S., Fabbri, R., Montagna, M., Fabbri, E., & Canesi, L., 2016, Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects on gene transcription, *Environmental Pollution*, 218, 996-1004.
- Balbi, T., Camisassi, G., Montagna, M., Fabbri, R., Franzellitti, S., Carbone, C., Dawson, K. & Canesi, L., 2017, Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis*: Effects on shell formation, *Chemosphere*, 186, 1-9.
- Bancroft, J. D., Stevens, A., 1982, Theory and practice of histological techniques, 6th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Bao, Y., Zhang, L., Dong, Y., & Lin, Z., 2014, Identification and comparative analysis of the *Tegillarca granosa* haemocytes microRNA transcriptome in response to Cd using a deep sequencing approach, *PloS One*, 9(4), e93619.
- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., & Guilhermino, L., 2018a, Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time, *Environmental Pollution*, 236, 1014-1019.

- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., & Guilhermino, L., 2018b, Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), *Aquatic Toxicology*, 195, 49-57.
- Barboza, L. G. A., Vethaak, A. D., Lavorante, B. R., Lundebye, A. K., & Guilhermino, L., 2018c, Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health, *Marine Pollution Bulletin*, 133, 336-348.
- Barnes, D. K., 2002, Biodiversity: invasions by marine life on plastic debris, *Nature*, 416(6883), 808.
- Barnes, S. J., 2019, Understanding plastics pollution: The role of economic development and technological research, *Environmental Pollution*, 249, 812-821.
- Bartel, D. P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116(2), 281-297.
- Basu, N., Klenavic, K., Gamberg, M., O'Brien, M., Evans, D., Scheuhammer, A. M., & Chan, H. M., 2005a, Effects of mercury on neurochemical receptor-binding characteristics in wild mink, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(6), 1444-1450.
- Basu, N., Scheuhammer, A., Grochowina, N., Klenavic, K., Evans, D., O'Brien, M., & Chan, H. M., 2005b, Effects of mercury on neurochemical receptors in wild river otters (*Lontra canadensis*), *Environmental Science & Technology*, 39(10), 3585-3591.
- Basu, N., Scheuhammer, A. M., Sonne, C., Letcher, R. J., Born, E. W., & Dietz, R., 2009, Is dietary mercury of neurotoxicological concern to wild polar bears (*Ursus maritimus*)?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1), 133-140.
- Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., & Braunbeck, T., 2016, Transfer of benzo [a] pyrene from microplastics to *Artemia* nauplii and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1656-1666.

- Beauvais-Flück, R., Slaveykova, V. I., & Cosio, C., 2018, Effects of two-hour exposure to environmental and high concentrations of methylmercury on the transcriptome of the macrophyte *Elodea nuttallii*, *Aquatic Toxicology*, 194, 103-111.
- Beiras, R., & His, E., 1994, Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae, *Marine Ecology Progress Series*, 95-103.
- Beiras, R., & His, E., 1995, Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae, *Marine Ecology Progress Series*, 126, 185-189.
- Beiras, R., & Tato, T., 2019, Microplastics do not increase toxicity of a hydrophobic organic chemical to marine plankton, *Marine Pollution Bulletin*, 138, 58-62.
- Belivermiş, M., Kılıç, Ö., & Çotuk, Y., 2016, Assessment of metal concentrations in indigenous and caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*) on entire Turkish coastline, *Chemosphere*, 144, 1980-1987.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J., & Koelmans, A. A., 2012, Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.), *Environmental Science & Technology*, 47(1), 593-600.
- Beutler, E., 1975, *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 2nd ed., Grune&Stratton, New York, ISBN: 978-0808908616.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., & Schøyen, M., 2017, Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review, *Marine Environmental Research*, 130, 338-365.
- Bhagat, J., & Ingole, B. S., 2015, Genotoxic potency of mercuric chloride in gill cells of marine gastropod *Planaxis sulcatus* using comet assay, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10758-10768.

- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C., 2010, Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(39), 16556-16561.
- Bianchi, V. A., Langeloh, H., Tillmann, U., Krock, B., Müller, A., Bickmeyer, U., & Abele, D., 2019, Separate and combined effects of neurotoxic and lytic compounds of *Alexandrium* strains on *Mytilus edulis* feeding activity and hemocyte function, *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 414-422.
- Bigas, M., Amiard-Triquet, C., Durfort, M., & Poquet, M., 1997, Sublethal effects of experimental exposure to mercury in European flat oyster *Ostrea edulis*: Cell alterations and quantitative analysis of metal, *Biometals*, 10(4), 277-284.
- Bjørklund, G., Dadar, M., Mutter, J., & Aaseth, J., 2017, The toxicology of mercury: Current research and emerging trends, *Environmental Research*, 159, 545-554.
- Bond, A. L., Montevocchi, W. A., Guse, N., Regular, P. M., Garthe, S., & Rail, J. F., 2012, Prevalence and composition of fishing gear debris in the nests of northern gannets (*Morus bassanus*) are related to fishing effort, *Marine Pollution Bulletin*, 64(5), 907-911.
- Bollen, A., Wenke, A., & Biester, H., 2008, Mercury speciation analyses in HgCl₂-contaminated soils and groundwater—implications for risk assessment and remediation strategies, *Water Research*, 42(1-2), 91-100.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., & Viarengo, A., 1999, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(4), 287-292.
- Bouallegui, Y., Ben Younes, R., Turki, F., Mezni, A., & Oueslati, R., 2018, Effect of exposure time, particle size and uptake pathways in immune cell lysosomal cytotoxicity of mussels exposed to silver nanoparticles, *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 169-174.
- Boucher, J., & Friot, D., 2017, Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources, Gland, Switzerland: IUCN.

- Bour, A., Haarr, A., Keiter, S., & Hylland, K., 2018, Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves, *Environmental Pollution*, 236, 652-660.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bradley, M., Barst, B., & Basu, N., 2017, A review of mercury bioavailability in humans and fish, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(2), 169.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C., 2008, Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.), *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026-5031.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R., 2011, Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks, *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175-9179.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., & Canning-Clode, J., 2016, Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195.
- Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V., Steindal, C. C., Green, N., W., Olsen, M. & Lusher, A., 2018a, *Mytilus* spp. as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study, *Environmental Pollution*, 243, 383-393.
- Bråte, I. L. N., Blázquez, M., Brooks, S. J., & Thomas, K. V., 2018b, Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*), *Science of the Total Environment*, 626, 1310-1318.
- Burgos-Aceves, M. A., Cohen, A., Smith, Y., & Faggio, C., 2018, MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 995-1000.

- Bushati, N., & Cohen, S. M., 2007, microRNA functions, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 175-205.
- Cabecinhas, A. S., Novais, S. C., Santos, S. C., Rodrigues, A. C., Pestana, J. L., Soares, A. M., & Lemos, M. F., 2015, Sensitivity of the sea snail *Gibbula umbilicalis* to mercury exposure—Linking endpoints from different biological organization levels, *Chemosphere*, 119, 490-497.
- Caglar, O., & Cayir, A., 2018, Total circulating cell-free miRNA in plasma as a predictive biomarker of the thyroid diseases, *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(6), 9016-9022.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L. C., Betti, M., Gallo, G., Pojana, G., & Marcomini, A., 2007, Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(3), 464-472.
- Capolupo, M., Franzellitti, S., Valbonesi, P., Lanzas, C. S., & Fabbri, E., 2018, Uptake and transcriptional effects of polystyrene microplastics in larval stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Environmental Pollution*, 241, 1038-1047.
- Carpenter, E. J., & Smith, K. L., 1972, Plastics on the Sargasso Sea surface, *Science*, 175(4027), 1240-1241.
- Carson, H. S., Colbert, S. L., Kaylor, M. J., & McDermid, K. J., 2011, Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments, *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1708-1713.
- Carugo, O., & Argos, P., 1997, NADP-dependent enzymes. I: conserved stereochemistry of cofactor binding, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 28(1), 10-28.
- Catarino, A. I., Thompson, R., Sanderson, W., & Henry, T. B., 2017, Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 947-951.
- Catarino, A. I., Macchia, V., Sanderson, W. G., Thompson, R. C., & Henry, T. B., 2018, Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is

minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal, *Environmental Pollution*, 237, 675-684.

Celo, V., Lean, D. R., & Scott, S. L., 2006, Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment, *Science of the Total Environment*, 368(1), 126-137.

Chae, Y., Kim, D., Kim, S. W., & An, Y. J., 2018, Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain, *Scientific Reports*, 8(1), 284.

Chen, C. Y., Driscoll, C. T., Lambert, K. F., Mason, R. P., Rardin, L. R., Schmitt, C. V., Serrell, N., S., & Sunderland, E. M., 2012, Sources to Seafood: Mercury pollution in the marine environment, *Maine Sea Grant Publications*, 64.

Chen, H., Zhou, Z., Wang, H., Wang, L., Wang, W., Liu, R., Qui, L. & Song, L., 2016a, An invertebrate-specific and immune-responsive microRNA augments oyster haemocyte phagocytosis by targeting CgIkB2, *Scientific Reports*, 6, 29591.

Chen, H., Zhou, Z., Wang, L., Wang, H., Liu, R., Zhang, H., & Song, L., 2016b, An invertebrate-specific miRNA targeted the ancient cholinergic neuroendocrine system of oyster, *Open Biology*, 6(8), 160059.

Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., & Hollert, H., 2017, Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity, *Science of the Total Environment*, 584, 1022-1031.

Cheung, P. K., Cheung, L. T. O., & Fok, L., 2016, Seasonal variation in the abundance of marine plastic debris in the estuary of a subtropical macro-scale drainage basin in South China, *Science of the Total Environment*, 562, 658-665.

Choi, J. J., Reich III, C. F., & Pisetsky, D. S., 2005, The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells, *Immunology*, 115(1), 55-62.

- Choi, J. S., Jung, Y. J., Hong, N. H., Hong, S. H., & Park, J. W., 2018, Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), *Marine Pollution Bulletin*, 129(1), 231-240.
- Chua, E. M., Shimeta, J., Nuggeoda, D., Morrison, P. D., & Clarke, B. O., 2014, Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*, *Environmental Science & Technology*, 48(14), 8127-8134.
- Châtel, A., Hamer, B., Talarmin, H., Dorange, G., Schröder, H. C., & Müller, W. E., 2010, Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution, *Aquatic Toxicology*, 96(4), 247-255.
- Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., & Janssen, C. R., 2011, Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast, *Marine Pollution Bulletin*, 62(10), 2199-2204.
- Clifton II, J. C., 2007, Mercury exposure and public health, *Pediatric Clinics of North America*, 54(2), 237-e1.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S., 2011, Microplastics as contaminants in the marine environment: a review, *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S., 2013, Microplastic ingestion by zooplankton, *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6646-6655.
- Cole, M., & Galloway, T. S., 2015, Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae, *Environmental Science & Technology*, 49(24), 14625-14632.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., & Galloway, T. S., 2015, The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*, *Environmental Science & Technology*, 49(2), 1130-1137.
- Coles, J. A., Farley, S. R., & Pipe, R. K., 1995, Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium, *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(1), 59-65.

- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M. J., Cosson, R., Shillito, B., & Fiala-Medioni, A., 2004, Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*, *Marine Environmental Research*, 58(2-5), 377-381.
- Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A. M., Figueira, E., Pereira, E., & Freitas, R., 2017, Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios, *Science of the Total Environment*, 601, 1129-1138.
- Covelli, S., Protopsalti, I., Acquavita, A., Sperle, M., Bonardi, M., & Emili, A., 2012, Spatial variation, speciation and sedimentary records of mercury in the Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil), *Continental Shelf Research*, 35, 29-42.
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J. I., Ubeda, B., Gálvez, J. Á., Irigoien, X. & Duarte, C. M., 2015, Plastic accumulation in the Mediterranean Sea, *PLoS One*, 10(4), e0121762.
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., & Pinto, Y. M., 2012, Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?, *Circulation Research*, 110(3), 483-495.
- Dahlquist, A., Olsson, I, Norden, A., 1965, The periodate schiff reaction: specificity, kinetics and reaction products with pure substrate, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 13(6), 423-430.
- Dauvergne, P., 2018, The power of environmental norms: marine plastic pollution and the politics of microbeads, *Environmental Politics*, 27(4), 579-597.
- Davidson, K., & Dudas, S. E., 2016, Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(2), 147-156.
- Dawson, A. L., Kawaguchi, S., King, C. K., Townsend, K. A., King, R., Huston, W. M., & Nash, S. M. B., 2018, Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill, *Nature Communications*, 9(1), 1001.

- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H., 2017, Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure, *Scientific Reports*, 7, 46687.
- De Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, L., Pelletier, E., & Rouleau, C., 2002, Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*), *Environmental Research*, 90(3), 217-225.
- De Stephanis, R., Giménez, J., Carpinelli, E., Gutierrez-Exposito, C., & Cañadas, A., 2013, As main meal for sperm whales: Plastics debris, *Marine Pollution Bulletin*, 69(1-2), 206-214.
- De Sá, L. C., Luís, L. G., & Guilhermino, L., 2015, Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions, *Environmental Pollution*, 196, 359-362.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., & Robbens, J., 2014, Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types, *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 146-155.
- Dietz, R., Outridge, P.M., Hobson, K.A., 2009, Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals — a review, *Science of the Total Environment*, 407(24), 6120-6131.
- Do Sul, J. A. I., Santos, I. R., Friedrich, A. C., Matthiensen, A., & Fillmann, G., 2011, Plastic pollution at a sea turtle conservation area in NE Brazil: contrasting developed and undeveloped beaches, *Estuaries and Coasts*, 34(4), 814-823.
- Do Sul, J. A. I., & Costa, M. F., 2014, The present and future of microplastic pollution in the marine environment, *Environmental Pollution*, 185, 352-364.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K. S., & Soudant, P., 2009, Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects, *Aquaculture*, 297(1-4), 10-24.

- Dos Santos, A. A., Hort, M. A., Culbreth, M., López-Granero, C., Farina, M., Rocha, J. B., & Aschner, M., 2016, Methylmercury and brain development: A review of recent literature, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 99-107.
- Dreiem, A., & Seegal, R. F., 2007, Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent, *Neurotoxicology*, 28(4), 720-726.
- Drevnick, P. E., & Sandheinrich, M. B., 2003, Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows, *Environmental Science & Technology*, 37(19), 4390-4396.
- Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., & Tassin, B., 2017, A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments, *Environmental Pollution*, 221, 453-458.
- Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N., 2013, Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects, *Environmental Science & Technology*, 47(10), 4967-4983.
- Duchemin, M. B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., & Fournier, M., 2008, Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures, *Environmental Pollution*, 153(2), 416-423.
- Duncombe, J., 2018, Microplastics found in human stool, *Eos*, 99, <https://doi.org/10.1029/2018EO108373>. [Ziyaret tarihi: 25 Kasım 2018].
- Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C., 2017, Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Molluscan Studies*, 83(2), 220-225.
- Eagles-Smith, C. A., Silbergeld, E. K., Basu, N., Bustamante, P., Diaz-Barriga, F., Hopkins, W. A., Kidd, K. A. & Nyland, J. F., 2018, Modulators of mercury risk to wildlife and humans in the context of rapid global change, *Ambio*, 47(2), 170-197.

- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., & Nielsen, T. G., 2015, Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution, *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 70-81.
- Engel, F. G., Alegria, J., Andriana, R., Donadi, S., Gusmao, J. B., van Leeuwe, M. A., Matthiessen, B., & Eriksson, B. K., 2017, Mussel beds are biological power stations on intertidal flats, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 191, 21-27.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P., G. & Reisser, J., 2014, Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea, *PloS One*, 9(12), e111913.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010, Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, *EFSA J.*, 10, 2985-3225.
- EU, 2008, Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Retrieved August 15, 2014, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:164:0019:0040:EN:PDF> [Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 2019].
- Everaert, G., Van Cauwenberghe, L., De Rijcke, M., Koelmans, A. A., Mees, J., Vandegehuchte, M., & Janssen, C. R., 2018, Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions, *Environmental Pollution*, 242, 1930-1938.
- e Silva, P. P. G., Nobre, C. R., Resaffe, P., Pereira, C. D. S., & Gusmão, F., 2016, Leachate from microplastics impairs larval development in brown mussels, *Water Research*, 106, 364-370.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., & Wood, W., 2007, Framework for metals risk assessment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2), 145-227.
- FAO, 2012. Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department, 2012. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2010. FAO, Rome.

- FAO, 2013. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 76.
- Farina, M., Frizzo, M. E., Soares, F. A., Schwalm, F. D., Dietrich, M. O., Zeni, G., Rocha, J., B. T. & Souza, D. O., 2003, Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice, *Toxicology Letters*, 144(3), 351-357.
- Farrell, P., & Nelson, K., 2013, Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.), *Environmental Pollution*, 177, 1-3.
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A., 2009, Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers, *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1225-1228.
- Fernández B., Morante, M., Garrido, S., Rivera-Hernández, J. R., Santos-Echeandia, J., & Albentosa, M., 2018, Uptake and distribution of mercury in tissues of mussels exposed to metal-loaded microplastics. XIX Iberian Marine Chemistry Seminary (SIQUIMAR), Vigo (Spain) 20-22th June 2018.
- Ferrat, L., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., & Pergent-Martini, C., 2002, Effects of mercury on antioxidant mechanisms in the marine phanerogam *Posidonia oceanica*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(2), 157-160.
- Ferreira, G. V., Barletta, M., & Lima, A. R., 2019, Use of estuarine resources by top predator fishes. How do ecological patterns affect rates of contamination by microplastics? *Science of the Total Environment*, 655, 292-304.
- Figueira, E., Lima, A., Branco, D., Quintino, V., Rodrigues, A. M., & Freitas, R., 2011, Health concerns of consuming cockles (*Cerastoderma edule* L.) from a low contaminated coastal system, *Environment International*, 37(5), 965-972.
- Figueira, E., & Freitas, R., 2013, Consumption of *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*: comparison of element accumulation and health risk, *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5682-5691.

- Fitzer, S. C., Torres Gabarda, S., Daly, L., Hughes, B., Dove, M., O'Connor, W., O'Connor, W., Potts, J., Scanes, P. & Byrne, M., 2018, Coastal acidification impacts on shell mineral structure of bivalve mollusks, *Ecology and Evolution*, 8(17), 8973-8984.
- Foekema, E. M., De Gruijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., & Koelmans, A. A., 2013, Plastic in north sea fish, *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818-8824.
- Fonte, E., Ferreira, P., & Guilhermino, L., 2016, Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation, *Aquatic Toxicology*, 180, 173-185.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., & Brousseau, P., 2001, Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes, *Toxicology*, 161(3), 201-211.
- Frias, J. P. G. L., & Nash, R., 2019, Microplastics: Finding a consensus on the definition, *Marine Pollution Bulletin*, 138, 145-147.
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J., Bezdan, D., Báñez-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., Gozalez, J., Chen, K. C., LeProust, E. M., Martí, E., & Estivill, X., 2014, Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs, *Genome Biology*, 15(4), R57.
- Frydkjær, C. K., Iversen, N., & Roslev, P., 2017, Ingestion and egestion of microplastics by the cladoceran *Daphnia magna*: effects of regular and irregular shaped plastic and sorbed phenanthrene, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(6), 655-661.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., & Renault, T., 2004, In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes, *Fish & Shellfish Immunology*, 16(4), 501-512.

- Gago, J., Carretero, O., Filgueiras, A. V., & Viñas, L., 2018, Synthetic microfibers in the marine environment: A review on their occurrence in seawater and sediments, *Marine Pollution Bulletin*, 127, 365-376.
- Galgani, F., Hanke, G., & Maes, T., 2015, *Global distribution, composition and abundance of marine litter*, In Marine anthropogenic litter, Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Springer, Cham, ISBN: 978-3-319-16509-7, pp. 29-56.
- Gambardella, C., Morgana, S., Bramini, M., Rotini, A., Manfra, L., Migliore, L., Piazza, V., Garaventa, F. & Faimali, M., 2018, Ecotoxicological effects of polystyrene microbeads in a battery of marine organisms belonging to different trophic levels, *Marine Environmental Research*, 141, 313-321.
- Gammon, D. B., & Mello, C. C., 2015, RNA interference-mediated antiviral defense in insects, *Current Opinion in Insect Science*, 8, 111-120.
- Gardon, T., Reisser, C., Soye, C., Quillien, V., & Le Moullac, G., 2018, Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*, *Environmental Science & Technology*, 52(9), 5277-5286.
- Gaspar, T. R., Chi, R. J., Parrow, M. W., & Ringwood, A. H., 2018, Cellular bioreactivity of micro-and nano-plastic particles in oysters, *Frontiers in Marine Science*, 5, 345.
- Geret, F., & Cosson, R. P., 2002, Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(1), 36-42.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L., 2017, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., & Dezfili, B. S., 2008, Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 400-410.

- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, Z., Hod, M., Goren, Y., Bentwich, Z., 2008, Serum microRNAs are promising novel biomarkers, *PloS One*, 3(9), e3148.
- Goldstein, M. C., Carson, H. S., & Eriksen, M., 2014, Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities, *Marine Biology*, 161(6), 1441-1453.
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C., & Bebianno, M. J., 2014, Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery, *Aquatic Toxicology*, 155, 327-336.
- Gomiero, A., Strafella, P., Pellini, G., Salvalaggio, V., & Fabi, G., 2018, Comparative Effects of Ingested PVC Micro Particles With and Without Adsorbed Benzo (a) pyrene vs. Spiked Sediments on the Cellular and Sub Cellular Processes of the Benthic Organism *Hediste diversicolor*, *Frontiers in Marine Science*, 5, 99.
- Gonçalves, C., Martins, M., Sobral, P., Costa, P. M., & Costa, M. H., 2019, An assessment of the ability to ingest and excrete microplastics by filter-feeders: A case study with the Mediterranean mussel, *Environmental Pollution*, 245, 600-606.
- González-Fernández, C., Tallec, K., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Squet, M., Berchel, M. & Paul-Pont, I., 2018, Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles, *Chemosphere*, 208, 764-772.
- Gorokhova, E., 2015, Screening for microplastic particles in plankton samples: how to integrate marine litter assessment into existing monitoring programs?, *Marine Pollution Bulletin*, 99(1-2), 271-275.
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., & Hodges, G., 2011, A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic, *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1466-1472.

- Graca, B., Bełdowska, M., Wrzesień, P., & Zgrundo, A., 2014, Styrofoam debris as a potential carrier of mercury within ecosystems, *Environmental Science and Pollution Research*, 21(3), 2263-2271.
- Gray, A. D., & Weinstein, J. E., 2017, Size-and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), 3074-3080.
- Green, D. S., 2016, Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities, *Environmental Pollution*, 216, 95-103.
- Green, D. S., Colgan, T. J., Thompson, R. C., & Carolan, J. C., 2019, Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*), *Environmental Pollution*, 246, 423-434.
- Gregory, M. A., George, R. C., Marshall, D. J., Anandraj, A., & McClurg, T. P., 1999, The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia), *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), 116-121.
- Guay, C., & Regazzi, R., 2013, Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus, *Nature Reviews Endocrinology*, 9(9), 513.
- Guilherme, S., Válega, M., Pereira, M. E., Santos, M. A., & Pacheco, M., 2008, Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure—Relationship with mercury accumulation and implications for public health, *Marine Pollution Bulletin*, 56(5), 845-859.
- Guilhermino, L., Vieira, L. R., Ribeiro, D., Tavares, A. S., Cardoso, V., Alves, A., & Almeida, J. M., 2018, Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*, *Science of the Total Environment*, 622, 1131-1142.
- Gündoğdu, S., Yeşilyurt, İ. N., & Erbaş, C., 2019, Potential interaction between plastic litter and green turtle *Chelonia mydas* during nesting in an extremely polluted beach, *Marine Pollution Bulletin*, 140, 138-145.

- Güven, O., Gökdağ, K., Jovanović, B., & Kıdeys, A. E., 2017, Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish, *Environmental Pollution*, 223, 286-294.
- Güven, O., Bach, L., Munk, P., Dinh, K. V., Mariani, P., & Nielsen, T. G., 2018, Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*), *Aquatic Toxicology*, 198, 287-293.
- Heinz, G. H., Hoffman, D. J., Klimstra, J. D., Stebbins, K. R., Kondrad, S. L., & Erwin, C. A., 2009, Species differences in the sensitivity of avian embryos to methylmercury, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(1), 129-138.
- Hertika, A. M. S., Kusriani, K., Indrayani, E., Nurdiani, R., & Putra, R. B., 2018, Relationship between levels of the heavy metals lead, cadmium and mercury, and metallothionein in the gills and stomach of *Crassostrea iredalei* and *Crassostrea glomerata*, *F1000Research*, 7.
- Heskett, M., Takada, H., Yamashita, R., Yuyama, M., Ito, M., Geok, Y. B., Ogata, Y., Kwan, C., Heckhausen, A., Taylor, H., Powell, T., Morishige, C., Young, D., Patterson, H., Robertson, B., Bailey, E., Mermoz, J., 2012, Measurement of persistent organic pollutants (POPs) in plastic resin pellets from remote islands: Toward establishment of background concentrations for International Pellet Watch, *Marine Pollution Bulletin*, 64(2), 445-448.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M., 2012, Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification, *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060-3075.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J. C., Molina, J. A., Esbrí, J. M., & Lorenzo, S., 2006, The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites, *Science of the Total Environment*, 356(1-3), 112-124.
- Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Kwan, C., Moore, C., Gray, H., Laursen, D., Zettler, E. R., Farrington J. W., Reddy, C. M., Peacock, E. E.,

- Ward, M. W., 2011, Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches, *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1683-1692.
- Holmes, L. A., Turner, A., & Thompson, R. C., 2012, Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment, *Environmental Pollution*, 160, 42-48.
- Holmes, L. A., Turner, A., & Thompson, R. C., 2014, Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions, *Marine Chemistry*, 167, 25-32.
- Hong, H. K., Donaghy, L., Kang, C. K., Kang, H. S., Lee, H. J., Park, H. S., & Choi, K. S., 2016, Substantial changes in hemocyte parameters of Manila clam *Ruditapes philippinarum* two years after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea, *Marine Pollution Bulletin*, 108(1-2), 171-179.
- Humanson, G.L., 1972, *Animal tissue techniques*, H.W. Freeman and Company, San Francisco, ISBN: 61-17383.
- Jabeen, K., Li, B., Chen, Q., Su, L., Wu, C., Hollert, H., & Shi, H., 2018, Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*), *Chemosphere*, 213, 323-332.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., & Knippers, R., 2001, DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, *Cancer Research*, 61(4), 1659-1665.
- Jakka, N. M., Gnaneshwar Rao, T., & Venkateswara Rao, J., 2007, Locomotor behavioral response of mosquitofish (*Gambusia affinis*) to subacute mercury stress monitored by video tracking system, *Drug and Chemical Toxicology*, 30(4), 383-397.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. & Law, K. L., 2015, Plastic waste inputs from land into the ocean, *Science*, 347(6223), 768-771.
- Jang, M., Shim, W. J., Han, G. M., Rani, M., Song, Y. K., & Hong, S. H., 2016, Styrofoam debris as a source of hazardous additives for marine organisms, *Environmental Science & Technology*, 50(10), 4951-4960.

- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., & Sepčić, K., 2010, Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species, *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 571-581.
- Jeong, C. B., Won, E. J., Kang, H. M., Lee, M. C., Hwang, D. S., Hwang, U. K., Zhou, B., Souissi S., Lee, S-J. & Lee, J. S., 2016, Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*), *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8849-8857.
- Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., Souissi, S., Lee, S-J., Shin, K-H., Park, H. G. & Lee, J. S., 2017, Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopina nana*, *Scientific Reports*, 7, 41323.
- Ji, C., Wu, H., Zhou, M., & Zhao, J., 2015, Multiple biomarkers of biological effects induced by cadmium in clam *Ruditapes philippinarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2), 430-435.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z., 2018, Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish, *Environmental Pollution*, 235, 322-329.
- Johansen, M. P., Prentice, E., Cresswell, T., & Howell, N., 2018, Initial data on adsorption of Cs and Sr to the surfaces of microplastics with biofilm, *Journal of Environmental Radioactivity*, 190, 130-133.
- Jovanović, B., Gökdağ, K., Güven, O., Emre, Y., Whitley, E. M., & Kideys, A. E., 2018, Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure, *Marine Pollution Bulletin*, 130, 123-131.
- Karakolis, E. G., Nguyen, B., You, J. B., Graham, P. J., Rochman, C. M., & Sinton, D., 2018, Digestible fluorescent coatings for cumulative quantification of microplastic ingestion, *Environmental Science & Technology Letters*, 5(2), 62-67.

- Karami, A., 2017, Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics, *Chemosphere*, 184, 841-848.
- Karkache, W., 2014, Impact of fluoxetine exposure on microRNA expression on primary cultured hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- Katija, K., Choy, C. A., Sherlock, R. E., Sherman, A. D., & Robison, B. H., 2017, From the surface to the seafloor: How giant larvaceans transport microplastics into the deep sea, *Science Advances*, 3(8), e1700715.
- Kedzierski, M., D'Almeida, M., Magueresse, A., Le Grand, A., Duval, H., César, G., Sire, O., Brazaud, S. & Le Tilly, V., 2018, Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants, *Marine Pollution Bulletin*, 127, 684-694.
- Keleştemur, G. T., & Özdemir, Y., 2011, Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 69-73.
- Khan, F. R., Syberg, K., Shashoua, Y., & Bury, N. R., 2015, Influence of polyethylene microplastic beads on the uptake and localization of silver in zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Pollution*, 206, 73-79.
- Khan, F. R., 2018, Ecotoxicology in the Anthropocene: Are We Listening to Nature's Scream?, *Environmental Science & Technology*, 52, 18, 10227-10229.
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A., 2016, A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts, *Journal of Hazardous Materials*, 306, 376-385.
- Kirstein, I. V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., & Gerdt, G., 2016, Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles, *Marine Environmental Research*, 120, 1-8.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J., 2015, *Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review*, In Marine anthropogenic litter, Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Springer, Cham, ISBN: 978-3-319-16509-7, pp. 325-340.

- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., & Shi, H., 2018, Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion, *Science of The Total Environment*, 610, 635-640.
- Kotnik, J., Sprovieri, F., Ogrinc, N., Horvat, M., & Pirrone, N., 2014, Mercury in the Mediterranean, part I: spatial and temporal trends, *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4063-4080.
- Kühn, S., Rebolledo, E. L. B., & van Franeker, J. A., 2015, *Deleterious effects of litter on marine life*, In Marine anthropogenic litter, Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Springer, Cham, ISBN: 978-3-319-16509-7, pp. 75-116.
- Lacoue-Labarthe, T., Nunes, P. A., Ziveri, P., Cinar, M., Gazeau, F., Hall-Spencer, J. M., Hilmi, N., Moschella, P., Safa, A., Sauzade, D. & Turley, C., 2016, Impacts of ocean acidification in a warming Mediterranean Sea: An overview, *Regional Studies in Marine Science*, 5, 1-11.
- Ladhar-Chaabouni, R., Machreki-Ajmi, M., Serpentine, A., Lebel, J. M., & Hamza-Chaffai, A., 2015, Does a short-term exposure to cadmium chloride affects haemocyte parameters of the marine gastropod *Haliotis tuberculata*? *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17343-17349.
- Laganà, P., Caruso, G., Corsi, I., Bergami, E., Venuti, V., Majolino, D., La Ferla, R., Azzaro, M., & Cappello, S., 2019, Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica), *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(1), 89-100.
- Laktionov, P. P., Tamkovich, S. N., Rykova, E. Y., Bryzgunova, O. E., Starikov, A. V., Kuznetsova, N. P., & Vlassov, V. V., 2004, Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1022(1), 221-227.

- Lamb, J. B., Willis, B. L., Fiorenza, E. A., Couch, C. S., Howard, R., Rader, D. N., True, J. D., Kelly, L. A., Ahmad, A., Jompa, J. & Harvell, C. D., 2018, Plastic waste associated with disease on coral reefs, *Science*, 359(6374), 460-462.
- Landis W, Yu M-H. Introduction to environmental toxicology Impacts of chemicals upon ecological systems. 2nd ed. Washington7 Lewis Publishers; 1999. 390 pp.
- Lattin, G. L., Moore, C. J., Zellers, A. F., Moore, S. L., & Weisberg, S. B., 2004, A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore, *Marine Pollution Bulletin*, 49(4), 291-294.
- Le, T. Y., Zimmermann, S., & Sures, B., 2016, How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure?, *Environmental Pollution*, 212, 257-268.
- Lebreton, L. C., Van der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J., 2017, River plastic emissions to the world's oceans, *Nature Communications*, 8, 15611.
- Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M. & Schludermann, E., 2014, The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river, *Environmental Pollution*, 188, 177-181.
- Lee, H., Shim, W. J., & Kwon, J. H., 2014, Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals, *Science of the Total Environment*, 470, 1545-1552.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K. M. & He, D., 2018, Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*, *Science of the Total Environment*, 619, 1-8.
- Leipe, T., Moros, M., Kotilainen, A., Vallius, H., Kabel, K., Endler, M., & Kowalski, N., 2013, Mercury in Baltic Sea sediments—natural background and anthropogenic impact, *Chemie der Erde-Geochemistry*, 73(3), 249-259.

- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J., 1977, Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy, *Cancer Research*, 37(3), 646-650.
- Leung, J., & Chan, K. Y. K., 2018, Microplastics reduced posterior segment regeneration rate of the polychaete *Perinereis aibuhitensis*, *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 782-786.
- Lichtenstein, A. V., Melkonyan, H. S., Tomei, L. D., & Umansky, S. R., 2001, Circulating nucleic acids and apoptosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 239-249.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., & Shi, H., 2015, Microplastics in commercial bivalves from China, *Environmental Pollution*, 207, 190-195.
- Li, J., Zhang, K., & Zhang, H., 2018a, Adsorption of antibiotics on microplastics, *Environmental Pollution*, 237, 460-467.
- Li, J., Lusher, A., Rotchell, J. M., Company, S. D., Turra, A., Bråte, I. L. N., Sun, C., Hossain, M. S., Li, Q., Kolandhasamy, P. & Shi, H., 2018b, Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution, *Environmental Pollution*, 244, 522-533.
- Lo, Y. D., Rainer, T. H., Chan, L. Y., Hjelm, N. M., & Cocks, R. A., 2000, Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients, *Clinical Chemistry*, 46(3), 319-323.
- Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L., & Calder, F. D., 1995, Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments, *Environmental Management*, 19(1), 81-97.
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., & Soudant, P., 2015, Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates, *Marine Chemistry*, 175, 39-46.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V. J., & Ferrero, E. A., 2001, Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*, *Fish & Shellfish Immunology*, 11(6), 459-472.
- Lönnstedt, O. M., & Eklöv, P., 2016, Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology, *Science*, 352(6290), 1213-1216.

- Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y., 2018, Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 202, 514-520.
- Lund, B. O., Miller, D. M., & Woods, J. S., 1993, Studies on Hg (II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria, *Biochemical Pharmacology*, 45(10), 2017-2024.
- Lusher, A. L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., & Officer, R., 2015, Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: the True's beaked whale *Mesoplodon mirus*, *Environmental Pollution*, 199, 185-191.
- Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J., 2017a, Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, (615), ISBN: 978-92-5-109882-0.
- Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., & Cole, M., 2017b, Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates, *Analytical Methods*, 9(9), 1346-1360.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A., 2007, Lysosomes: fusion and function, *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 622.
- Luís, L. G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M., & Guilhermino, L., 2015, Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations, *Aquatic Toxicology*, 164, 163-174.
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., & Ji, R., 2016, Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water, *Environmental Pollution*, 219, 166-173.
- Macali, A., Semenov, A., Venuti, V., Crupi, V., D'Amico, F., Rossi, B., Corsi, I. & Bergami, E., 2018, Episodic records of jellyfish ingestion of plastic items reveal a novel pathway for trophic transference of marine litter, *Scientific Reports*, 8(1), 6105.

- Macirella, R., & Brunelli, E., 2017, Morphofunctional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*) Gills after Exposure to Mercury Chloride, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 824.
- Magni, S., Gagné, F., André, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C. C., Bonasoro, F. & Binelli, A., 2018, Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia), *Science of the Total Environment*, 631, 778-788.
- Mandel P, Metais P., 1948, Les Acides Nucleic Du Plasma Sanguin Chez L'Homme. *C R Acad Sci Paris*, 142: 241-243.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Kerkhoven, R. H., & Abollo, E., 2014, Role of microRNAs in the immunity process of the flat oyster *Ostrea edulis* against bonamiosis, *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 40-50.
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D., 2015, Lysosomal membrane stability in mussels, *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 56. 41 pp.
- Maršić-Lučić, J., Lušić, J., Tutman, P., Varezić, D. B., Šiljić, J., & Pribudić, J., 2018, Levels of trace metals on microplastic particles in beach sediments of the island of Vis, Adriatic Sea, Croatia, *Marine Pollution Bulletin*, 137, 231-236.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T., 2001, Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment, *Environmental Science & Technology*, 35(2), 318-324.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. M., & Marin, M. G., 2001, Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 163-170.
- Matozzo, V., Devoti, A. C., & Marin, M. G., 2012a, Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*, *Ecotoxicology*, 21(1), 66-74.

- Matozzo, V., Rova, S., & Marin, M. G., 2012b, The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, 79, 116-121.
- Messinetti, S., Mercurio, S., Parolini, M., Sugni, M., & Pennati, R., 2018, Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies, *Environmental Pollution*, 237, 1080-1087.
- Metian, M., Warnau, M., Cosson, R. P., Oberhänsli, F., & Bustamante, P., 2008, Bioaccumulation and detoxification processes of Hg in the king scallop *Pecten maximus*: field and laboratory investigations, *Aquatic Toxicology*, 90(3), 204-213.
- Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F., & Da Ros, L., 2011, Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice, *Environmental Monitoring and Assessment*, 177(1-4), 649-663.
- Monteiro, D. A., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L., 2010, Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829), *Ecotoxicology*, 19(1), 105.
- Munari, M., Matozzo, V., & Marin, M. G., 2011, Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 30(4-5), 1024-1030.
- Munro, I. C., Nera, E. A., Charbonneau, S. M., Junkins, B., & Zawidzka, Z., 1980, Chronic toxicity of methylmercury in the rat, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 3(5-6), 437-447.
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., & Quinn, B., 2016, Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment, *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5800-5808.
- Nel, H. A., & Froneman, P. W., 2015, A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa, *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 274-279.

- Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., & Lindeque, P. K., 2018, Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators, *Environmental Pollution*, 238, 999-1007.
- Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Galloway, T. S., Lindeque, P. K., Santillo, D. & Godley, B. J., 2019, Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Scientific Reports*, 9(1), 1075.
- Nieuwhof, S., Herman, P. M., Dankers, N., Troost, K., & Van Der Wal, D., 2015, Remote sensing of epibenthic shellfish using synthetic aperture radar satellite imagery, *Remote Sensing*, 7(4), 3710-3734.
- Nizzetto, L., Futter, M., & Langaas, S., 2016, Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin? *Environmental Science & Technology*, 50, 20, 10777-10779.
- Novelli, A. A., Losso, C., Ghetti, P. F., & Ghirardini, A. V., 2003, Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6), 1295-1301.
- Nuelle, M. T., Dekiff, J. H., Remy, D., & Fries, E., 2014, A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments, *Environmental Pollution*, 184, 161-169.
- Obbard, R. W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., & Thompson, R. C., 2014, Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice, *Earth's Future*, 2(6), 315-320.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J. W. & Tyler, C. R., 2009, A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2047-2062.
- Okubo, N., Takahashi, S., & Nakano, Y., 2018, Microplastics disturb the anthozoan-algae symbiotic relationship, *Marine Pollution Bulletin*, 135, 83-89.

- Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., & Guilhermino, L., 2013, Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae), *Ecological indicators*, 34, 641-647.
- Oliveira, P., Lopes-Lima, M., Machado, J., & Guilhermino, L., 2015, Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (*Corbicula fluminea*) bivalves to mercury, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 167, 191-198.
- Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L., 2018a, Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 155-163.
- Oliveira, P., LÍrio, A. V., Canhoto, C., & Guilhermino, L., 2018b, Toxicity of mercury and post-exposure recovery in *Corbicula fluminea*: Neurotoxicity, oxidative stress and oxygen consumption, *Ecological Indicators*, 91, 503-510.
- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D., 2010, Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system, *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 111.
- O'Connor, T. P., 1998, Mussel Watch results from 1986 to 1996, *Marine Pollution Bulletin*, 37(1-2), 14-19.
- O'Donovan, S., Mestre, N. C., Abel, S., Fonseca, T. G., Carteny, C. C., Cormier, B., Keiter, S. H. & Bebianno, M., 2018, Ecotoxicological effects of chemical contaminants adsorbed to microplastics in the clam *Scrobicularia plana*, *Frontiers in Marine Science*, 5, 143.
- Pacyna, E. G., Pacyna, J. M., 2002, Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995, *Water, Air and Soil Pollution*, 137, 149-165.
- Pan, K., & Wang, W. X., 2011, Mercury accumulation in marine bivalves: influences of biodynamics and feeding niche, *Environmental Pollution*, 159(10), 2500-2506.

- Parisi, M. G., Mauro, M., Sarà, G., & Cammarata, M., 2017, Temperature increases, hypoxia, and changes in food availability affect immunological biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Comparative Physiology B*, 187(8), 1117-1126.
- Park, J. D., & Zheng, W., 2012, Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury, *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 45(6), 344.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C. G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère L., Cassone, A-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., & Guyomarch, J., 2016, Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation, *Environmental Pollution*, 216, 724-737.
- Peng, G., Xu, P., Zhu, B., Bai, M., & Li, D., 2018, Microplastics in freshwater river sediments in Shanghai, China: a case study of risk assessment in mega-cities, *Environmental Pollution*, 234, 448-456.
- Perez-Venegas, D., Pavés, H., Pulgar, J., Ahrendt, C., Seguel, M., & Galbán-Malagón, C. J., 2017, Coastal debris survey in a Remote Island of the Chilean Northern Patagonia, *Marine Pollution Bulletin*, 125(1-2), 530-534.
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., & Lagarde, F., 2016, Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments?, *Environmental Pollution*, 211, 111-123.
- Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., & Zalouk-Vergnoux, A., 2018, Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life?, *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 664-674.
- Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E. D. & Di Giulio, R. T., 2018, Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 194, 185-194.

- Pittura, L., Avio, C. G., Giuliani, M. E., d'Errico, G., Keiter, S. H., Cormier, B., Gorbi, S. & Regoli, F., 2018, Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: Combined Chemical and Physical Hazards to the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis*, *Frontiers in Marine Science*, 5, 103.
- PlasticsEurope, 2006–2018. The Compelling Facts About Plastics: An Analysis of Plastic Production, Demand and Recovery in Europe. PlasticsEurope.
- PlasticsEurope. 2016. *Plastics – the Facts 2016*. An analysis of European plastics production, demand and waste data. www.plasticseurope.org, [Ziyaret tarihi: 15 Mayıs 2019].
- Plot, V., & Georges, J. Y., 2010, Plastic debris in a nesting leatherback turtle in French Guiana, *Chelonian Conservation and Biology*, 9(2), 267-270.
- Porter, A., Lyons, B. P., Galloway, T. S., & Lewis, C. N., 2018, The role of marine snows in microplastic fate and bioavailability, *Environmental Science & Technology*, 52(12), 7111-7119.
- Prata, J. C., 2018, Airborne microplastics: Consequences to human health?, *Environmental Pollution*, 234, 115-126.
- Prato, E., & Biandolino, F., 2007, Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the *Mytilus galloprovincialis*, *Environmental Technology*, 28(8), 915-920.
- Procter, J., Hopkins, F. E., Fileman, E. S., & Lindeque, P. K., 2019, Smells good enough to eat: Dimethyl sulfide (DMS) enhances copepod ingestion of microplastics, *Marine Pollution Bulletin*, 138, 1-6.
- Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., & Shi, H., 2018, Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels, *Science of the Total Environment*, 621, 679-686.
- Rainer, T. H., Wong, L. K., Lam, W., Yuen, E., Lam, N. Y., Metreweli, C., & Lo, Y. D., 2003, Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke, *Clinical Chemistry*, 49(4), 562-569.

- Rault, P., Fortier, M., Pédelucq, J., Lacaze, E., Brousseau, P., Auffret, M., & Fournier, M., 2013, Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis*: in vitro exposure of hemocytes, *Journal of Xenobiotics*, e8-e8.
- Reddy, P. B., Ishaque, S., & Subhashini, V. 2012, Plasma circulating nucleic acids (CNAs) of fish as potential biomarker of toxicity, *Trends in Biotechnology Research*, 1(2).
- Regoli, F., & Giuliani, M. E., 2014, Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms, *Marine Environmental Research*, 93, 106-117.
- Reid, G., Kirschner, M. B., & van Zandwijk, N., 2011, Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80(2), 193-208.
- Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D. K., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B. D. & Pattiaratchi, C., 2014, Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates, *PLoS One*, 9(6), e100289.
- Renzi, M., Blašković, A., Bernardi, G., & Russo, G. F., 2018, Plastic litter transfer from sediments towards marine trophic webs: A case study on holothurians, *Marine Pollution Bulletin*, 135, 376-385.
- Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Ilharco, L. M. & Bebianno, M. J., 2017, Microplastics effects in *Scrobicularia plana*, *Marine Pollution Bulletin*, 122(1), 379-391.
- Rice, K. M., Walker Jr, E. M., Wu, M., Gillette, C., & Blough, E. R., 2014, Environmental mercury and its toxic effects, *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 47(2), 74.
- Riisgård, H. U., Pleissner, D., Lundgreen, K., & Larsen, P. S., 2013, Growth of mussels *Mytilus edulis* at algal (*Rhodomonas salina*) concentrations below and above saturation levels for reduced filtration rate, *Marine Biology Research*, 9(10), 1005-1017.
- Ringwood, A. H., Hoguet, J., Keppler, C. J., Gielazyn, M. L., Ward, B. P., & Rourk, A. R., 2003, Cellular biomarkers (lysosomal destabilization, glutathione & lipid peroxidation)

in three common estuarine species: a methods handbook, Marine Resources Research Institute: Charleston, SC, USA.

- Rist, S. E., Assidqi, K., Zamani, N. P., Appel, D., Perschke, M., Huhn, M., & Lenz, M., 2016, Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*, *Marine Pollution Bulletin*, 111(1-2), 213-220.
- Rist, S., Steensgaard, I. M., Guven, O., Nielsen, T. G., Jensen, L. H., Møller, L. F., & Hartmann, N. B., 2019, The fate of microplastics during uptake and depuration phases in a blue mussel exposure system, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(1), 99-105.
- Rivera-Hernández, J. R., Fernández, B., Santos-Echeandia, J., Garrido, S., Morante, M., Santos, P., & Albentosa, M., 2019, Biodynamics of mercury in mussel tissues as a function of exposure pathway: natural vs microplastic routes, *Science of The Total Environment*, 674, 412-423.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., & Kaye, S., 2013a, Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris, *Environmental Science & Technology*, 47(3), 1646-1654.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J., 2013b, Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress, *Scientific Reports*, 3, 3263.
- Rochman, C. M., Hentschel, B. T., & Teh, S. J., 2014a, Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments, *PLoS One*, 9(1), e85433.
- Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J., 2014b, Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment, *Science of the Total Environment*, 493, 656-661.
- Rochman, C. M., Kross, S. M., Armstrong, J. B., Bogan, M. T., Darling, E. S., Green, S. J., Smyth, A.R. & Veríssimo, D., 2015, Scientific evidence supports a ban on microbeads, *Environmental Science & Technology*, 49, 18, 10759-10761.

- Romano, N., Ashikin, M., Teh, J. C., Syukri, F., & Karami, A., 2018, Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb *Barbodes gonionotus* fry, *Environmental Pollution*, 237, 1106-1111.
- Rosani, U., Pallavicini, A., & Venier, P., 2016, The miRNA biogenesis in marine bivalves, *PeerJ*, 4, e1763.
- Rouane-Hacene, O., Boutiba, Z., Belhaouari, B., Guibbolini-Sabatier, M. E., Francour, P., & Risso-de Faverney, C., 2015, Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels *Mytilus galloprovincialis* from Algerian west coast, applied to environmental monitoring, *Oceanologia*, 57(4), 362-374.
- Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., & Schmitt-Jansen, M., 2017, Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment, *Environmental Science & Technology Letters*, 4(7), 258-267.
- Santos, R. G., Andrades, R., Boldrini, M. A., & Martins, A. S., 2015, Debris ingestion by juvenile marine turtles: an underestimated problem, *Marine Pollution Bulletin*, 93(1-2), 37-43.
- Santos, R. G., Andrades, R., Fardim, L. M., & Martins, A. S., 2016, Marine debris ingestion and Thayer's law—The importance of plastic color, *Environmental Pollution*, 214, 585-588.
- Savoca, M. S., Wohlfeil, M. E., Ebeler, S. E., & Nevitt, G. A., 2016, Marine plastic debris emits a keystone infochemical for olfactory foraging seabirds, *Science Advances*, 2(11), e1600395.
- Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., Beone, G. M. & Capri, E., 2013, Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacci di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia), *Environmental Pollution*, 177, 82-89.
- Scheuhammer, A. M., Basu, N., Burgess, N. M., Elliott, J. E., Campbell, G. D., Wayland, M., Champoux, L. & Rodrigue, J., 2008, Relationships among mercury, selenium, and

neurochemical parameters in common loons (*Gavia immer*) and bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*), *Ecotoxicology*, 17(2), 93-101.

Scheuhammer, A., Braune, B., Chan, H. M., Frouin, H., Krey, A., Letcher, R., Loseto, L., Noel, M., Ostertag, S., Ross, P. & Wayland, M., 2015, Recent progress on our understanding of the biological effects of mercury in fish and wildlife in the Canadian Arctic, *Science of the Total Environment*, 509, 91-103.

Schwarzenbach, H., Hoon, D. S., & Pantel, K., 2011, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426.

Selin, N. E., 2009, Global biogeochemical cycling of mercury: a review, *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 43-63.

Seltenrich, N., 2015, New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety, *Environmental Health Perspectives*, 123(2), A34.

Serfor-Armah, Y., Nyarko, B. J. B., Adotey, D. K., Adomako, D., & Akaho, E. H. K., 2005, The impact of small-scale mining activities on the levels of mercury in the environment: The case of Prestea and its environs, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 262(3), 685-690.

Setälä, O., Norkko, J., & Lehtiniemi, M., 2016, Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community, *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 95-101.

Seuront, L., 2018, Microplastic leachates impair behavioural vigilance and predator avoidance in a temperate intertidal gastropod, *Biology Letters*, 14(11), 20180453.

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

Sezer, N., Kocaoğlu, H. O., Kılıç, Ö., Lacoue-Labarthe, T., & Belivermiş, M., 2018b, Acidified seawater increases accumulation of cobalt but not cesium in manila clam *Ruditapes philippinarum*, *Journal of Environmental Radioactivity*, 184, 114-121.

- Sheir, S. K., Handy, R. D., & Galloway, T. S., 2010, Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1338-1344.
- Shi, W., Guan, X., Han, Y., Guo, C., Rong, J., Su, W., Zha, S., Wang, Y. & Liu, G., 2018, Waterborne Cd²⁺ weakens the immune responses of blood clam through impacting Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ related apoptosis pathways, *Fish & Shellfish Immunology*, 77, 208-213.
- Shim, W. J., Hong, S. H., & Eo, S. E., 2017, Identification methods in microplastic analysis: a review, *Analytical Methods*, 9(9), 1384-1391.
- Sighicelli, M., Pietrelli, L., Lecce, F., Iannilli, V., Falconieri, M., Coscia, L., Di Vito, S., Nuglio, S. & Zampetti, G., 2018, Microplastic pollution in the surface waters of Italian Subalpine Lakes, *Environmental Pollution*, 236, 645-651.
- Singaram, G., Harikrishnan, T., Chen, F. Y., Bo, J., & Giesy, J. P., 2013, Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury, *Chemosphere*, 90(3), 917-928.
- Sokolova, I. M., Evans, S., & Hughes, F. M., 2004, Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition, *Journal of Experimental Biology*, 207(19), 3369-3380.
- Streets, D. G., Zhang, Q., & Wu, Y., 2009, Projections of global mercury emissions in 2050, *Environmental Science & Technology*, 43(8), 2983-2988.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., & Gahan, P. B., 1977, Circulating nucleic acids in higher organisms, *International Review of Cytology* 51, 1-48.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., Le Goic, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P. & Huvet, A., 2016, Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2430-2435.

- Syberg, K., Khan, F. R., Selck, H., Palmqvist, A., Banta, G. T., Daley, J., Sano, L. & Duhaime, M. B., 2015, Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 945-953.
- Swarup, V., & Rajeswari, M. R., 2007, Circulating (cell-free) nucleic acids—A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*, 581(5), 795-799.
- Takahashi, S., 2012, Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies, *Journal of Hematology & Oncology*, 5(1), 41.
- Taltec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M. & Paul-Pont, I., 2018, Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos, *Environmental Pollution*, 242, 1226-1235.
- Tang, X. L., Xu, M. J., Li, Z. H., Pan, Q., & Fu, J. H., 2013, Effects of vitamin E on expressions of eight microRNAs in the liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6), 1470-1475.
- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachère, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvet, A., Jarque, S., Jollivet, D., Klages, S., Lapégué, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J-F., Zouros, E., Canario, A., 2008, Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution, *Gene*, 408(1), 27-36.
- Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N., & Sutton, D., 2003, Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health, *Environmental Toxicology: An International Journal*, 18(3), 149-175.
- Thiagarajan, R., Gopalakrishnan, S., & Thilagam, H., 2006, Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3), 392-399.

- Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W., McGonigle, D. & Russell, A. E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838-838.
- Thompson, R. C., Moore, C. J., Vom Saal, F. S., & Swan, S. H., 2009, Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153-2166.
- Topçu, E. N., Tonay, A. M., Dede, A., Öztürk, A. A., & Öztürk, B., 2013, Origin and abundance of marine litter along sandy beaches of the Turkish Western Black Sea Coast, *Marine Environmental Research*, 85, 21-28.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., & Massabuau, J. C., 2007, Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7), 1545-1551.
- Troost, T. A., Desclaux, T., Leslie, H. A., van Der Meulen, M. D., & Vethaak, A. D., 2018, Do microplastics affect marine ecosystem productivity? *Marine Pollution Bulletin*, 135, 17-29.
- Turchinovich, A., Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G., & Burwinkel, B., 2013, Circulating miRNAs: cell–cell communication function? *Frontiers in Genetics*, 4, 119.
- UNEP, 2013, Assessment, U. G. M., 2013, Sources, emissions, releases and environmental transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 42.
- UNEP, 2016. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Marine debris: understanding, preventing and mitigating the significant adverse impacts on marine and coastal, Biodiversity. Technical Series No. 83.
- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R., 2014, Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65-70.
- Van Der Vaart, M., & Pretorius, P. J., 2008, Circulating DNA: its origin and fluctuation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 18-26.

- Van Franeker, J. A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., Hansen, P.-L., Heubeck, M., Jensen, J.-K., Le Guillou, G., Olsen, B., Olsen, K.-O., Pedersen, J., Stienen, E.W.M., Turner, D. M., 2011, Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea, *Environmental Pollution*, 159(10), 2609-2615.
- Van Weert, S., Redondo-Hasselerharm, P. E., Diepens, N. J., & Koelmans, A. A., 2019, Effects of nanoplastics and microplastics on the growth of sediment-rooted macrophytes, *Science of the Total Environment*, 654, 1040-1047.
- Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajaraville, M. P., Raccanelli, S., Pallavicini, A., Venier, P., 2013, DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg), *PloS One*, 8(1), e54602.
- Velez, C., Freitas, R., Antunes, S. C., Soares, A. M., & Figueira, E., 2016, Clams sensitivity towards As and Hg: A comprehensive assessment of native and exotic species, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 43-54.
- Verlis, K. M., Campbell, M. L., & Wilson, S. P., 2013, Ingestion of marine debris plastic by the wedge-tailed shearwater *Ardenna pacifica* in the Great Barrier Reef, Australia, *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), 244-249.
- Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., & Da Ros, L., 2013, Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 54-61.
- Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., & Guilhermino, L., 2009, Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour, *Chemosphere*, 76(10), 1416-1427.
- VishnuRadhan, R., Eldho, T. I., & David, T. D., 2019, Can plastics affect near surface layer ocean processes and climate? *Marine Pollution Bulletin*, 140, 274-280.

- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A., 2012, Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure, *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327-11335.
- Vroom, R. J., Koelmans, A. A., Besseling, E., & Halsband, C., 2017, Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton, *Environmental Pollution*, 231, 987-996.
- Wang, G. K., Zhu, J. Q., Zhang, J. T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., Jing, Q., 2010, Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans, *European Heart Journal*, 31(6), 659-666.
- Wang, F., Wang, F., & Zeng, E. Y., 2018, Sorption of Toxic Chemicals on Microplastics. *Microplastic Contamination in Aquatic Environments* (pp. 225-247).
- Wataganara, T., & Bianchi, D. W., 2004, Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1022(1), 90-99.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., Wang, K., 2010, The microRNA spectrum in 12 body fluids, *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741.
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., & Koelmans, A. A., 2012, Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2490-2497.
- Welden, N. A., & Cowie, P. R., 2016, Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*, *Environmental Pollution*, 218, 895-900.
- Wen, B., Jin, S. R., Chen, Z. Z., Gao, J. Z., Liu, Y. N., Liu, J. H., & Feng, X. S., 2018, Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*), *Environmental Pollution*, 243, 462-471.

- Wesch, C., Elert, A. M., Wörner, M., Braun, U., Klein, R., & Paulus, M., 2017, Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data, *Scientific Reports*, 7(1), 5424.
- Widdows, J., & Brinsley, M., 2002, Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and the consequences to the structure and functioning of the intertidal zone, *Journal of Sea Research*, 48(2), 143-156.
- Wieczorek, A. J., Rhyner, C., & Block, L. H., 1985, Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3455-3459.
- Wilcox, C., Van Sebille, E., & Hardesty, B. D., 2015, Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), 11899-11904.
- Wolfe, M. F., Schwarzbach, S., & Sulaiman, R. A., 1998, Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2), 146-160.
- Woods, M. N., Stack, M. E., Fields, D. M., Shaw, S. D., & Matrai, P. A., 2018, Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*), *Marine Pollution Bulletin*, 137, 638-645.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S., 2013a, The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review, *Environmental Pollution*, 178, 483-492.
- Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S., 2013b, Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms, *Current Biology*, 23(23), R1031-R1033.
- Xu, X. Y., Lee, W. T., Chan, A. K. Y., Lo, H. S., Shin, P. K. S., & Cheung, S. G., 2017, Microplastic ingestion reduces energy intake in the clam *Atactodea striata*, *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 798-802.
- Yang, J., Li, G., Heenatigala, P. P. M., Hu, S., Chen, Y., Wu, Z., Kumar, S., Duan, P., Yao, L., Hou, H., 2018, A Comparison of growth on mercuric chloride for three Lemnaceae species reveals differences in growth dynamics that effect their suitability for use in

- either monitoring or remediating ecosystems contaminated with mercury, *Frontiers in Chemistry*, 6, 112.
- Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., & Liu, W., 2019, Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes, *Environment International*, 123, 79-86.
- Yin, L., Chen, B., Xia, B., Shi, X., & Qu, K., 2018, Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacopecover (*Sebastes schlegelii*), *Journal of Hazardous Materials*, 360, 97-105.
- Yonkos, L. T., Friedel, E. A., Perez-Reyes, A. C., Ghosal, S., & Arthur, C. D., 2014, Microplastics in four estuarine rivers in the Chesapeake Bay, USA, *Environmental Science & Technology*, 48(24), 14195-14202.
- Yoshikawa, T., & Asoh, K., 2004, Entanglement of monofilament fishing lines and coral death, *Biological Conservation*, 117(5), 557-560.
- Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., & Zhao, Y., 2018, Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver, *Aquatic Toxicology*, 200, 28-36.
- Yuan, W., Liu, X., Wang, W., Di, M., & Wang, J., 2019, Microplastic abundance, distribution and composition in water, sediments, and wild fish from Poyang Lake, China, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 180-187.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A., 2013, Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris, *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7137-7146.
- Zhang, Y., Song, J., Yuan, H., Xu, Y., He, Z., & Duan, L., 2010, Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(1), 19-25.

- Zhang, Q. F., Li, Y. W., Liu, Z. H., & Chen, Q. L., 2016, Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, *Aquatic Toxicology*, 177, 417-424.
- Zhang, C., Chen, X., Wang, J., & Tan, L., 2017a, Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae, *Environmental Pollution*, 220, 1282-1288.
- Zhang, L. J., Li, Y., Chen, P., Li, X. M., Chen, Y. G., Hang, Y. Y., & Gong, W. J., 2017b, A study of genotoxicity and oxidative stress induced by mercuric chloride in the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 361-365.
- Zhao, C., Li, X., Luo, S., & Chang, Y., 2011, Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture, *African Journal of Biotechnology*, 10(64), 13968-13973.
- Zhao, S., Ward, J. E., Danley, M., & Mincer, T. J., 2018, Field-based evidence for microplastic in marine aggregates and mussels: implications for trophic transfer, *Environmental Science & Technology*, 52(19), 11038-11048.
- Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D., 2017, Impact of microplastic beads and fibers on waterflea (*Ceriodaphnia dubia*) survival, growth, and reproduction: Implications of single and mixture exposures, *Environmental Science & Technology*, 51(22), 13397-13406.
- Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D., 2018, Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates, *Environmental Pollution*, 236, 425-431.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ercan SIKDOKUR
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	02.09.1992
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	-
E-Posta Adresi	ercanskdokur@yandex.com
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	17.06.2015

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

Makale ve Bildiriler	
Kılıç Ö., Belivermiş M., Sezer N., Sıkdokur E. , Erentürk S., Hacıyakupoğlu S., “Determination of ^{210}Po and ^{210}Pb by Moss Monitoring Technique in Thrace Region of Turkey”, The 8 th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (BIOMAP 8), Dubna, Russia, July 2-7, 2018, pp.31.	