

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

Pelophylax ridibundus (Ova Kurbağası)'da AĞIR METAL
KONSANTRASYONLARININ TESPİTİ ve RİSK
DEĞERLENDİRMESİ

Muhsin MANİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK

II. DANIŞMAN

Doç. Dr. Kenan GEDİK

JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Prof. Dr. Çiğdem GÜL

RİZE-2021

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TEZ BAŞLIĞI

Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK danışmanlığında, Muhsin MANİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından 15/06/2021 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Çiğdem GÜL	
Üye	: Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR	
Üye	: Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Pelophylax ridibundus (Ova Kurbağası)'da ağır metal konsantrasyonlarının tespiti ve risk değerlendirmesini amaçlayan bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü öğrenim sürecimde benden yardımını esirgemeyen ayrıca tez çalışmamda gerek arazi gerekse laboratuvar çalışmalarının yönlendirilmesi ve tezin yazımı aşamasında, bilgi ve tecrübeleriyle yardım ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezin hazırlanması süreci, laboratuvar çalışmaları, verilerin değerlendirilmesi ve görselleştirilerek yorumlanmasında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen II. danışman hocam sayın Doç. Dr. Kenan GEDİK'e yoğun emeklerinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca beni bugünlere getiren, eğitim hayatım sürecinde maddi manevi ellerinden gelen desteği sağlayan aileme en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu Yüksek Lisans Tezi RTEÜ Bap Birimi tarafından FYL-2019-1043 nolu proje ile desteklenmiştir.
--

Muhsin MANİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “***Pelophylax ridibundus* (Ova Kurbağası)**'da Ağır Metal Konsantrasyonlarının Tespiti ve Risk Değerlendirmesi” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 09/07/2021

İmza

Muhsin MANİ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Pelophylax ridibundus* (Ova Kurbağası)'da AĞIR METAL KONSANTRASYONLARININ TESPİTİ ve RİSK DEĞERLENDİRMESİ**

Muhsin MANİ

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK**

Bu çalışma ile gıda olarak tüketilebilen *Pelophylax ridibundus* türüne ait bireylerin arka bacak ve karaciğer dokularında ağır metal seviyelerinin belirlenmesi ve insan sağlığı üzerine olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu illerine ait belirlenen 15 farklı istasyondan kurbağa ve yaşam ortamlarından su ve sediment örnekleri toplanmıştır. Alınan su örneklerinde pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, iletkenlik ve hava sıcaklığı parametreleri arazi şartlarında portatif multimetre cihazı ile analiz edilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre lokasyonlar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Örneklenmiş olan *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası)'un yenilebilir dokuları (2 arka bacak) HNO_3 ve H_2O_2 ile parçalanarak, esansiyel (Cu, Cr ve Zn) ve esansiyel olmayan metal ve metaloit (As, Cd ve Pb) konsantrasyonları ICP-MS ile belirlenmiş ve belirlenen konsantrasyonların Tolere Edilebilir Haftalık Alım Miktarı (PTWI), Hedef Risk Katsayısı (THQ) ve Risk İndeksi (HI) gibi toksikolojik sınır değerlerle karşılaştırılarak insan sağlığı açısından potansiyel risklerin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Yapılan analizler ve karşılaştırmalar sonucu örneklenen kurbağa dokularının hiçbirinin insan sağlığı açısından belirlenen toksik değerin üzerinde bir risk taşımadığı tespit edilmiştir (THQ ve HI < 1).

2021, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Toksisite, insan sağlığı, biyoindikatör, biyoizleme, *Pelophylax ridibundus*

ABSTRACT

DETERMINATION OF HEAVY METAL CONCENTRATIONS in *Pelophylax ridibundus* (Marsh Frog) and RISK ASSESSMENT

Muhsin MANİ

Recep Tayyip Erdogan University

Graduate Education Institute

Department of Biology

Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK

In this study, it was aimed to determine the heavy metal levels in hind limb and liver tissues of individuals belonging to the *Pelophylax ridibundus* species that can be consumed as food and to investigate the possible effects on human health. In this context, water and sediment samples were collected from frogs and their habitats in 15 different stations belonging to the provinces of Artvin, Rize, Trabzon, Giresun and Ordu. In the water samples pH, temperature, improved conductivity and air were analyzed with a multimeter portable device in the study area. According to the statistical analysis, no significant difference was found between the locations ($p > 0.05$). Edible tissues (2 hind limbs) of the sampled *P. ridibundus* (Marsh frog) were broken down with HNO_3 and H_2O_2 , and the essential (Cu, Cr and Zn) and non-essential metal and metalloid (As, Cd and Pb) concentrations were determined by ICP-MS. and by comparing the determined concentrations with toxicological limit values such as Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI), Target Risk Coefficient (THQ) and Hazard Index (HI), potential risks for human health were evaluated. The results showed that it did not exceed the maximum risk limit (THQ and HI < 1) and that its edible tissues did not have a potential carcinogenic health risk in terms of human health.

2021, 54 pages

Keywords: Toxicity, human health, bioindicator, biomonitoring, *Pelophylax ridibundus*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Ağır Metaller	2
1.2.1 Ağır Metallerin Tanımı ve Kullanımı.....	4
1.2.2 İnsan Toksisitesi.....	5
1.2.3 Sulak Alanlarda Ağır Metaller ve Kaynakları.....	7
1.2.4 Sulak Alanlardaki Canlılarda Toksisite.....	7
1.3. Sulak Alanların İzlenmesi	7
1.3.1 Biyoizleme.....	8
1.3.2 Biyoindikatörler.....	9
1.4. Ova Kurbağası.....	13
1.4.1 Ova Kurbağası'nın Biyo-ekolojisi.....	14
1.4.2 Biyoindikatör Olarak Ova Kurbağası.....	15
1.4.3 Gıda Olarak Kurbağa ve İnsan Sağlığı.....	16
1.5. Literatür özeti.....	17
1.6. Çalışmanın amacı.....	22

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1.	Materyal.....	23
2.1.1.	Çalışma Alanları.....	24
2.1.1.1.	Artvin Lokalitesi.....	25
2.1.1.2.	Rize Lokalitesi.....	27
2.1.1.3.	Trabzon Lokalitesi.....	28
2.1.1.4.	Giresun Lokalitesi.....	30
2.1.1.5.	Ordu Lokalitesi.....	31
2.2.	Yöntem	33
2.2.1.	Ağır Metallerin ekstraksiyonu.....	33
2.2.2.	Ağır metal tayinleri.....	34
2.2.3.	Verilerin Doğrulanması.....	34
2.2.4.	İstatistiksel Analizler.....	35
2.2.5.	Risk Tahminleri.....	35
3.	BULGULAR	37
3.1.	Kurbağa Örneklerine Dair Bulgular.....	37
3.2.	Lokasyona ait bulgular.	37
3.3.	Dokulardaki Ağır Metal Seviyelerine İlişkin Bulgular.....	38
3.4.	Sediment ve Su Örneklerine Ait Ağır Metal Seviyelerine İlişkin Bulgular.....	40
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	42
5.	ÖNERİLER	46
	KAYNAKLAR	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un coğrafi dağılım alanı.....	13
Şekil 2. <i>Pelophylax ridibundus</i>	23
Şekil 3. Sediment örneklerinin ağır metal analizi için hazırlanışı	24
Şekil 4. Örnekleme alanları	25
Şekil 5. Sundura biyotopu	25
Şekil 6. Hopa biyotopu	26
Şekil 7. Arhavi biyotopu.....	26
Şekil 8. Derepazarı biyotopu	27
Şekil 9. Rize Merkez biyotopu	28
Şekil 10. Salarha biyotopu.....	28
Şekil 11. Kurbağalıdere biyotopu.....	29
Şekil 12. Yalıköy biyotopu.....	29
Şekil 13. Darıca biyotopu.....	30
Şekil 14. Karadere biyotopu	30
Şekil 15. Dereli biyotopu.....	31
Şekil 16. Tirebolu biyotopu	31
Şekil 17. Turnasuyu biyotopu.....	32
Şekil 18. Melet biyotopu	32
Şekil 19. Sahil biyotopu.....	33
Şekil 20. <i>Pelophylax ridibundus</i> örneğinin bacak dokusunda ve karaciğerinde toksik elementlerin dağılımı	38
Şekil 21. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un bacak dokusu ve karaciğerindeki ağır metal konsantrasyonları.....	39
Şekil 22. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un bacak dokusu ve karaciğerindeki kurbağa boyutu ile ağır metal konsantrasyonları arasındaki ilişki	40
Şekil 23. Kuzeydoğu Karadeniz boyunca örneklenen tortu ve su örneklerindeki potansiyel ağır metal konsantrasyonları.....	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sertifikalı referans maddesinin analiz sonuçları.....	34
Tablo 2. Kurbağa örneklerine ait boy ve ağırlık bilgileri.....	37
Tablo 3. Lokalitelere ait su numunelerinde bazı parametrelerin ölçüm sonuçları.....	37
Tablo 4. Risk değerlendirmesi.....	45



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

As	Arsenik
Cd	Kadmiyum
Co	Kobalt
Cr	Krom
Cu	Bakır
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
HI	Risk İndeksi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICP-MS	İndüksiyonla Birleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi
IUCN	Uluslararası Doğa Koruma Birliği
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Pb	Kurşun
PTWI	Tolere Edilebilir Haftalık Alım Miktarı
THQ	Hedef Risk Katsayısı
V	Vanadyum
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zn	Çinko

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Günümüzde nüfus artışı, çarpık kentleşme, sanayileşmenin hızla artışı ve yoğun tarımsal mücadelenin beraberinde getirdiği kirlilik, zamanla daha fazla büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Şanlı, 1979). Artan antropojenik faaliyetlerin bir sonucu olarak toprak, su ve atmosferdeki ağır metal kirliliği insan sağlığı ve gıda kalitesini etkileyen büyük bir çevre sorununu ortaya çıkarmıştır. Ağır metaller gıda zincirine girerek artan miktarlarda insanlara kadar ulaşabilir. Bu nedenle çevresel numunelerde, özellikle gıda olarak tüketilenlerde, ağır metallerin belirlenmesi önemlidir. Ağır metaller, insan sağlığı üzerinde, özellikle Cd ve Pb gibi esansiyel olmayan elementler olarak önemli derecede toksik ve tehlikeli etkilere sahip olabilir. Ağır metal kirliliği ile ilgili temel kaygı, akut toksisiteleri ve biyolojik sistemlerde birikme kabiliyetleridir (Torre vd., 2013; Taiwo vd., 2014).

Amfibiler üç takımdan oluşan, dört üyeli omurgalıların (Tetrapoda) ilk sınıfını oluştururlar (Özeti ve Yılmaz, 1994). Bu takımlar Kuyruksuz kurbağalar (Anura), Kuyruklu kurbağalar (Caudata) ve Bacaksız kurbağalar (Gymnophiona) şeklinde belirtilir. Amfibilerin yaşamını devam ettiren 8000'in üzerinde türü olduğu düşünülmektedir (Amphibiaweb, 2021). Amphibia terimi Yunanca'da amphi (iki), bios (yaşam) kelimelerinin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Amfibi kelimesi suda yaşayan bir larva formundan metamorfoza giren amfibilerin genel yaşam öyküsü özelliklerine vurgu yapmaktadır. Böyle bir yaşam tarzı önemli morfolojik ve anatomik değişiklikleri de beraberinde getirmiştir. Yüzgeçler yerine bacakların, solungaçlar yerine akciğerlerin meydana gelmesi bu değişikliklerdendir. Bununla beraber, larva evrelerinde sucül karakterler daha belirgindir (bu evrede solungaç solunumu yapmaları gibi). Amfibiler, çoğu beslenme zincirinde hem avcı hem de av konumunda oldukları (Duellman ve Trueb, 1986) ve hayvan komnitelerindeki biyomasa önemli bir oranda katkıda bulundukları (Burton ve Likens, 1975) için ayrıca önemlidirler (Hecnar, 1995).

Artvin, Rize, Trabzon, Giresun ve Ordu illerinden örneklenmiş olan *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası)'un yenilebilir dokuları (2 arka bacak) HNO₃ ve H₂O₂ (5:2) ile parçalanarak, esansiyel (Cu, Cr ve Zn) ve esansiyel olmayan metal ve metaloit (As, Cd ve Pb) konsantrasyonlarının ICP-MS ile belirlenmesi ve belirlenen konsantrasyonların

Tolere Edilebilir Haftalık Alım Miktarı (PTWI), Hedef Risk Katsayısı (THQ) ve Risk İndeksi (HI) gibi toksikolojik sınır değerlerle karşılaştırılarak insan sağlığı açısından potansiyel risklerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmayla Türkiye'deki ova kurbağasının dokularındaki ağır metal konsantrasyonları belirlenmiş insan sağlığı ve ekolojik açıdan oluşturabileceği potansiyel riskler ilk kez araştırılmıştır. Bu sayede literatürdeki boşluğun doldurulmasının yanı sıra uluslararası düzeyde diğer araştırmacıların bu bilgilerden istifade etmesi sağlanmıştır.

1.2. Ağır Metaller

Metaller normalde doğada bulunur ve bazıları yaşam için gereklidir. Ancak organizmalarda birikme yoluyla toksik hale gelebilir. Çevrede bulunan çok sayıda metalden yalnızca birkaçı, mikro besin olarak adlandırılan tüm canlı organizmalar için çokaz veya düşük miktarlarda bir ihtiyaçtır. Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Mo, Cr ve Se gibi mikro besinler insanlar tarafından az miktarlarda, günde birkaç miligram veya mikrogramda ve Ca, Mg, Na, P ve S insanlarda biyolojik ve biyokimyasal süreçlerin optimal işleyişi için daha yüksek miktarlarda, günde 100 mg veya daha fazla gereklidir (Stankovic ve Stankovic 2013). Mikro besinler, canlı organizmaların fonksiyonel aktivitelerinde yer alır.

Ağır metaller, doğal olarak ve ekosistemlerdeki antropojenik kaynaklardan ve konsantrasyonlarda büyük varyasyonlarla oluşur. Pb, Cd, Cr, Cu, Zn, Ni, As ve Hg en yaygın ağır metal kirleticileridir ve Hg, Pb ve Cd en büyük endişe kaynağıdır. Besin zincirinde biyolojik olarak birikerek besin zincirinde daha yüksek türler ve insanlar için toksik risk oluşturabilirler (Stankovic ve Stankovic 2013).

Ağır metal olarak sınıflandırılan metaller şunlardır: Cu, Co, Cr, Cd, Fe, Zn, Pb, Sn, Hg, Mn, Ni, Mo, V ve W (Szyzewski vd., 2009). Ağır metaller grubu içinde, hem canlı organizmalar için gerekli olan elementler (mikro besinler) hem de fizyolojik rolü bilinmeyen ve dolayısıyla bitkiler, hayvanlar ve insanlara karşı "etkisiz" olan elementler ayırt edilebilir. Canlı organizmalarda mikro besin görevi gören metaller, genellikle her tür için kesin olarak tanımlanmış eser miktarlarda bulunur (Szyzewski vd., 2009). Eksiklikleri veya fazlalıkları, hem organizmaların hem de yetişkinlerin psikofiziksel gelişimini zararlı bir şekilde etkiler.

Metaller, genellikle canlı organizmalar için toksik görünebilecekleri için

simulatorler veya yaşam süreçlerinin engelleyici faktörleri olarak kabul edilir. Toksikite, konsantrasyonlarına, kompleks oluşturma yeteneklerine ve oksidasyon derecelerine bağlıdır. En güçlü toksik özellikler, kolayca çözülebilen ve hücre zarlarına kolayca nüfuz edip organizmalara girebilen inorganik metal bileşiklerinin özellikleridir. Serbest metal iyonik aktivite, bir metalin toplam konsantrasyonundan daha fazla metal toksisitesi üretmede daha önemli olabilir (Szyzewski vd., 2009).

Toplam yıllık antropojenik As emisyonlarının 28.000 54.000 ton/yıl olduğu tahmin edilmektedir, ancak bu aralık, volkanizma, orman yangınları dahil olmak üzere atmosfere doğal As emisyonlarını ve örneğin Yellowstone National'daki hidrotermal faaliyetler yoluyla salınan önemli miktarlarda As'ı içermemektedir. Park (Reimann vd., 2009). Bitkiler genellikle düşük As konsantrasyonları gösterirler, destekleyici topraklardan çok daha düşüktür; As dünya referans bitkisi için önerilen değer 0.1 mg / kg'dır (Nagajyoti vd., 2010). Bitkilerin çoğunun As alımından kaçınmak için mekanizmaları vardır, ancak yosunlar ve likenler sürekli olarak diğer karasal bitkilerden daha yüksek As değerleri gösterir (Serbula vd., 2012). As'nin toksisitesi en azından Roma döneminden beri iyi bilinmektedir (Stankovic ve Stankovic 2013). Mevcut içme suyu yönetmeliğinde adı geçen tüm maddeler içinde en kanserojen olanı As'dir. As için içme suyu eylem sınırı oldukça yakın zamanda 10 µg / L'ye (50 µg/ L'den) düşürülmüştür. Havadaki As konsantrasyonu genellikle çok düşüktür ve 0,4 ile 30 ng / m³ arasında değişir; deniz suyunda 1.0 ile 8.0 µg / L, deniz tortularında ise 1.0 ile 60 mg / kg arasında değişir. Topraktaki As için dünya ortalaması 5,0 mg / kg'dır, ancak coğrafi bölgeler arasında önemli ölçüde değişiklik gösterir (Reimann vd., 2009).

Pb, doğal ve antropojenik kaynaklardan atmosfere salınır. Doğal Pb emisyonları volkanlardan, orman yangınlarından ve biyogenik kaynaklardan kaynaklanır. Pb'nin başlıca antropojenik emisyon kaynakları arasında trafikten fosil yakıtların yakılması, demir dışı metal üretimi ve demir ve çelik üretimi yer alır (WHO, 2007). Ortamdaki Pb seviyeleri 4 ile 20 mg / g toz arasında değişir; Kirlenmemiş sular 0,001 ile 0,06 mg / L arasında değişen konsantrasyonlarda Pb içerirken, deniz suyu 0,03 µg / L'ye kadar içerir (Bardi, 2010). Toprak yüzeylerde, Pb konsantrasyonları mekansal olarak heterojendir ve 10 mg / kg'ın altından 70 mg / kg'a kadar değişir. Ortanca değer in Avrupa toprağında 22,6 mg / kg olduğu tahmin edilmektedir.

Cd hem doğal hem de antropojenik kaynaklardan biyosfere salınır. Doğal kaynaklardan havaya toplam Cd emisyonu yaklaşık 150-2600 ton olarak tahmin

edilmektedir (WHO 2007). Küresel Cd üretimi 1950'den 1990'a dört kat arttı ve son on yılda üretim biraz azalmıştır. 2000 yılına kadar havaya Cd'nin küresel emisyonu 3000 t / yıl'a ve 2003 yılında Avrupa'da 257 tona kapatılmıştır. AB ülkelerinde Cd emisyonları %50 azalmış ve baskın Cd kaynakları atmosferik biriktirme ve ticari fosfat gübreleri olmuştur (OECD 1994). Cr (VI) toprakta doğal olarak bulunur ve Dünya'nın kabuğunda en çok bulunan altıncı elementtir. Cr, hava, su ve toprak dahil olmak üzere ortamın tüm evrelerinde bulunur. Cr, İrlanda tarım topraklarında doğal olarak 5.0 ile 250 mg / kg arasındaki konsantrasyonlarda ve dünya çapında 1,04 ile 3,015 mg / kg arasında değişen çeşitli toprak türlerinde bulunur (Boyle ve Kakouli Duarte, 2008). Aynı zamanda insan uygulamalarının bir sonucu olarak mevcuttur ve çoğunlukla endüstri ile ilişkilidir. Toprakta doğal olarak oluşan Cr, ebeveyn materyaline bağlı olarak 10 ila 50 mg / kg arasında değişir (Shanker vd., 2005). Tatlı suda, Cr konsantrasyonları genellikle 0,1 ile 117 mg / L arasında değişirken, deniz suyu değerleri 0,2 ile 50 lg / L arasında değişir. Atmosferdeki Cr konsantrasyonları, 0.0012 µg / m³'lük arka plan konsantrasyonundan büyük ölçüde farklılık gösterir (Shanker vd., 2005). Cr'nin genel çevresel toksisiteyi ve ayrıca nörotoksisite, dermatoksisite, genotoksisite, karsinojenite ve immünotoksisite gibi akut ve kronik toksisite doğasının daha spesifik etkilerini indüklediği kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir. Cr'nin, glutatyon tarafından hücrede başlatıldığı düşünülen bir süreç olan Cr (III) 'e Cr (VI) indirgenmesi sırasında daha fazla zarar verdiğine inanılmaktadır (Boyle ve Kakouli-Duarte, 2008).

1.2.1. Ağır Metallerin Tanımı ve Kullanımları

Metaller iki kategoriden birine girer: temel veya gerekli olmayan. Organizmalardaki biyolojik ve biyokimyasal süreçlerin optimal işleyişi için temel metaller veya mikro besinler gerekirken, temel olmayan elementlerin bilinen biyolojik işlevleri yoktur. Aktif enzim veya membran protein bölgeleri için temel metallerle rekabet ederek toksisitelerini uygular (Torres vd., 2008). Biyolojik olarak gerekli olan metaller, yüksek maruziyet seviyelerinde insanlara ve diğer canlı organizmalara zararlı olma potansiyeline sahiptir (Stankovic vd., 2011a; Stankovic ve Jovic 2012). Canlı organizmalar, temel besinlerle birlikte ağır metalleri de alır ve birikebilir.

Doğal sistemlerde, potansiyel olarak toksik ağır metaller, yüzey ve / veya akifer sularına taşınan toprak oluşumu sırasında metallerin kayalardan, cevher

minerallerinden, volkanlardan ve hava etkisiyle salınan metallerden kaynaklanabilir (Szyczewski vd., 2009). Son birkaç on yılda, kentsel nüfusun faaliyetlerinden kaynaklanan baskı yoğun olmuştur ve potansiyel olarak toksik eser metallerin antropojenik emisyonları önemli ölçüde hızlanmıştır. Toksik metallerin antropojenik etkileri çoğunlukla madencilik, çıkarma ve arıtma aşamalarıyla ilgilidir ve önemli hava, su ve toprak kirliliğinin nedeni olabilir (Norgate vd., 2007).

1.2.2. İnsan Toksisitesi

Canlı organizmalarda mikro besin görevi gören metaller, genellikle her tür için kesin olarak tanımlanmış eser miktarlarda bulunur. Hem eksikliği hem de fazlalığı, canlı organizmaları olumsuz şekilde etkiler. Ayrıca metaller doğrudan veya dolaylı olarak hava, su ve gıda (bitkiler, hayvanlar) aracılığıyla insan vücuduna girerler. İnsan vücudundaki aşırı metal içeriği birçok yönden vücudu etkileyebilir (Stankovic vd., 2011a, b; Jovic vd. 2012). Bu nedenle, ağır metallerin içeriğinin yalnızca suda, havada, toprakta ve tortuda değil, bitkiler, hayvanlar ve son olarak insanlarda bilinmesi gerekir (Stankovic ve Stankovic, 2013).

İnsanlar, toz veya gaz halindeki partiküllerin solunması veya yiyecek ve içecek yoluyla yutulması yoluyla metallere maruz kalabilir. Avrupa Topluluğu içindeki en önemli 11 unsur şunlardır: As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Fe, Zn, Ni ve Pb. Bu elementlerin bazıları aslında eser miktarlarda (Co, Cu, Cr, Mn, Ni) insanlar için gerekliyken, diğerleri kanserojen veya toksik olup, merkezi sinir sistemini (Hg, Pb, As, Mn), böbrekleri veya karaciğeri etkiler (Hg, Pb, Cd, Cu) veya deri, kemikler veya dişler (Ni, Cd, Cu, Cr (Rai ve Pal 2002; Chen vd., 2008; Lavery vd., 2009).

Ağır metallerin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri uzun süredir bilinmesine rağmen ağır metallere maruziyet devam etmektedir (Rai ve Pal, 2002). İnsanların ağır metallere farklı düzeylerde maruz kalması üç farklı etkiye yol açabilir: Akut etkiler semptomları kısa bir maruziyet döneminde ağır metallere maruz kaldıktan hemen sonra ortaya çıkmaktadır. Kronik etkiler ise uzun bir süre boyunca düşük seviyeli maruz kalmanın bir sonucudur. Son olarak, ölümcül etkiler, fiziksel veya kimyasal ajanlar organizmadaki hücresel ve hücre altı süreçlere yüksek seviyede müdahale ettiğinde ortaya çıkan ve dolayısıyla ölüme neden olan tepkiler olarak tanımlanabilir (Kakkar ve Jaffery 2005).

Metaller insanlar için önemlidir çünkü bunlardan bazıları çeşitli metabolik enzimlerdeki en önemli eser elementler ve hücrelerin bileşenidir: Zn, Cu ve Fe hücrenin önemli bileşenlerini oluştururlar ve organik olarak şelatlı Cr^{3+} iyon, insanlarda karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden insülin hormonu yanıtında bir yardımcı faktör olarak görev yapar (Rai ve Pal, 2002). İnsanlarda günlük Cr ihtiyacı 50 µg civarında olmalıdır. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC), Cr (VI) bileşiklerinin insanlar için kanserojen olduğunu değerlendirmiştir (Rai ve Pal 2002). Hg, Cd, As ve Pb gibi diğer ağır metaller toksiktir ve insanlar üzerinde bilinen hayati veya yararlı etkileri yoktur (Stankovic vd., 2011a) ve zamanla vücutta birikmeleri ciddi hastalığa neden olabilir (Stankovic ve Stankovic, 2013).

Genel popülasyonda Cd maruziyetinin ana kaynağı besindir. Kronik Cd zehirlenmesi, kemiklerin yumuşaması, kırıklar ve iskelet deformasyonlarının eşlik ettiği Ca metabolizmasında bozukluklara neden olur ve "itai-itai" hastalığı olarak bilinir (Stankovic ve diğerleri, 2011a). Karaciğer ve böbrek dokuları, Cd depolamanın iki ana bölgesidir ve bu organlar, vücut yükünün yaklaşık% 40-80'i olan önemli miktarda Cd biriktirir. Önemli sağlık uç noktaları böbrek ve kemik hasarını ve kanseri içerir (WHO, 2007).

Romalılar bile Pb'nin ciddi sağlık sorunlarına neden olabileceğinin farkındaydılar (Rai ve Pal 2002). Pb, insanlarda, özellikle de küçük çocuklarda ciddi sağlık tehlikelerine neden olur ve böbrek, karaciğer ve beyin hücrelerinin zar geçirgenliğini etkiler, bu da Pb kümülatif bir zehir olduğu için bu dokuların ya işlevlerinin azalmasına ya da tamamen parçalanmasına neden olur. Pb zehirlenmesinin çocukların ve yetişkinlerin sağlığı üzerindeki tam etkisi çoğu ülkede daha net hale gelmektedir ve birçok hükümet bu konuda harekete geçmeye başlamıştır (Stankovic ve Stankovic 2013).

İnsanlar için iz elemente en çok maruz kalınan ortam gıda, su ve havadır (Beckett vd., 2007). Tüm insan türünün yaşamı sürdürmek için suya ihtiyacı vardır. Güvenli içme suyu temini, insanların sağlığını ve refahını korumak için yüksek öncelikli bir konudur (Van Leeuwen 2000, WHO 2011) ve ulusal, bölgesel ve yerel düzeylerde (WHO, 2011) önemli bir kalkınma sorunudur.

1.2.3. Sulak Alanlarda Ağır Metaller ve Kaynakları

Su sistemlerindeki ağır metaller, genellikle düşük seviyelerde olan ve insan sağlığı üzerinde hiçbir ciddi etkiye neden olmayan topraktan / kayadan suya yavaş sızma ile doğal olarak üretilebilir. Günümüzde, endüstriyel ve tarımsal gelişme, su metal kirliliğindeki hızlı artışı teşvik etmektedir. Metaller suda yaşayan organizmalarda birikebilir ve su ve tortularda kalabilir (Sevcikova vd., 2011). Sulak alan topraklarında ve çökeltilerinde genellikle ağır metaller olarak adlandırılan eser ve toksik metaller, potansiyel toksisiteleri nedeniyle endişe kaynağı olabilir. Sulak alan ortamlarına çok sayıda ağır metal kaynağı giriyor. Sulak alan toprakları ve çökeltileri, metal dağıtım reaktivitesini, hareketliliğini ve toksisitesini etkileyebilecek benzersiz özelliklere sahiptir (Gedik vd., 2016).

1.2.4. Sulak Alanlardaki Canlılarda Toksisite

Sudaki ağır metal kirliliği genellikle su sistemlerinde yüksek seviyelerde Hg, Cr, Pb, Cd, Cu, Zn ve Ni'yi temsil eder (Zhou vd., 2008). Cu, Ni, Cr ve Zn canlı organizmalar için gerekli eser metallerdir, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda toksik hale gelirler. Çevresel su sistemine eklenen Hg, Cr, Cd, Ni, Cu, As ve Pb gibi ağır metaller suda yaşayan organizmalar üzerinde yüksek toksisitelere neden olabilir (Stankovic ve Stankovic, 2013).

1.3. Sulak Alanların İzlenmesi

Sulak alanlar yalnızca bir dizi ekolojik ve hidrolojik işlevi (örn. Su temini, su arıtma, taşkın kontrolü) destekleyerek insanlara fayda sağlamakla kalmaz, aynı zamanda biyolojik çeşitliliğin korunması için de kritik öneme sahiptir (Ramsar, 1999). Sulak alanlar, büyük önemlerine rağmen küresel olarak hem alan hem de kalite olarak azalmaya devam etmektedir (Davidson, 2014).

Su sistemlerinde toksik metallerin izlenmesine yönelik özel programlar, memeliler ve kuşlar gibi omurgasızlar, yumuşakçalar ve omurgalılar gibi çeşitli hayvanlar kullanılarak 1960'ların başlarında gerçekleştirilmiştir (Stankovic ve Stankovic, 2013). Ağır metaller, suda yaşayan organizmaları etkileyen maddeler olarak önemli bir rol

oyunar. Sucul ağır metal kirliliği genellikle yüksek seviyelerde Hg, Cr, Pb, Cd, Cu, Zn, As, vb. Temsil eder ve bu da çevresel su sistemine dahil edildiğinde sucul organizmalar üzerinde yüksek toksisitelere neden olabilir (Zhou vd., 2008). Sucul sistemlerdeki çoğu kirletici sedimanla ilişkilidir (Förstner ve Wittmann, 1983; Tessier ve Campbell, 1987). Bu nedenle sucul sistemlerde biyoindikatör tür seçilirken sedimanla ilişkisi olan türler seçilmelidir.

Sulak alanların sağlığının korunması, biyolojik çeşitliliğin, ekosistem işlevinin ve insan sağlığının korunması açısından çok önemli kabul edilmektedir. Sulak alanları uygun şekilde korumak ve muhafaza etmek için, temel verilerin toplanması ve sulak alanın sağlığında zaman içinde meydana gelen değişiklikleri tespit edebilecek izleme programlarının oluşturulması çok önemlidir. İzleme için yaygın bir yöntem, biyoindikatörlerin vekil olarak kullanılmasını içerir (örneğin, Amfibiler). Ekolojik göstergelerin, çevrenin durumunu değerlendirmek veya zaman içinde durumdaki eğilimleri izlemek gibi birçok amacı olabilir (Cairns vd., 1993). Amfibilerin, gösterge türler olarak faydalı olduğu düşünülmektedir (Sheridan ve Olson, 2003).

1.3.1. Biyoizleme

Çevresel izleme çalışmaları bağlamında, biyoindikatörler, çevrenin (veya çevrenin bir kısmının) kalitesi hakkında bilgi içeren organizmaları (veya organizma kısımlarını veya organizma topluluklarını) yansıtır. Öte yandan biyomonitörler, çevrenin kalitesinin kantitatif yönleri hakkında bilgi içeren organizmalardır (veya organizma parçaları veya organizma toplulukları). Biyoendikasyonla elde edilen veriler ve bilgiler, bilgi düzeyine yükseltildiğinde, bir sistemin karmaşıklığı ve dinamikleri (bilme merdiveni) ile yorumun öznelliği artar (Markert vd., 2003).

Biyo-izlemenin temel amacı, çeşitli mekansal ve zamansal ölçeklerde biyolojik çeşitlilikteki kirlilik ve değişiklikler hakkında açıklamalara izin vermektir. Biyoindikatörlerin / biyomonitörlerin saha bağımlılığı genellikle farklı popülasyon yapıları ve iklim, toprak ve gıda koşulları ile karakterize edilen farklı biyotoplardan etkilenir (Markert vd., 2003).

Politikacıların ve yönetimlerin çevrenin kalitesi hakkında bilgiye ihtiyacı vardır. Ve bu bilgiyi, ya hasarın erken bir aşamada tespit edilmesi için bir erken uyarı sistemi olarak kullanmak ya da iyileştirme önlemlerinin başarısını izlemede kullanmak için

eğilimler hakkında bilgiye ihtiyaçları vardır. Gerekli bilgiler, kimyasal kirliliğin yanı sıra çevrenin yapısal değişiklikleri ile ilgilidir. Kimyasal kirlilik, farklı ortamların kimyasal analizi ile ölçülebilir. Biyotopların hasar görmesi veya kaybı gibi diğer değişikliklerin miktarının belirlenmesi daha zordur. Organizmalar çevrede yaşar ve kimyasal veya yapısal olarak çevresel koşullardaki değişiklikleri son derece entegre bir seviyede yansıtır. Organizmaların kimyasal ve yapısal değişiklikler de dahil olmak üzere çevreleriyle etkileşimlerinin tüm yönlerine dayanan bu tepkisi, politikacıların ve yönetimlerin ihtiyaç duyduğu önemli bilgileri sağlamak için kullanılabilir. Bu nedenle biyoindikatörler ve biyometreler, sürdürülebilir kalkınmanın çevresel sütununu resmetmek için kullanılabilir (Markert vd., 2003).

1.3.2. Biyoindikatörler

Biyoindikatör, çevre kalitesinin nicel yönleri hakkında bilgi içeren bir organizma veya bir organizmanın bir parçasıdır veya bir organizmalar topluluğudur. Metallerin ekosistemler için önemi, hava, su ve topraktaki metal seviyeleri ve organizmalar üzerindeki potansiyel etkileri ölçülerek değerlendirilebilir. Uygulamada, biyoindikatörler, sürekli olarak maruz kaldıkları çevresel koşullar hakkında sonuçlar oluşturmak için kullanılabilecek herhangi bir hayvan, bitki veya mikrobiyal sistem olabilir (Stankovic ve Stankovic, 2013). Hodgkinson ve Jackson (2005)'a göre bir biyoindikatör, bir çevrenin biyotik ve / veya abiyotik kirlilik seviyelerini yansıtan bir tür veya türler grubudur. Metal kirliliği biyoindikatörleri olarak kullanılan organizmalar belirli kriterleri karşılamalıdır: vücut büyük miktarlarda toksik metalleri sürekli olarak biriktirmeli ve tolere etmelidir, onu toprak, hava ve su için gerçek bir "indikatör" yapmak için tek bir yere bağlanmalıdır. Çevre alanı; toplama, tanımlama ve işleme için mevcut olmalıdır; kimyasal analiz için yeterli dokuya ve daha uzun bir süre boyunca numune almayı sağlamak için uzun bir ömre sahip olmalıdır.

Canlı organizmalar genellikle toksik metal biyoindikatörleri olarak bilinir ve metallere maruziyetleri seviyeler veya etkilerle ölçülebilir. Bitki ve hayvanların biyoindikatör olarak yaygın gelişimi ve uygulaması, özellikle 1960'lardan beri kuşlar, yumuşakçalar ve memeliler gibi çeşitli hayvanlar kullanılarak meydana gelmiştir (Holt ve Miller 2011). Burger (2006)'in incelemesinde gösterildiği gibi, biyoindikatör kağıtlarının % 40'ından fazlası metal kirliliği hakkındadır, burada balıklar, bitkiler,

omurgasızlar ve memeliler baskın olarak kullanılan biyoindikatör türlerdir. Suda yaşayan metal kirliliği için yaygın olarak kullanılan biyoindikatörler esas olarak plankton, böcekler, yumuşakçalar, balıklar, bitkiler ve kuşlar gibi organizmaları içermektedir (Zhou vd., 2008; Lam ve Wang 2008; Jovic vd., 2011; Hargreaves vd., 2011; Joksimovic ve diğerleri 2011a, b; Markovic vd., 2012; Joksimovic ve Stankovic 2012; Kitowski vd., 2012). Son birkaç on yılda hava, toprak ve su kirliliği araştırmalarında biyoindikatör olarak daha yüksek bitkiler, hayvanlar, algler, mantarlar, bakteriler ve liken kullanılmıştır. Biyoindikatörlerdeki metal içeriği yalnızca hava, su, toprak, tortu ve çevre koşullarındaki metal konsantrasyonlarına değil, aynı zamanda organizmaların biyolojik faktörlerine de bağlıdır. Toksik metallere maruz kalma ile ilişkili en büyük sorunlardan biri, bazı organizmalar için yalnızca çevrede bulunan toksik metallere göre daha fazla maruziyete neden olan biyolojik birikim ve biyo-büyütme potansiyelleridir.

Kirliliğin iyi bir biyo-göstergesi olarak kabul edilebilmesi için, seçilen türlerin Cossa (Cossa 1989) veya Rainbow (1993) tarafından listelendiği üzere bir dizi kriteri karşılaması gerekir:

- Sentinel organizma, kirletici maddelerin net güçlü biriktiricileri olmalıdır ve vücut dokularındaki bir kirleticinin toplam konsantrasyonunu düzenlememelidir;
- Çalışma alanının gerçek bir temsilcisi olması için hareketsiz olmalıdır;
- İlgi alanlarında makul ölçüde bol olmalıdır;
- Bir yıldan fazla sınıftan örneklemeye izin vermek için yeterince uzun bir ömre sahip olmalıdır;
- Kimyasal analizler için yeterli doku sağlayacak kadar büyük olmalıdır;
- Ön konsantrasyon olmadan doğrudan ölçüme izin vermek için yeterince biyolojik olarak birikmelidir;
- Laboratuvar çalışmaları veya alan transplantasyonunun neden olduğu stresle başa çıkmaya dirençli olmalıdır;
- Laboratuvar çalışmaları veya alan transplantasyonunun neden olduğu stresle başa çıkmaya dirençli olmalıdır;
- Organizmadaki ve çevreleyen ortamdaki kirletici madde seviyesi arasında bir korelasyon bulunmalıdır;
- Fizikokimyasal parametrelerdeki çevresel değişikliklere maruz kalmaya toleranslı olmalı ve bu varyasyonların organizma üzerindeki etkileri bilinmelidir.

-Çoğunlukla biyoindikatör olarak kullanılan hayvan türleri zooplankton, omurgasızlar ve omurgalılarıdır. Hayvan türleri, su ekosistemlerinin göstergesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, hayvanların metal birikimi, MT'lere bağlanarak metal inaktivasyonu nedeniyle bu kirletici maddeleri alımlarından sonra doğrudan salma kabiliyetlerinin sınırlı olması nedeniyle tercih edilir (Zhou vd., 2008).

Plankton, okyanus akıntıları içinde ve diğer su kütlelerinde serbestçe yüzen fitoplankton ve zooplankton mikroskobik organizmalarından oluşur. Sucul besin zincirindeki birincil besin kaynağı, enerjiyi (güneş ışığından), inorganik kimyasalları (nitrojen gibi) ve çözünmüş karbondioksit gazını karbonhidratlara dönüştürmek için klorofil kullanan fitoplanktondur. Fito ve diğer planktonlar, zooplanktonların besinidir. Zooplankton cinsi Daphnia, hem fitoplankton tükettiği hem de omurgasız ve omurgalı avcılar için bir besin kaynağı oluşturduğu için tatlı su trofik zincirinde önemli bir bağlantıdır. Tatlı su Daphnia magna, sucul toksikolojide test organizması olarak en eski ve en yaygın kullanılan zooplankton türlerinden biridir (Ratte ve diğerleri 2003). D. magna, sudaki Cu, Cd, Zn ve Se gibi toksik metaller üzerinde akut ve kronik testlerde en yaygın olarak test edilen tatlı su türüdür (Lam ve Wang 2008).

Yumuşakçalar, her yerde bulunan dağılımları ve muazzam tür sayıları nedeniyle dünyanın farklı su ve karasal ekosistemlerinde önemli ekolojik roller oynamaktadır. Yumuşakçalar temelde bir deniz hayvanları grubu olmasına rağmen, karasal ve tatlı su ekosistemlerinin kalitesi hakkında bilgi elde etmek ve çevrelerindeki kirleticileri ölçmek için karasal ve tatlı su yumuşakçaları da başarıyla kullanılmıştır. Bu özellikle en çeşitli iki yumuşakçalar, karından bacaklılar ve çift kabuklular için geçerlidir (Moloukhia ve Sleem, 2011).

Karındanbacaklılar, karasal ekosistemlerdeki tek yumuşakçalar sınıfını temsil ederler ve bu nedenle salyangozlar, bu ortamlarda biyoendikasyon ve biyo-izleme amacıyla kullanılabilen tek yumuşakçadır. Metal kirliliğinin birikim göstergesi olarak özellikle karasal salyangozlardan yararlanılabilir. Fritsch vd. (2011) kuru salyangozunda Cd, Cu, Pb ve Zn konsantrasyonlarını ve bir otçul ve bir etçil olan cam salyangozu sırasıyla karşılaştırmıştır. Sonuçlarına göre, salyangozlarda ve küçük memelilerde toksik metal birikimi, hayvanların ekolojik (beslenme, habitat ve hareketlilik) ve fizyolojik (toksik metallerin asimilasyon ve atılımı) özelliklerine tabidir (Fritsch vd., 2011).

Diyet, hayvanların dokularındaki metal seviyelerini etkileyen en önemli faktör

gibi görünmektedir. Genellikle, bitkilerde ve hayvanlarda daha düşük trofik seviyelerden daha yüksek metal seviyeleri, balıklar, kuşlar ve memeliler gibi daha yüksek seviyeli hayvanların dokularında daha yüksek metal konsantrasyonları anlamına gelir.

Balıklar, trofik zincirdeki en üst konumlarından ve insanlar için besin olarak rollerinden dolayı sucul toksikolojide test organizmaları olarak kullanılır. Balıklarda, Mn, Co, Fe, V, Cu, Zn ve Se gibi eser metaller metabolik süreçler için küçük miktarlarda gereklidir, ancak gerekli olmayan elementler olarak Ni, Pb, Cr, Cd, Hg biyolojik bir rol oynamaz. balık ve belirli konsantrasyonların üzerinde toksik hale gelir. Balıklar, çevresel değişikliklerin iyi tanınan biyo-göstergeleridir ve su izleme programları için yeterlidir (Hauser-Davis vd., 2012). Şu anda, tatlı su türleri için balık toksisitesi verilerinin ana veri tabanı mevcuttur. Tatlı su balıkları ve deniz balıkları türlerinin toksisite verilerinin karşılaştırmalı çalışmaları, test edilen maddelerin çoğu için deniz türlerinin tatlı su türlerine göre daha hassas olduğunu göstermektedir (Chovanec vd., 2003). Solungaçlar, karaciğer, böbrek ve kas balıkları, toksik metal araştırmalarında en çok kullanılan organlardır. Birçok balık türünün hareketliliği, yalnızca kirliliğin kesin kaynağını değil, aynı zamanda kirliliğe maruz kalma zamanını ve süresini de belirlemeyi zorlaştırır.

Kuşlar, ağır metal biyoindikatörleri olarak önemli bir rol oynayabilir. Kuşların genel biyolojisi ve ekolojisi iyi bilinir ve kuşların tanımlanması kolaydır, ancak kuşlar, metal biyoindikatörleri kadar sık kullanılırlar. Bir dezavantaj, birçok türün göçmen olması ve maruziyetin nerede meydana geldiğinin belirlenmesini zorlaştırmasıdır (Burger ve Gochfeld, 2004).

Memeliler, biyo-izleme amaçları için yararlı organizmaları temsil eder ve hem zamansal hem de uzamsal bilgi gerekli olduğunda kullanılabilir. Memeliler sınıfının sayısız üyesi arasında, serbest dolaşan hayvanlar veya 'vahşi yaşam', bir biyomonitörün gereksinimlerine en iyi şekilde uyar. Bunun nedeni, yaşam alanlarında yalnızca yiyecek, su ve havanın kalitesine bağlı olmalarıdır. Yerel toprağı, suyu ve hava kirliliğini yansıtan flora veya faunayı tüketirler. Mevcut herhangi bir kontaminasyon, hayvanı etkileyecek ve sağlığı üzerinde bir etkiye sahip olabilir. Memelilerdeki metal toksik seviyeleri diyet bileşimlerine bağlıdır ve başka hayvanları ve / veya bitkileri yiyorlarsa genellikle besin zinciri etkilerinden etkilenir.

Biyoindikasyon, bir organizmanın, bir organizmanın bir kısmının veya bir

organizma topluluğunun, çevresinin kalitesi hakkında bilgi elde etmek için kullanılmasıdır. Bu nedenle, biyoidikatörlerin kullanımı, doğal çevrenin tanımlanmasına ve insan etkilerinin tespit edilmesine ve değerlendirilmesine yardımcı olmalıdır. Stankovic ve Stankovic (2013) 'de sunulan tüm sonuçlar göz önüne alındığında, Zn, Cu, Pb, Cd ve Hg'nin hava, su ve toprak biyoidikatörlerinde en yoğun şekilde incelenen elementler olduğu sonucuna varılabilir.

1.4. *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)

Ova kurbağası olarak bilinen *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) Ranidae familyasının bir üyesidir. Familya tür sayısı olarak geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Tür Orta ve Güney Avrupa ile Kuzey Afrika ve Batı Asya'da; Türkiye'de ise uygun yaşam ortamı bulduğu büyük bir alanda yayılım göstermektedir (Şekil 1; Baran ve Atatür, 1998).



Şekil 1. *Pelophylax ridibundus*'un coğrafi dağılım alanı (Kuzmin vd., 2009)

Yaşam ortamı olarak suya yakın yerlerde dağılım göstermekte olan türün sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Alt şube: Vertebrata

Sınıf: Amphibia

Takım: Anura (Kuyruksuz Kurbağalar)

Familya: Ranidae (Su Kurbağaları)

Cins: *Pelophylax*

Tür: *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Ova Kurbağası)

1.4.1. Ova Kurbağası'nın Biyo-ekolojisi

Ülkemizde göl, nehir, dere ve çay gibi sucul alanlarda yaşamlarını sürdüren Ranidae familyasına (gerçek su kurbağaları) ait birçok kurbağa türü bulunmaktadır (Başoğlu vd., 1994). Bu türlerden bir tanesi olan Ova kurbağası, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) Orta Avrupa ve Batı Asya'da olduğu gibi Türkiye'de de geniş bir dağılım alanına sahiptir.

Erkek bireylerde ağız kısmının arka kısmında timpanal zarın arkasında gri renkli dış ses keseleri mevcuttur. Türkiye'de bulunan farklı Ranidae türlerinden ayrı olarak başın yan tarafında temporal şerit bu türde görülmemektedir. Genel olarak ovalık sahalarda, iç sulara yakın alanlarda yaşamlarını sürdürürler. Bitki yoğunluğunun fazla olduğu sulak alanlarda yaşayıp, yaklaşıldığında hızlıca suya dalarak saklanırlar. Ticari olarak toplanan önemli bir kurbağa türüdür. En fazla 2250 m yükseklikte tespit edilmiştir (Budak ve Göçmen, 2008). Bu türe ait bireylerde kulak zarı her zaman bariz bir özelliktir. Arka bacakları uzundur. Arka ayakları su içerisinde de yaşadıkları için tam perdeli olup, derileri pürüklü bir yapıya sahiptir. Erkek bireylerde dış ses keseleri vardır. Ayrıca, erkeklerin dişilere göre bir diğer farkı da ön bacaklarının daha kuvvetli olması ve birinci parmaklarının kaide tarafında şişkinlik bulunmasıdır. Çok çeşitli ve değişik renk tonuna sahip olabilen bu türe ait bireylerin sırtları genelde yeşile yakın gri bir renk veya kahverengi tonlarından oluşan bir renge sahiptir (Başoğlu ve diğerleri, 1994: 221). Bazı kurbağaların, sırtlarının ortasından açık renkli bir şerit geçebilir. Karın bölgesi ise sarımsı veya kirli beyaz bir renkten oluşur. Erkek kurbağalar üreme dönemlerinde oldukça seslidir, dişiler ise pek ses çıkarmazlar ya da sesleri hırıltı şeklindedir. *P. ridibundus*'ta ses keseleri başın yan tarafında yer alır. Çiftleşme olayı

kurbağalarda birkaç dakika kadar kısa sürebileceği gibi birkaç gün de sürebilir. Bu olay erkek kurbağanın ön bacakları ile dişi kurbağayı koltuk altı bölgesinden veya kalçasından tutması ile gerçekleşir (Budak ve Göçmen, 2008). Dişi kurbağanın yumurtalarını çıkardığı esnada erkekte spermlerini yumurtaların üzerine bırakır. Erkek kurbağalar çiftleşme esnasında dişi kurbağaları tuttıkları için ön bacakları daha güçlüdür.

Pelophylax ridibundus IUCN (Uluslararası Doğa Koruma Birliği) kırmızı listesinde neslin devamlılığı açısından en az endişe (least concern) duyulan türler arasında belirtilmiştir (Kuzmin vd., 2009).

1.4.2. Biyoindikatör Olarak Ova kurbağası

Çeşitli antropojenik kirlilik türleri de dahil olmak üzere ekolojik faktörlerin, belirli bir habitattaki hayvanların fizyolojisini etkilediği gösterilmiştir. Dış stresörlere dinamik olarak tepki veren kandaki parametrelerdeki değişikliklerin incelenmesi, verilerin biyolojizleme sisteminde kullanılmasını mümkün kılar (Cabagna vd., 2005, Card ve Hippard 2007; Lajmanovich vd., 2012; Zhelev 2012a). Hematolojik göstergeler çok spesifik ve dar parametreler içinde dalgalanırlar (Cül vd., 2011; Machapatra vd., 2012), bu da organizma ve ekosistem seviyelerinde yer alan farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde belirteç olarak kullanılmalarına izin verir (Peskova, 2001; Zhelev vd., 2006; Lajmanovich vd., 2008). Amfibiler, özellikle Ranidae (Rafinesque-Schmaltz, 1814) ailesinin üyeleri, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerini tam olarak geliştirmişlerdir (Manning ve Horton, 1982), yüksek düzeyde şehirleşme ve kirliliğe (Vershinin, 2007) dayanabilirler, bu da onları uygun biyoindikatör yapar.

Küresel olarak; son birkaç on yılda birçok amfibi popülasyonu ve türü azalmış veya yok olmuştur (Houlahan ve Findlay, 2000). Çevresel etkinin, amfibi düşüşlerine neden olan faktörlerden biri olduğu öne sürülmüştür (Carey ve Bryant, 1995). Anuranlar, kurbağalar ve kara kurbağaları muhtemelen dünyadaki en hassas hayvanlardan biridir ve çevrelerindeki önemli değişikliklere çok hızlı tepki verirler. Ayrıca ait oldukları ekosistemlerin hayati parçalarını oluştururlar. Bu nedenle ekosistemlerinin sağlık durumunu "gösteren" türler "indikatör tür" olarak kabul edilirler.

Dünya çapındaki kurbağa popülasyonlarında dramatik düşüşler ve yok oluşlar (Houlahan vd., 2000) ve kurbağalarda fiziksel veya üreme anormalliklerinin yüksek

sıklığı (Ankley vd., 2004), diğer faktörler arasında, pestisitler gibi özellikle tarım kimyasallarının kullanımı ile doğrudan veya dolaylı olarak tarımsal faaliyetlerle ilişkili olabilir. (Fellers vd., 2004). Amfibi popülasyonlarındaki düşüşlerin nedenleri hala çözülmemiş olsa da, son araştırmalar bunları açıklamak için altı ana hipotez öne sürüyor: (1) habitat tahribatı; (2) kimyasal kirleticiler, özellikle pestisitler; (3) artan UV radyasyonu; (4) iklim değişikliği; (5) egzotik avcılarını tanıttı; ve (6) hastalık, özellikle patojenik kirit mantarı (Marsh ve Pearman 1997; Berger vd., 1998; Ankley ve diğerleri 2004; Fellers vd., 2004). Kurbağaların çevresel kalitenin biyo-göstergesi olarak hareket etmesi muhtemeldir ve belirli alanlardaki insan faaliyetlerinin etkisini değerlendirmek için kullanılabilir.

P. ridibundus popülasyonlarındaki kanın morfolojik içerikleri, çevrenin biota bileşenlerine uzun vadeli etkisini yansıtan oldukça bilgilendirici bir göstergedir ve çeşitli su havzalarındaki koşulları değerlendirmek için biyo-gösterge olarak kullanılabilir. antropojenik kirlilik dereceleri ve türleri ve ayrıca fizikokimyasal analizden elde edilen verilere ek olarak veya ekosistemlerdeki koşulların bireysel bir birincil değerlendirmesi olarak da kullanılabilir (Zhivko vd., 2013).

1.4.3. Gıda Olarak Kurbağa ve İnsan Sağlığı

Tüm amfibiler arasında sadece Ranidae familyasına ait kurbağa türlerinin yenilmesi uygundur, çünkü çoğu kurbağa türü hem küçük olup hem de insanlar için toksik etkisi vardır (Neveu, 2009).

Her ne kadar ülkemizde tüketimi yaygın olmasa da özellikle Avrupa ülkelerinde kurbağa bacağı bu mutfakların en çok tercih edilen gıdalarından biridir. Türkiye’de ise yabancı turistlere hizmet veren restoranlarda kurbağa bacağı bir öğün olarak servis edilmektedir. Eti yenebilen kurbağa olarak da çoğunlukla ova kurbağası (*Pelophylax ridibundus*) bilinmektedir. Çiftliklerde üretilen veya doğadan toplanan bu kurbağanın yiyecek olarak tüketilmesi, dokularında biriktirebileceği ağır metallerden dolayı insan sağlığı açısından bir risk barındırıp barındırmağı sorusunu akla getirmektedir. Buna rağmen literatürde, bu kurbağanın insan sağlığı ve çevre açısından bir risk değerlendirmesi henüz araştırılmamıştır.

Kurbağalar, yağ oranı düşük, yüksek protein ve mineral içeriği ile besleyicidir (Özogul vd., 2008). Bu olumlu yanlarına rağmen, tüketici sağlığı için risk

oluşturabilecek ağır metaller gibi çeşitli kirletici maddelerin önemli bir kaynağı da olabilir (Loumbuirdis ve Wray 1998; Borković-Mitić vd., 2016; EFSA, 2012). Nitekim yapılan çalışmalarda kurbağa tüketiminin, tüketiciler için ağır metallere kalma kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Loumbuirdis ve Wray 1998; Borković-Mitić vd., 2016; EFSA, 2012). Bu sebepten, insanlar tarafından tüketilen diğer besinler gibi kurbağaların da yenilebilir dokularında ağır metal konsantrasyonlarının devamlı olarak izlenmesi önem arz etmektedir.

1.5. Literatür Özeti

Suyun kimyasal olarak incelenmesi, ortamdaki metal konsantrasyonlarına dair hayati veriler sağlayabilir, ancak hedef canlılardaki kirleticilerin toksisitesini ve ekosistem üzerindeki etkilerini değerlendirmede yetersiz kalacaktır. (Pereira ve vd., 2009; Bartoskova vd., 2013; Fazio vd., 2014; Prokić vd., 2015). Metaller genel olarak su ortamlarında karmaşık kirletici karışımlarında bulunur. Yalnız kimyasal incelemelerle tahmin edilmesi zor olan canlı organizmalar üzerinde karmaşık etkiler yapabilirler (Orbea vd., 2002; Aliko vd., 2015). Çevredeki bazı metallerin ortamda bulunması genellikle insan faaliyetlerinden kaynaklanır ve organizmalarda birikmesi biyolojik organizmaların sürekli olarak metallere maruz kaldığı anlamına gelir. Dokulardaki metal konsantrasyonu yakın zamanda maruz kalmanın iyi bir göstergesidir.

Çevresel kirleticilere maruz kalınması, amfibilerin küresel azalışına katkıda bulundu ve amfibi toksikolojik araştırmalarına sebep oldu. (Sparling vd., 2010). Metaller, çevresel organizmalarda toksisite ve canlı organizmalarda birikme eğiliminden dolayı büyük bir problemdir (Devier vd., 2005). Madencilik, dökümhane atıklarının bertarafı ve çeşitli yan ürünler, otomobil egzoz dumanları ve gübreler gibi çeşitli insan faaliyetleri, metallerin çevreye salınmasından sorumludur (Loumbourdis, 1997).

Amfibi türleri, sudaki kirlenmeyi gösterme açısından diğer su omurgalılarından daha hassas biyoindikatörlerdir, çünkü geçirgen derileri sayesinde çevreden maddeleri kolayca emerler. Kurbağaların doğal yaşam alanı, çevredeki ortamdan tahliye edilen önemli miktarda toksik ağır metal yükü biriktirmektedir. Kurbağalar metalleri, sudan ve suda asılı yiyeceklerden, çözünmüş metalleri cilt üzerinde iyon değişimi ile doku ve zar yüzeyleri tarafından adsorpsiyon yoluyla asimile eder. Ağır metal birikimi metalin

çeşidine, ortamdaki derişimine, canlının maruz kalma süresine, türün beslenme durumuna, yaşına, gelişme evresine, metabolik aktivitesine, organlara, suyun fiziko-kimyasal özelliklerine ve ortamda bulunan diğer metallere bağı olarak değışir. Metallerin atılımı dışkı, idrar ve solunum membranları yoluyla gerçekleşir. Metallerin farklı dokular arasında dağılımı maruz kalma moduna (diyet ve / veya sulu maruz kalma) bağıdır ve kirliliğin bir göstergesi olarak işlev görebilir. Biyoakümülyasyon sırasında alım, depolama ve elimine etme dahil olmak üzere çeşitli süreçler uygulanmaktadır (Birungi vd., 2007). Ağır metallerin sucul canlıların dokularındaki miktarı biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon nedeniyle sudaki miktara göre 106 kat daha fazla olabilir (EPA, 2000). Bu miktar besin zinciri yoluyla artarak insanlara kadar ulaşabilmektedir (Heier vd., 2009; Matta vd., 1999; Medeiros vd., 2012). Sadece birkaç çalışma, metallerin maruz kaldığı serbest yaşayan kurbağalarda ağır metallerin oksidatif stresin biyobelirteçleri üzerindeki etkilerini incelemiştir (Taiwo vd., 2014).

Metal iyonlarının oksidatif stresi indüklemeye kabiliyeti, metal toksisitesinin mekanizmalarından biri olarak önerilmiştir (Triquet vd., 2013). Bu mekanizma, doğrudan Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla, dengesiz reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve redoks inaktif metallerin (Cd, Pb) oluşmasıyla doğrudan Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile etkiyen redoks aktif metalleri (Fe, Cu, Cr ve Ni) içerir. , Zn ve Hg, antioksidan savunma sisteminin (AOS) değıştirilmesiyle dolaylı olarak etki eder (Valko vd., 2005; Torre vd., 2013). AOS, enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), faz II biyotransformasyon enzim glutatyon-S-transferaz (GST)), düşük moleküllu bileşiklerden oluşmaktadır. Tümü metalin zararlı etkilerinin korunmasında, nötrleştirilmesinde ve uzaklaştırılmasında önemli bir role sahip olan antioksidanlar (E vitamini, askorbik asit, glutatyon (GSH) ve protein olmayan tioller (sülfhidril (SH) grupları) organizmalarda oksidan strese neden olur (Winston ve Di Giulio, 1991). AOS'un durumu suda yaşayan organizmalarda ağır metaller tarafından üretilen oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak hizmet etmiştir (Falfushinska vd., 2008). Kolinesterazlar (ChE-asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz), sinir impuls iletiminde önemli bir rol oynar ve genellikle nörotoksisite göstergeleri olarak kullanılır (Triquet vd., 2013). Ağır metallerin ChE faaliyetlerini değıştirebileceğine dair kanıtlar vardır ve olası mekanizmalardan biri, metallerin ChE proteinlerinin çeşitli post-translasyon sonrası değışimlerini etkileme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır (Richetti vd., 2011).

Amfibiler, tüm yaşam aşamalarının sudaki toksik maddelerin dermal absorpsiyonuna karşı duyarlı olmaları nedeniyle çevresel kirlenmelere karşı oldukça duyarlıdır (Sotomayor vd., 2012). Ayrıca, besin zincirinin tepesine yakındırlar ve ana besin kaynağı olan omurgasızlar, kirleticilerin önemli bir kaynak ve giriş yoludur (Papadimitriou ve Loumbourdis, 2002). Tüm bu faktörler, kurbağaları, su kirliliği ve ekosistem sağlığının yanı sıra çevresel ve biyomedikal araştırmalar için de faydalı modeller olarak mükemmel biyo-göstergeler olarak ortaya koymaktadır (Hermes-Lima ve Storey, 1998). Kurbağalar su içmezler, ancak suyunun çoğunu ventral cilt yoluyla alırlar. Böylece, amfibi cilt kurbağalar üzerindeki metal etkisi çalışmalarında önemli bir yer alır. Amfibiler uzun süre su altında kalmaya devam eder ve sudaki kalitatif ve kantitatif metal dinamikleri tarafından etkilenir. Metaller su geçirgen cilde girebilir ve biriktikleri farklı dokularda kan dolaşımı yoluyla yeniden dağıtılır (Papadimitriou ve Loumbourdis, 2002). Metal biriktirme çalışmalarında kas yaygın olarak kullanılmaz, ancak insan diyetindeki kullanımı ışığında metal birikimini değerlendirmek için önemli bir dokudur. Birçok kültür, mutfağında kurbağa kaslarını kullanır. 1996-2006 yılları arasında elde edilen veriler, hem vahşi hem de çiftçilik kaynaklarından 100.000 metrik tondan fazla kurbağa bacağı ithal edildiğini göstermiştir (Gratwicke vd., 2010). *P. esculentus* kompleksinin kurbağaları, dünya çapında tüketilen amfibi türlerine aittir. Avrupa ülkeleri (Fransa, Belçika, Hollanda ve İtalya) bu türün önde gelen ithalatçıları ve tüketicileridir (Schlaepfer vd., 2005). BM, Sırbistan'ı kurbağa bacaklarının ihracatçısı olarak belirledi (UN, 2007; daha fazla bilgi için Carpenter vd., 2007). Kurbağaların kas dokusu da örnekleme için kolaydır ve farklı analizler için yeterli miktarda malzeme sağlar.

Sayısız araştırma, *P. esculentus* kompleksini (özellikle, *P. ridibundus* ve *P. esculentus*'ta) ağır metaller ve diğer kirleticilerle kirlenmenin iyi biyoindikatörleri olarak seçmiştir (Vogiatzis ve Loumbourdis, 1998; Papadimitriou ve Loumbourdis, 2002; vd., 2008; Shaapera vd., 2013). Vogiatzis ve Loumbourdis (1997, 1998), bu kurbağaların Lower ve Kendall (1990) tarafından listelenen biyoindikatör türleri için tüm kriterleri karşıladığını göstermiştir.

Ağır metallerin zararlı etkilerinden dolayı çeşitli resmi kuruluşlar tarafından halk sağlığının korunması için kılavuzlar geliştirilmesine yol açmıştır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/FAO ve Dünya Sağlık Örgütü/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından Cu, Pb, As, Zn, Cd için vücuttan hızlı bir şekilde

temizlenemeyen ve bir ömür boyu kayda değer bir risk olmadan alınabilen geçici tolere edilebilir haftalık alım (PTWI) miktarlarının sırasıyla 3,5; 0,025; 0,015; 7,0; 0,007 mg/kg/v c t ağırlığı şeklinde belirlemiştir (JECFA 1982, 2011a,b). Ağır metallerin insan vücudunda toksisite için kritik hedef böbrek ve karaciğerdir. Diğer hedef organlar arasında sinir sistemi, bağışıklık sistemi, üreme ve gelişim sistemleri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar ağır metallerin çocukların sağlığı ve gelişimi üzerine bazı spesifik olumsuz etkilerini ortaya koymuştur. Ayrıca, As, Pb ve Cd gibi ağır metaller Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından insanlara kanserojen olarak kabul edilir (IARC, 1993).

Sanayinin gelişmesiyle birlikte, teknolojik-kirletici g  su, toprak ve hava sistemlerinin kirlenmesine neden olmuştur. Endüstriyel ve santral atıklarının yanı sıra nakliye egzozları, toprakta ve su biyotoplarında biriken ağır metaller gibi toksik maddeler içerir. Biyokimyasal işlemlere katılmaya göre, metaller iki gruba ayrılabilir: (1) normal büyüme, gelişme ve üreme süreçlerine katılan metaller, ancak yüksek konsantrasyonlarda (molibden, bizmut, manganez, kobalt, canlı organizmalar üzerinde toksik etkiye sahip olan metaller) bakır, çinko ve krom) ve (2) metaller canlı organizmaların biyokimyasal işlemlerinde önemli bir rol oynamamakta ve düşük konsantrasyonlarda yüksek toksisite göstermektedir. Uzun süreli bir teşhir sırasında (kadmiyum, kurşun ve cıva) bir organizmada birikebilirler (Elinder ve Piscator, 1978),

Kadmiyum ve krom, yayılmış toksik kirletici maddelerdir. Doğal (kayalar, yer altı suyu) ve endüstriyel de dahil olmak üzere birçok kaynaktan su biyotoplarına girerler ve agutik hayvanların ve bitkilerin organlarında birikebilirler. Kadmiyum ve kromun (Cr (VD) toksik etkileri amfibi türlerinde kötü çalışılmıştır (Selvi ve vd., 2003; Rollins-Smith vd., 2004; Snodgrass vd., 2005; Stacy vd., 2005; Sura vd., Mouchet vd., 2007; Sharma ve Patino, 2008).

Amfibiler, birçok ekosistemin kilit bir bileşenidir ve ortadan kaybolmaları, ekosistemleri sürdürülebilir bir temelde yönetme çabalarını karma ıkla tırabilir (Corn, 1994). Amfibiler, sudaki toksik ajanların varlığını tespit etmek için biyoidikat rler olarak yaygın şekilde kullanılır, çünkü yüksek hassasiyetleri onları sucul ortamların genotoksisite izlemesi için ideal kılar (Stacy vd., 2005; Sura vd., 2006; Edwards vd., 2006; Zhang vd., 2007; Chen vd., 2007).

Ülkemiz mutfağında kurbağa eti yer almamasına karşın, özellikle bazı Avrupa  lkelerinde sevilerek tüketilmesi ve talep edilmesi nedeniyle bu türler uzun yıllardır

doğadan yakalanmakta, canlı kurbağa veya kurbağa bacağı olarak ihraç edilmektedir (Şereflişan ve Alkaya, 2016). Günümüzde kurbağa ihtiyacının yetiştiricilik yoluyla sağlanması daha da önem kazanmıştır. Yaban kurbağa popülasyonu yaşam alanı tahribatı, predatörlerin varlığı, UV-ışınları artışı, radyasyon, asit yağmurları, olumsuz hava koşulları, doğanın kirliliği, enfeksiyöz hastalıklar ya da bunların kombinasyonları nedeniyle azalmıştır (Daszak vd., 1999). Küresel amfibi değerlendirilmesine göre de amfibi popülasyonunun %43'ünün azalmış, %32'sinin yok olma tehdidi altında olduğu bildirilmiştir (Schloegel vd., 2010).

Loumbuirdis ve Wray (1998) araştırmacıları Kuzey Yunanistan'ın küçük bir nehrinde yaşayan bir *P. ridibundus* popülasyonunda bireylerin dokularındaki 14 ağır metalin konsantrasyonunu araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre karaciğerde önemli miktarda daha fazla miktarda bakır (1041 ± 153 mg / kg kuru ağırlık), kobalt (6 ± 0.1 mg / kg), molibden (22 ± 7 mg / kg), krom (41 ± 11 mg / kg) ve kadmiyum (2 ± 0.2 mg / kg), karkasta ise önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda alüminyum (303 ± 67 mg / kg), manganez (164 ± 38 mg / kg), nikel (27 ± 3 mg / kg), stronsiyum (30 ± 3 mg / kg) içerdi. 419 ± 34 mg / kg) ve baryum (93.1 ± 1 mg / kg) tespit etmişlerdir *P. ridibundus*'un dokularında metal konsantrasyonlarını ve ortamın neden olduğu olası oksidatif stres enzimlerindeki değişiklikleri belirleme amacıyla Sırbistan'da yapılan diğer bir çalışmada ise araştırmacılar 18 metalin (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg, Li, Mn, Ni, Pb, Sr ve Zn) dokulardaki (karaciğer, cilt ve kas) konsantrasyonlarını ölçmüşler Al Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Hg ve Ni konsantrasyonlarının karaciğerde Ba, Ca, Li, Mn, Pb, Sr ve Zn'nin ise ciltte en yüksek seviyede olduklarını rapor etmişlerdir (Borković-Mitić vd., 2016).

Histolojik değişiklikleri takip etmek biyoloji ve su ürünleri laboratuvarlarının en önemli çalışma alanlarından birisidir (Wester ve Canton, 1991). Ayrıca, ekonomik öneme sahip ve yetiştiriciliği yapılan Ranidae familyasına ait türlerin histofizyolojik yapısını bilmek üretim hızına önemli katkı sağlamaktadır (Arauco, De Stefani, Nakaghi ve Oliveira-Bahia, 2007; Bambozzi vd., 2004).

Karaciğer veya gonadlarda; büyüme, üreme öncesinde ve üreme sonrasında gerçekleşen değişiklikler, çevresel etkilerin yarattığı farklılıklar bu dokularda yapılan histolojik araştırmalar ile takip edilebilmektedir (Gernhofer, Pawet, Schramm, Müller, ve Triebkorn, 2001). Karaciğer, vücudun kendi metabolizmasıyla ilgili özellikle birçok işlemde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Özellikle, karaciğer metabolizma ile ilgili

olan (örn., Protein sentezi, metabolitleri depolama, safra salgılaması ve detoksifikasyon) ve hayatın devam edebilmesi için merkezi bir görev almakla birlikte belirli sindirim süreçlerinde önemli rol üstlenmektedir.

Karaciğerin sindirim sisteminde emilen besinlerin vücudun diğer kısımları tarafından işlenmesi ve diğer organlarda gerektiğinde kullanması için depo görevi de yaptığı bilinmektedir (Akiyoshi ve Inoue, 2012). Öte yandan, karaciğer glikozun glikojene dönüştürülmesinde, lipidlerin düzenlenmesinde ve amino asitlerin deaminasyonunda önemli roller oynamaktadır (Hoffman ve Katz, 1998).

Karaciğer, hayvanların sağlık ve beslenme durumlarını anlamak için anahtar görevi yapan kusursuz bir organdır. Gıda işleme ve zootekni alanında sağlık yönetimindeki aksaklıklardan kaynaklanan kurbağa etindeki hastalıklar veya bulaşıcı ajanların yapısı ile işlevini oldukça iyi yansıtmaktadır (Hipolito, Leme ve Bach, 2001; Hipolito, Martins ve Bach, 2004).

1.6. Çalışmanın amacı

Bu çalışma ile *P. ridibundus*'un dokularında ağır metal konsantrasyonunun belirlenmesi ve sağlık açısından potansiyel risk barındırıp barındırmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Ülkemizin hemen hemen tüm bölgelerinde yaşayan *P. ridibundus* üzerinde bu konu ile ilgili henüz araştırma yapılmamıştır. Bu açıdan yapılan çalışmayla literatürdeki bu boşluğun kapatılması önem arz etmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

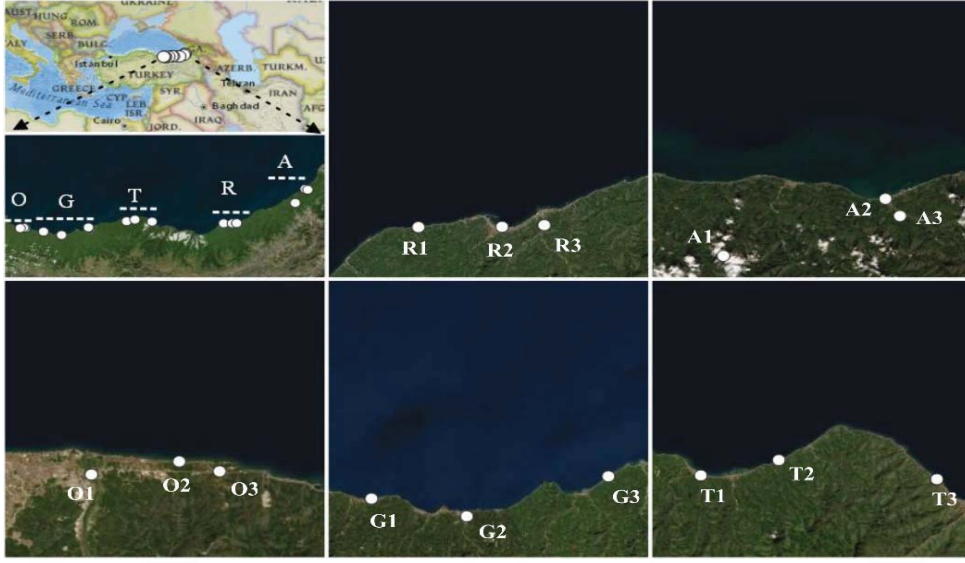
Bu çalışmada *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası, Şekil 2.) türüne ait Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu illerinden örnekler kullanılmıştır (Şekil 4). Her il için 3 farklı lokaliteden, her lokalite için 5'er örnek olmak üzere toplamda 75 örnek el veya atrap ile yakalanmıştır. Her bir örnek kilitli poşet içerisinde soğuk ortamda tutularak laboratuvara taşınmıştır. Örnekle işlem yapılana kadar -20°C de saklanmıştır.



Şekil 2. *Pelophylax ridibundus* türüne ait birey

2.1.1. Çalışma Alanları

Örnekleme yapılan alanlar GPS cihazı ile belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Örnekleme alanları. R: Rize, A: Artvin, O: Ordu, G: Giresun, ve T: Trabzon, 1, 2, 3 ait olduğu ildeki istasyon sırasını belirtmektedir.

Örnekleme istasyonlarından su örnekleri 500 ml şişelere doldurularak örneklenmiştir. Alınan su örneklerinde pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve iletkenlik parametreleri portatif bir multimetre cihazı (HACH HQ40D, Amerika) ile *in situ* belirlenmiştir. Alınan örneklere nitrik asit eklenerek analiz yapılana kadar +4 °C 'de korunmuştur.

Kurbağa popülasyonuna ait örneklendirmenin yapıldığı lokalitelerden kürek yardımıyla yaklaşık 1 kg sediment örneği alınarak kilitli poşetlere konulmuş ve soğuk ortamda tutularak laboratuvara taşınmıştır. Alınan sediment örnekleri etüvde kurutulmuş (45 °C) ve ardından havanda ezilerek homojen hale getirilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Sediment örneklerinin ağır metal analizi için hazırlanışı

2.1.1.1. Artvin Lokalitesi

Artvin ili için Sundura mahallesi Hopa, Hopa ilçe merkezi ve Arhavi bölgelerinden örnekler toplandı.

Artvin ili Hopa ilçesinde bulunan Sundura mahallesinden toplanan örneklerin bulunduğu biyotop akarsuyun oluşturmuş olduğu bir havuz ve yakınında bulunan düzlük alanlardan oluşmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Sundura biyotopu

Artvin ili Hopa ilçe merkezine ait örneklerin toplandığı biyotop şehir merkezinde yer alan bir otoparkın bulunduğu bölgede, yağmur sularının oluşturmuş olduğu geniş düz bir alana sahiptir (Şekil 6).



Şekil 6. Hopa biyotopu

Artvin ili Arhavi ilçe merkezine ait örneklerin toplandığı biyotop içerisinde yeşil alanların ve tortu birikintilerinin bulunduğu bir akarsu alanından oluşmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. Arhavi biyotopu

2.1.1.2. Rize Lokalesi

Rize ili için Derepaarı, Salarha ve Rize Merkez bölgelerinden örnekler toplanmıştır.

Rize ili Derepaarı ilçesine ait örneklerin toplandığı biyotop deniz kenarına yakın bir bölgede, yağmur sularının oluşturmuş olduğu birikintiler ve bitki örtüsüne sahip düzlük alanlardan meydana gelmektedir (şekil 8).



şekil 8. Derepaarı biyotopu

Rize merkez bölgesine ait örneklerin toplandığı biyotop şehir merkezinde, yakınında yerleşkelerin bulunduğu, yağmur sularının dönemlik olarak biriktiği bir bölgede bulunmaktadır. Bölgede bulunan su mevsimsel değişimlere bağlı olarak azalma göstermektedir (şekil 9).



Şekil 9. Rize Merkez biyotopu

Rize'nin merkez ilçesine bağlı bir belde olan Salarha geniş düzlük alanlara sahip bir bölgedir. Salarha popülasyonuna ait olan bireylerin bulunduğu biyotop yağmur sularının birikmesi ve yüksek yağışın etkisiyle akarsuların taşması ile birlikte yol kenarında bulunan su birikintisinden oluşmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. Salarha biyotopu

2.1.1.3. Trabzon Lokalitesi

Trabzon ili için Kurbağalıdere, Yalıköy, Darıca bölgelerinden örnekler toplanmıştır.

Beşikdüzü ilçesinden bulunan Kurbağalıdere popülasyonuna ait örneklerin toplandığı biyotop ıslah edilmiş nispeten geniş bir akarsu yatağından ve yatak içerisinde

bulunan küçük adalardan oluşmaktadır. Yakınlarında tarım alanları ve yerleşkelerin bulunduğu biyotop sığ bir derinliğe sahiptir (Şekil 11).



Şekil 11. Kurbağalıdere biyotopu

Yalıköy popülasyonuna ait örneklerin toplandığı biyotop deniz ile akarsuyun birleştiği kıyışeridinden oluşmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. Yalıköy biyotopu

Akçaabat ilçe sınırları içerisinde bulunan Darıca popülasyonuna ait örneklerin yakalandığı biyotop sığ bir su derinliğine ve bol miktarda tortu birikintilerine sahip bir akarsu yatağından oluşmaktadır. Akarsu içerisinde kurbağaların saklanmaları için elverişli bol miktarda yeşil alan bulunmaktadır (Şekil 13).



Şekil 13. Darıca biyotopu

2.1.1.4. Giresun Lokalitesi

Giresun ili popülasyonu Karadere Bulancak, Dereli, Tirebolu bölgelerinden örnekler toplanmıştır.

Giresun iline ait olan Karadere bölgesinden yakalanan örneklerle ait biyotop ıslah edilmiş bir akarsu alanından örneklenmiştir. İçerisinde küçük yeşil alanların bulunduğu bu alan yerleşim yerlerine yakın bir ekosistemdir (Şekil 14).



Şekil 14. Karadere biyotopu

Giresun iline ait olan Dereli ilçesinden yakalanan örneklerle ait biyotop ıslah edilmiş bir akarsuyu alanından örneklenmiştir. Kısa bitkilerin bulunduğu bu alan yerleşim yeri alanlarına yakın bir bölgede bulunmaktadır (Şekil 15).



Şekil 15. Dereli biyotopu

Tirebolu popülasyonuna ait örneklerin toplandığı biyotop yol kenarında bulunan bir kanal sisteminden oluşmaktadır. Az miktarda su birikintisi bulunduran bu biyotop içerisinde bulunan yeşil alanlar kurbağalar için uygun bir yaşam alanı oluşturmuştur (Şekil 16).



Şekil 16. Tirebolu biyotopu

2.1.1.5. Ordu Lokalitesi

Ordu ili için Turnasuyu, Sahil, Melet ırmağı bölgelerinden örnekler toplanmıştır.

Gülyalı ilçesinde bulunan Turnasuyu popülasyonuna ait bireylerin toplandığı biyotop geniş bir nehir yatağından oluşmaktadır. Kıyı bölgelerinde bulunan sık ve yeşil

alanlar kurbağalar için uygun bir yaşam alanı teşkil etmektedir (Şekil 17).



Şekil 17. Turnasuyu biyotopu

Melet popülasyonuna ait örneklerin toplandığı biyotop Melet Irmağı'nın kıyısında bulunan bir yeşil alan ve bu yeşil alanın içerisinde ki sığ su birikintilerinden oluşmaktadır (Şekil 18).



Şekil 18. Melet biyotopu

Sahil bölgesine ait bireylerin toplandığı biyotop yakınlarında bol miktarda küçük akarsuların bulunduğu, kısa bitkiler ve ağaçların yer aldığı düzlük bir alandan oluşmaktadır (Şekil 19).



Şekil 19. Ordu Sahil biyotopu

2.2. Yöntem

2.2.1. Ağır Metallerin Ekstraksiyonu

Kilitli poşetler içerisinde -20°C 'de saklanılan kurbağa örnekleri oda sıcaklığında çözünmesi için kısa bir süre bekletildikten sonra saf su ile yıkanıp kurulanmıştır. Kurbağa örneklerinin kumpas yardımıyla boy ve hassas terazi yardımıyla ağırlık ölçüleri tespit edilmiştir. Ardından kurbağalara ait karaciğer dokusu ve insan gıdası olarak tüketilen arka bacaklarından yaklaşık olarak 2'şer gram alınıp hassas terazi ile tartıldıktan sonra 75ml'lik yakma tüplerine konulmuştur. Ardından örneklerin üzerine 5ml HNO_3 (Trace metal grade %65) eklenip tüplerin ağzı polipropilen(PP) bir kapak ile kapatılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında cam tüpler 120°C 'ye ısıtılmış durumda olan blok ısıtıcıya yerleştirilip 8 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisine 2,5 mL H_2O_2 (Trace metal grade $\geq\%30$) eklenmiş olup 8 saat daha 120°C 'de bekletilmiştir. Süre sonunda PP kapaklar alınarak tüplerin içerisindeki çözelti miktarı $\sim 1,5$ mL'ye düşene kadar ısıtıcıda bırakılmıştır. Elde edilen çözeltiler, ultra saf su yardımıyla 50 ml'ye seyreltildikten sonra $0.45\ \mu\text{m}$ PTFE şırınga filtreden geçirilip ağır metal analizleri gerçekleştirilene kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir (Gedik, 2018).

2.2.2. Ağır Metal Tayinleri

Seyreltilip filtre edilmiş çözeltilerdeki metal (As, Cd, Pb, Zn, Cu, Cr) derişimlerinin belirlenmesinde ICP-MS (Perkin Elmer, Optima 7000 DV) kullanılmıştır. Öncelikle ICP-MS çoklu element stok çözeltisinden (1000 ppm) seyreltmeler yapılarak (0,05–2,5 ppm) kalibre edilmiştir. Ayrıca girişim (metal kontaminasyonu) tespiti için her 15 örnekte bir kör örnek, skandiyum (Sc) ve indiyum (In) ise internal standart olarak kullanılmıştır (USEPA, 1994).

Kurbağa dokularındaki metal derişimleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak mg kg^{-1} olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Metal derişimi (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Metal derişimi (mg L}^{-1}\text{)} - (\text{kör örnekler}) \times \text{Örnek hacmi (mL)}}{\text{Örnek ağırlığı (g)}}$$

Tespit Limitinin (TL) belirlenmesi analitik olarak tespit edilebilen en düşük limiti belirten tespit limiti, kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$X_{TL} = 3K_s$$

K_s : Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları

2.2.3. Verilerin Doğrulanması

ICP-MS ölçümlerinin doğrulanması amacıyla referans çözeltiler ve metal ekstraksiyon sonuçlarının doğrulanması ise sertifikalı referans madde (ERM CE278k, Midye dokusu) kullanılmıştır (USEPA, 1996).

Tablo 1. Sertifikalı referans maddesinin (ERM CE278k Midye dokusu) analiz sonuçları

	TL*	Referans değerleri mg kg^{-1}	Analiz değerleri mg kg^{-1}	Geri kazanım (%)
As	0,0389	6,70±0,40	6,85±0,31	102,23
Cd	0,0003	0,336±0,025	0,31±0,05	92,26
Cr	0,0559	0,73±0,22	0,68±0,32	93,15
Cu	0,0581	5,98±0,27	6,08±0,29	101,67
Ni	0,0235	0,69±0,15	0,67±0,21	97,10
Pb	0,0390	2,18±0,18	2,25±0,18	103,21
Zn	0,0754	71,00±4,00	67,00±4,01	94,36

*ppb, N=5, TL: Tespit limiti

2.2.4. İstatistiksel Analizler

Aykırı verileri tespit etmek için Boxplot tekniği kullanılmış ve aykırı bulunan veriler çıkarılmıştır. İstasyonlar arasındaki farklılıkların tespiti için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış olup, önemli farklar görüldüğünde, bu farklılıkların belirlenmesi için Tukey testi uygulanmıştır. Metaller arasındaki ilişkilerin tespiti için korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistik analizleri SigmaPlot 13 (CA, ABD) paket programı kullanılarak ve önem seviyesi % 5 olarak ($p < 0.05$) ayarlanarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Risk Tahminleri

Kurbağa bacağındaki ağır metal konsantrasyonları kullanılarak tahmini haftalık alım miktarı (EWI) belirlenmiş ve FAO / WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesi (JECFA 1982, 2011a, b) tarafından rapor edilen geçici tolere edilebilir haftalık miktar (PTWI) miktarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, kurbağa bacağı tüketimi yoluyla metallerin insan sağlığı üzerindeki riskini tahmin etmek için bir Risk Katsayısı (RK) yöntemi kullanılmıştır (USEPA, 2015). Maruz kalınan ağır metal konsantrasyonlarının, referans doz katsayılarına oranıyla hesaplanan THQ'lar, uzun vadeli kanserojen olmayan maruz kalma olasılıklarını açıklamak için kullanılmıştır (USEPA 2015). THQ değeri > 1 ise, incelenen ağır metalin sağlık açısından olumsuz etkilerinin olabileceği anlamına gelir. EWI ve THQ hesaplamaları şu şekilde yapılır:

$$EWI = 7 \times (C \times FCR) / BW$$

$$THQ = THQ = (C \times EF \times ED \times FCR) / (RfD \times BW \times EF \times ED) \times 10^{-3}$$

C, kurbağanın dokusundaki metal(oid) konsantrasyonunu belirtir (mg kg^{-1} yaş ağırlık), FCR günlük kurbağa tüketim miktarını belirtir (g). ED maruz kalma süresini belirtir (Türkiye'deki ortalama yaşam süresi 78 yıl Basara vd. (2016)), EF bir yıldaki maruz kalma süresini belirtir (365 gün), BW ortalama vücut ağırlığını belirtir (72,5 kg, Basara vd. (2016)), RfD referans doz miktarını belirtir. 10^{-3} : Çevirme faktör katsayısını belirtir.

Kurbağa bacağında tespit edilen tüm metallerin toplamının kanserojen olmayan sağlık riskini değerlendirmek için HI kullanılmıştır (Newman ve Unger 2002). HI, tüm THQ'ların toplamı olarak ifade edilir ve aşağıda formüle edilir:

$$HI = THQ_{Cu} + THQ_{Pb} + \dots + THQ_x$$

X: toplam ölçülen ağır metal sayısı (As, Cd, Pb, Zn, Cu, Cr: 6)

HI değeri > 1 ise, kurbağa bacağındaki ağır metallerin potansiyel kanserojen olmayan sağlık riski gösterebileceğini belirtir.



3. BULGULAR

3.1. Kurbağa Örneklerine Dair Bulgular

Yakalanan örneklerle ait boy ve ağırlık verileri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kurbağa örneklerine ait boy ve ağırlık bilgileri

Lokasyon	Boy (mm)	Ağırlık (g)
	Ort. $\pm$ Std. Sapma	Ort. $\pm$ Std. Sapma
Salarha	70,36 $\pm$ 16,61	44,50 $\pm$ 24,48
Derepazarı	64,45 $\pm$ 2,106	29,74 $\pm$ 4,579
Merkez	58,92 $\pm$ 12,74	24,32 $\pm$ 13,17
Kurbağalıdere	66,95 $\pm$ 16,43	34,48 $\pm$ 34,48
Darıca	69,89 $\pm$ 3,522	34,33 $\pm$ 5,651
Yalıköy	79,87 $\pm$ 15,36	57,27 $\pm$ 23,27
Dereli	59,91 $\pm$ 19,44	34,12 $\pm$ 36,54
Tirebolu	56,69 $\pm$ 12,71	17,09 $\pm$ 8,616
Karadere	60,47 $\pm$ 6,785	19,06 $\pm$ 7,057
Turnasuyu	80,84 $\pm$ 8,590	38,45 $\pm$ 15,33
Sahil	67,81 $\pm$ 17,84	35,55 $\pm$ 24,72
Melet	62,82 $\pm$ 11,52	22,36 $\pm$ 13,41
Hopa	65,14 $\pm$ 9,404	28,24 $\pm$ 13,43
Sundura	62,06 $\pm$ 17,57	23,38 $\pm$ 18,72
Arhavi	67,68 $\pm$ 8,650	33,51 $\pm$ 15,31

3.2. Lokasyona Ait Bulgular

Su örnekleri arazi şartlarında portatif bir multimetre cihazı ile pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, iletkenlik özellikleri açısından analiz edilmiştir. İlgili değerler Tablo 3’de verilmiştir.

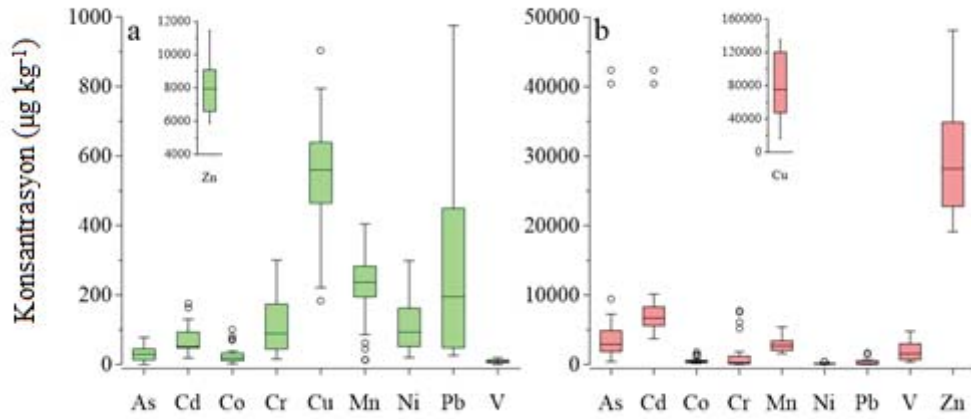
Tablo 3. Lokalitelere ait su numunelerinde bazı parametrelerin ölçüm sonuçları

Lokasyon	pH	Oksijen	İletkenlik	Sıcaklık	Hava sıcaklığı(°C)
Salarha	8,02	6,28	177,3	20,2	18
Derepazarı	8,28	5,54	133,6	21,4	18
Rize Merkez	-	-	-	-	-
Kurbağalıdere	8,01	8,7	299	18,3	21
Darıca	8,32	8,72	583	16,8	21
Yalıköy	7,91	6,74	272	16,9	21
Dereli	8,19	8,88	287	21,8	18
Tirebolu	7,44	2,52	559	18,3	20
Karadere	8,4	7,44	77,9	17,8	17
Turnasuyu	8,67	9,35	104,7	21,3	18
Ordu Sahil	7,93	8	133,3	18	17
Melet	8,99	11,01	137,1	21,8	17
Hopa	7,45	8,11	229	17,5	21
Sundura	7,61	8,69	188,6	18,8	22
Arhavi	7,34	8,62	311	18,3	20

3.3. Dokulardaki Ağır Metal Seviyelerine İlişkin Bulgular

Yapılan arazi çalışmalarında *Pelophylax ridibundus* türüne ait bireylerden her lokasyon için 2 örnek seçilerek, 15 ayrı lokasyondan toplam 30 bireye ait karaciğer ve besin olarak tüketilebilen arka bacak dokularında ki ağır metal varlığı incelenmiştir.

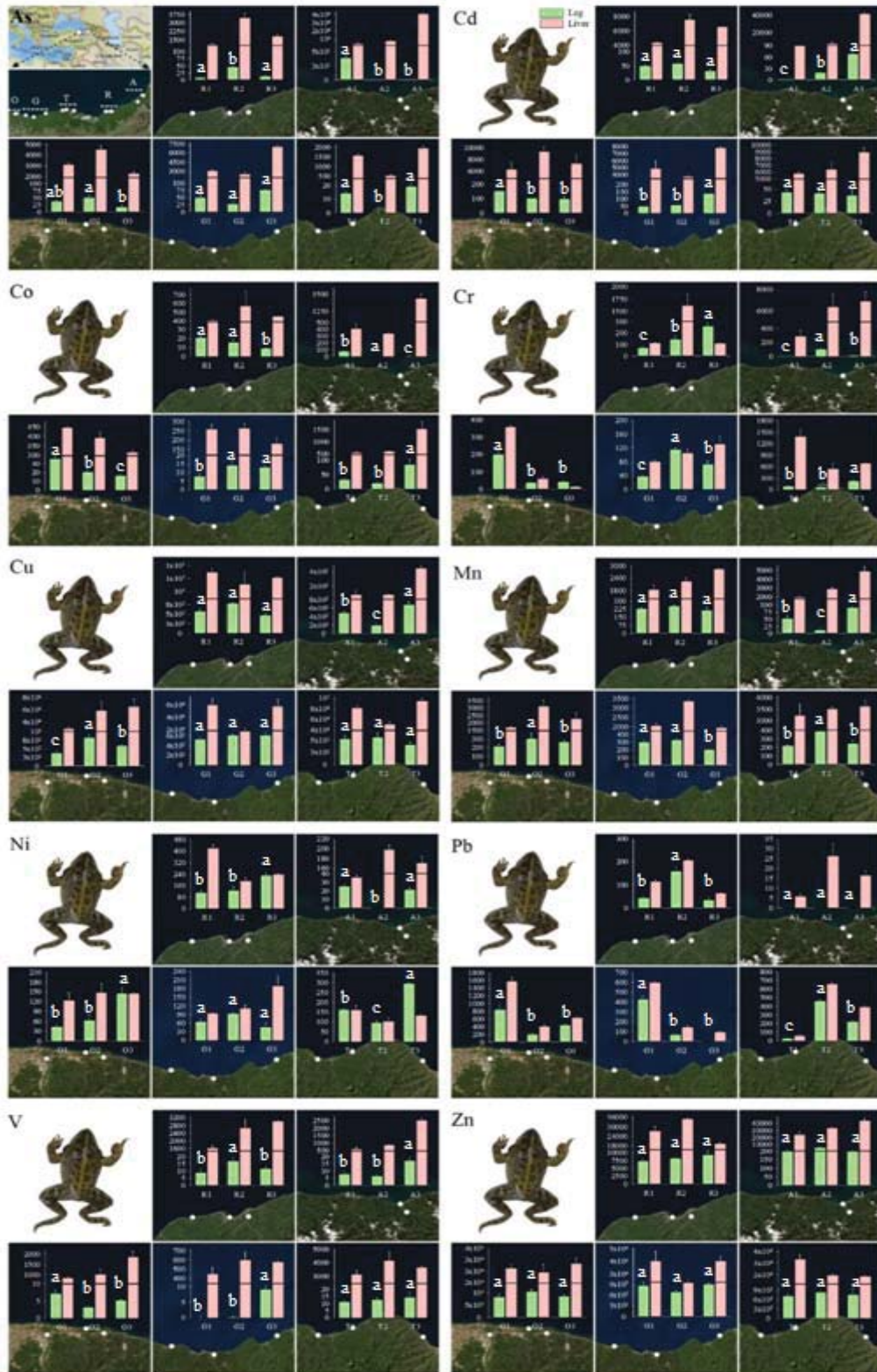
İncelenen bacak ve karacaciğer dokularına ait As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V, Zn konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 20'de verilmiştir.



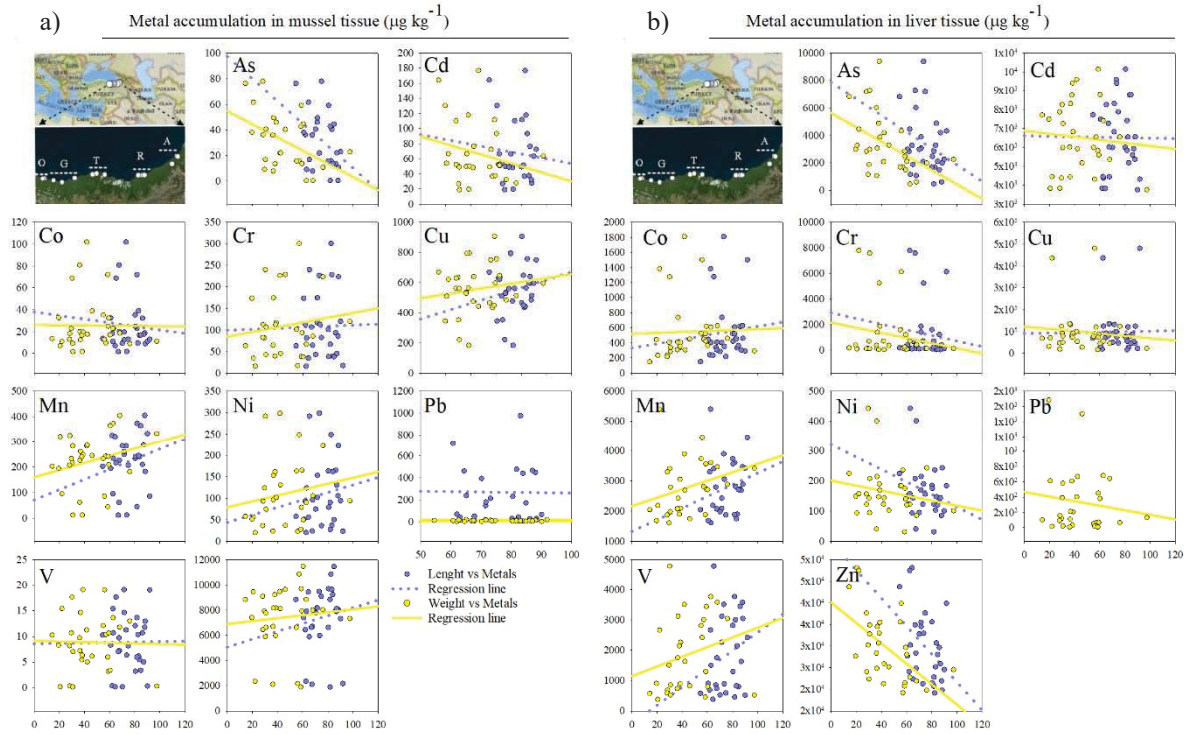
Şekil 20. Kuzeydoğu Karadeniz (Türkiye) boyunca *Pelophylax ridibundus* örneğinin bacak dokusunda (a) ve karaciğerinde (b) potansiyel olarak toksik elementlerin (PTE'ler) dağılımı. Kutu, alt ve üst çeyreği temsil eder (% 25-75). Bıyıklar, minimum maksimum değerleri gösterir. Kutulardaki çizgiler medyan değerleri gösterir. Noktalar aykırı değerleri gösterir.

Şekil 20'de gösterildiği üzere örneklenen arka bacak dokularına ait metal konsantrasyonları miktarı arasındaki ilişki $Zn > Cu > Pb > Mn > Cr > Ni > Cd > As > Co > V$ sıralamasıyla gözlenmiştir. Karaciğer dokularında izlenen metal konsantrasyonları ise $Cu > Zn > Cd > As > Mn > V > Cr > Pb > Co > Ni$ şeklinde gözlenmiştir.

Ağır metal seviyelerinin istasyonlar arasındaki farklılıklarına ait grafik Şekil 21'de gösterilmiştir. Örneklerin alındığı iller arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



Şekil 21. Kuzeydoğu Karadeniz (Türkiye) boyunca örneklenen *Pelophylax ridibundus*'un bacak dokusu ve karaciğerindeki ağır metal konsantrasyonları (ortalama $\pm$ standart hata $\mu\text{g kg}^{-1}$). Aynı grafiklerdeki farklı harfler (a, b, c) istasyonlar arasındaki farklılığı belirtir.

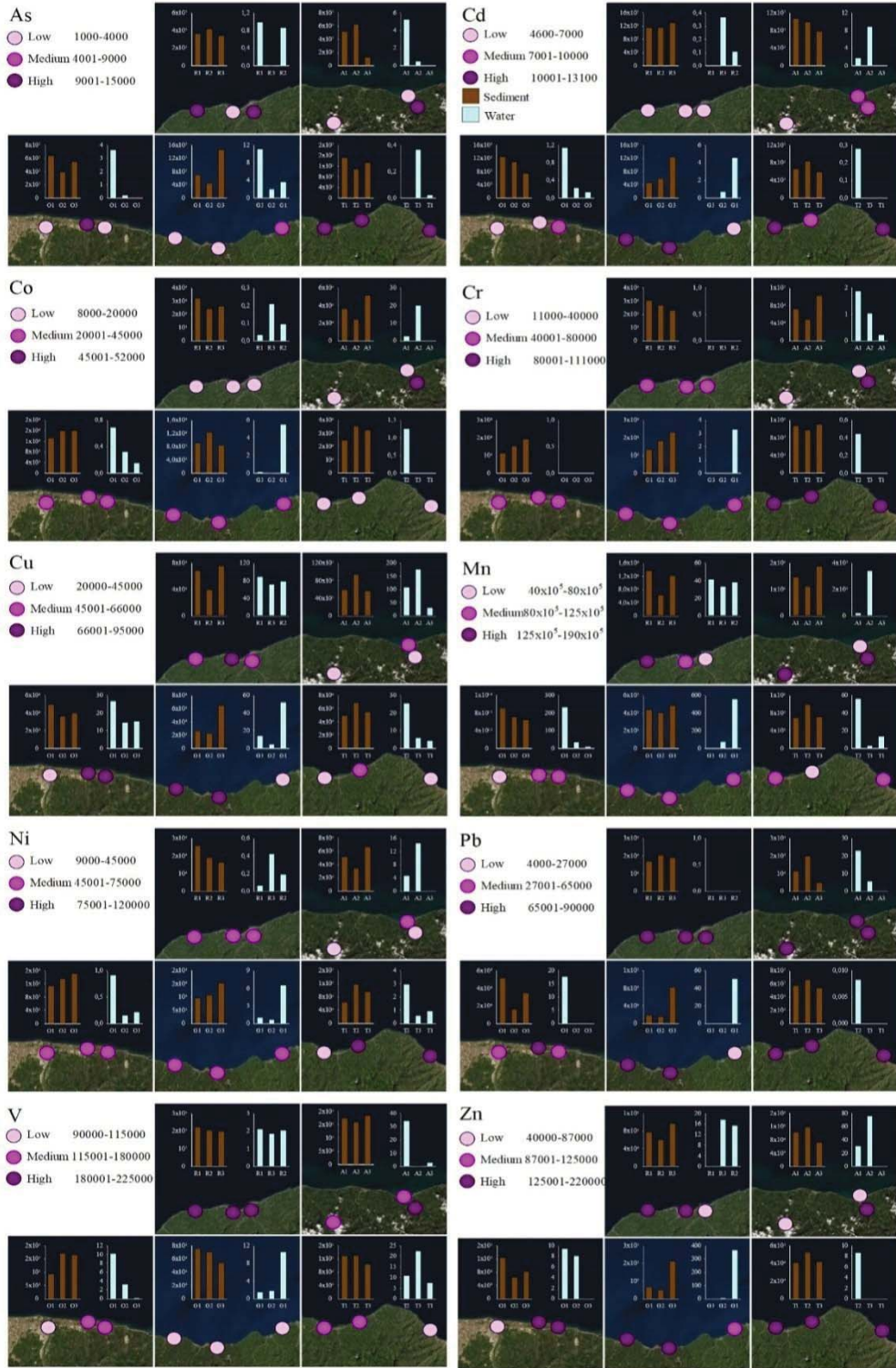


Şekil 22. Kuzeydoğu Karadeniz (Türkiye) boyunca örneklenen *Pelophylax ridibundus*'un bacak dokusu (a) ve karaciğerindeki (b) ağır metal konsantrasyonları ile kurbağa boyutu (uzunluk-ağırlık) arasındaki ilişki grafiği. Her nokta, farklı örneklerin sonucunu gösterir.

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda kurbağaların hem bacak dokusu hem de karaciğerindeki tüm ağır metal konsantrasyonları ile kurbağa boyutu (uzunluk-ağırlık) arasındaki anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p < 0.05$). Bu nedenle de regresyon analizi gerçekleştirilmemiştir.

3.4. Sediment ve Su Örneklerine Ait Ağır Metal Seviyelerine İlişkin Bulgular

Sediment ve su örneklerine ait ağır metal seviyelerine ilişkin bulgular Şekil 23'te gösterilmiştir. As, Co, Zn, Pb, Cr gibi ağır metaller bazı istasyonlardaki su örneklerinde düşük miktarda ya da tespit limitinin altında bulunmasına rağmen canlı vücudunda yüksek miktarlarda tespit edilmiştir.



Şekil 23. Kuzeydoğu Karadeniz (Türkiye) boyunca örneklenen tortu ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ve su örneklerindeki ($\mu\text{g L}^{-1}$) potansiyel ağır metal konsantrasyonları. İstasyonlardaki renkli daireler, ilgili istasyondan alınan *Pelophylax ridibundus* dokularında PTE konsantrasyonlarına göre küme analizi sonuçlarını göstermektedir. Tanımlanan her sınıflandırma (düşük, orta, yüksek), konumlar arasındaki göreceli farklılıkları gösterir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Metaller biyolojik veya kimyasal işlemlerle parçalanamadığı için çevrede birikirler. Metaller besin zincirine girebilir. İnsanlar ve hayvanlar için bir risk oluşturabilir (Castiglione vd., 2009). Suyun kimyasal analizi, çevredeki metal konsantrasyonlarını tespit edebilir. Bununla birlikte, bu yalnızca metallerin sudaki durumunu ortaya çıkarır ve hedef organizmalar üzerindeki metal toksisitesinin ve ekosistem üzerindeki etkilerinin tam bir değerlendirmesini sağlayamaz (Pereira vd., 2009; Aliko vd., 2015). Bu nedenle canlı organizmaların dokularındaki metal konsantrasyonlarının belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmada *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası)'un Türkiye'deki yayılış alanı içerisindeki 5 farklı bölgeden 15 popülasyona ait 25'i dişi, 42'si erkek ve 8'i juvenil olmak üzere toplam 75 birey örneklendirilmiştir. Kurbağa örneklerinden 30 tanesine için karaciğer ve besin olarak tüketilebilen arka bacak dokusuna ait ağır metal varlığı incelenmiştir. Ayrıca örnekleştirme alanlarından alınan sediment ve su örneklerine ait ağır metal tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Literatür verilerine göre, sudaki düşük konsantrasyonlarına rağmen, kurbağa dokularında nispeten yüksek konsantrasyonlarda bazı metaller gözlemlenmek alışılmadık bir durum değildir (Stolyar vd., 2008, Prokić vd., 2016, Borković-Mitić vd., 2016). Yapılan bu çalışma literatürdeki veriler ile benzerlik göstermektedir. Alınan su örneklerinde çoğu metal tespit limiti altında bulunmasına rağmen kurbağa dokularında yüksek miktarda değerler kendini göstermiştir.

Örneklenen arka bacak dokularına ait metal konsantrasyonları miktarı arasındaki ilişki $Zn > Cu > Pb > Mn > Cr > Ni > Cd > As > Co > V$ sıralamasıyla gözlenmiştir. Karaciğer dokularında izlenen metal konsantrasyonları ise $Cu > Zn > Cd > As > Mn > V > Cr > Pb > Co > Ni$ şeklinde gözlenmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel analizler sonucunda ağır metal konsantrasyonları açısından lokasyonlar arasında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır. ($p > 0,05$)

Su ve kurbağa dokularındaki metal konsantrasyonları arasındaki farklılıklar, kurbağaların ya başka bir kaynaktan metal biriktirdiklerini ya da geçmişte artan metal kirliliğine aralıklı olarak maruz kaldıklarını göstermektedir. Deriden su aracılığıyla doğrudan metal emiliminin yanı sıra, kurbağalar sindirim sistemi yoluyla yutulan yiyeceklerden veya kazara toprak ve tortudan metalleri emebilirler (Papadimitriou ve

Loumbourdis, 2002). Kurbağalar, bazıları topraktan sürekli olarak metal emen su bitkilerinden metal biriktiren veya besin ağındaki diğer organizmaları yiyerek omurgasızlarla beslenirler (Nummelin vd., 2007). Stolyar vd. (2008), Batı Ukrayna'da yaşayan *Pelophylax ridibundus*'un kentsel ve kırsal alanlarındaki (eski adı *Rana ridibunda* olarak bahsedilmiştir) metal biyoyararlanımını karşılaştırmıştır. Yazarlar, sudaki çok düşük metal konsantrasyonlarına (tespit sınırının altında) rağmen, her iki bölgedeki kurbağaların da metalleri yüksek konsantrasyonlarda biriktirdiğini bildirdi. Kurbağaların doğal popülasyonlarının incelenmesi, devam eden bir metal biriktirme sürecinin sonucu ve dolayısıyla uzun bir süre boyunca su ortamındaki değişim hakkında bilgi sağlar. Bu, yalnızca mevcut kirlilik durumunu tanımlayan kimyasal ve fiziksel analizlerin tersidir (Sparling vd., 2000).

Nikel, kurşun ve krom konsantrasyonları, amfibilerdeki belirli kirleticiler için hedef organ olarak kabul edilen karaciğerde en yüksek seviyede bulunmuştur (Medina vd., 2016). Severtsova vd. (2013) ve Aguilón-Gutiérrez vd. (2018) ayrıca *R. temporaria*, *B. bufo* ve *D. plicatus*'ta iribaşların karaciğerinde ve bağırsaklarında kurşun gibi ağır metaller bulmuştur. Metaller nispeten su ve tortularda daha düşük miktarlarda bulunur ve sonunda canlılara geçer (Sparling vd., 2000).

Canlılar metalleri her zaman vücutlarından uzaklaştırmak için etkili mekanizmalar geliştirmedikleri için vücutlarını bazı metaller dokularında birikir, bu yüzden biyokonsantrasyon ve biyoakümülyasyon fenomeni meydana gelir ve muhtemelen aynı şey besin zinciri boyunca meydana gelir (biyomagnifikasyon süreci) (Linder ve Grillitsch 2000; Burger ve Snodgrass 2001, Stolyar vd. 2008). Sudaki genel ağır metal konsantrasyonları, tortu ve dokularda, çinko diğer metallere göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş ve bunun muhtemelen çinkonun küresel bir element olduğu ve endüstride yaygın olarak kullanılması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hoffman ve diğerleri 2003). Bu durum yapılan bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Karaciğer ve bacak dokusu örneklerine ait ağır metal varlıkları incelendiğinde çinko ve bakır değerlerinin daha yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir.

Ağır metaller hem ekolojik hem de organizma düzeyinde olmak üzere amfibilerin iç gelişim mekanizmalarını etkileyerek ciddi hasarlara sebep olabilirler. Metaller biyokimyasal ve genetik yönleri ile nüfus azalması, toplulukların kaybı ve muhtemelen yerel yok oluşlar gibi ekolojik süreçlerde değişikliklere yol açar (Nixdorf et al. 1997; Berzins ve Bundy 2002; Egea-Serrano vd. 2012).

Amfibiler yaşamlarının belirli bir kısmını sucul ortamlarda bir kısmını karasal yaşam alanlarında geçiren ve genel olarak hayatlarının büyük bir kısmını suya bağımlı olarak yaşayan bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bu bağlamda düşünüldüğünde sucul ortamlarda bulunan kirliliklerden etkilenmeleri kaçınılmazdır.

Kurbağa bacağındaki ağır metal konsantrasyonları kullanılarak tahmini haftalık alım miktarı (EWI) belirlenmiş ve FAO / WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesi (JECFA 1982, 2011a, b) tarafından rapor edilen geçici tölere edilebilir haftalık miktar (PTWI) miktarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, kurbağa bacağı tüketimi yoluyla metallerin insan sağlığı üzerindeki riskini tahmin etmek için bir Risk Katsayısı (RK) yöntemi kullanılmıştır (USEPA, 2015). Maruz kalınan ağır metal konsantrasyonlarının, referans doz katsayılarına oranıyla hesaplanan THQ'lar, uzun vadeli kanserojen olmayan maruz kalma olasılıklarını açıklamak için kullanılmıştır (USEPA 2015). THQ değeri > 1 ise, incelenen ağır metalin sağlık açısından olumsuz etkilerinin olabileceği anlamına gelir. Kurbağa bacağında tespit edilen tüm metallerin toplamının kanserojen olmayan sağlık riskini değerlendirmek için HI kullanılmıştır. HI değeri > 1 ise, kurbağa bacağındaki ağır metallerin potansiyel kanserojen olmayan sağlık riski gösterebileceğini belirtir. Kurbağa bacağı dokusu için hesaplanan değerler Tablo 3'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, ağır metal değerlerinin potansiyel tehlike oluşturabilecek RK değeri olan 1'i aşmadığı görülmektedir (Tablo 4).

Tablo 4. Risk değerlendirmesi

	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	HI
Kurbağada metal konsantrasyonu*	0,243	18,759	1,392	15,607	183,661	19,92	25,516	1888,997	
	77,822	176,697	101,65	300,34	905,063	298,49	975,538	11450,859	
	31,399	67,922	25,627	108,557	554,781	109,649	267,973	7392,55	
EC (2006)*		1000					1500		
TFC (2011)*		1000					1500		
EWI	0,000754	0,058218	0,00432	0,048436	0,569982	0,061821	0,058218	5,862404	
	0,241517	0,54837	0,315466	0,93209	2,808816	0,926349	3,027532	35,537149	
	0,097445	0,210792	0,079532	0,336901	1,721734	0,34029	0,83164	22,942397	
PTWI	15	7			3500		25	7000	
RfD	0,3	1	20	3	37,1	20	3,5	300	
THQs	1,10E-06	2,60E-05	9,70E-08	7,20E-06	6,90E-06	1,40E-06	1,00E-05	8,80E-06	6,20E-05
	3,60E-04	2,50E-04	7,10E-06	1,40E-04	3,40E-05	2,10E-05	3,90E-04	5,30E-05	1,20E-03
	1,50E-04	9,40E-05	1,80E-06	5,00E-05	2,10E-05	7,60E-06	1,10E-04	3,40E-05	4,60E-04

* $\mu\text{g/kg}$ EC (2006): Avrupa komisyon reg $\ddot{u}$ lasyonu “gıda maddelerindeki belirli kirleticiler için maksimum seviyelerin belirlenmesi”, TFC (2011): T $\ddot{u}$ rk gıda kodeksi bulaşanlar y $\ddot{o}$ netmeliği, EWI ($\mu\text{g/kg/hafta}$): haftalık metal alım miktarı, PTWI ($\mu\text{g/kg/hafta}$): geçici tolere edilebilir haftalık alım, Cu and Zn (JECFA 1982), As (JECFA 2011a), Cd and Pb (JECFA 2011b). RfD ($\mu\text{g/kg/day}$): referans doz, THQ: Hedef Risk Katsayısı < 1 herhangi bir olumsuz sağlık etkisine neden olma olasılığı d $\ddot{u}$ ş $\ddot{u}$ kt $\ddot{u}$ r, THQ > 1 ise olumsuz sağlık etkilerine neden olabilir, EWI, THQ, ve HI değerleri haftalık t $\ddot{u}$ ketim 225 g baz alınarak hesaplanmıştır.

5. ÖNERİLER

Amfibiler yaşam döngülerinin bir kısmında karasal ortamlarda bulunabilmelerine rağmen suya bağımlı olarak yaşamlarını sürdürmektedirler. Özellikle üreme ve gelişim dönemlerinde sucul ortamlara ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden amfibiler karasal veya sucul yaşam ortamlarında meydana gelen değişimlerden kolaylıkla etkilenebilmektedir. Yaşam alanlarına gerek ağır metallerin ve kirleticilerin eklenmesi gerekse yaşam alanlarının tahrip edilmesi amfibi popülasyonlarının varlığını devam ettirebilmesi açısından tehdit oluşturmaktadır. Çalışma alanlarından alınan su ve tortu örneklerinde ağır metal varlığına rastlanılmıştır. Amfibiler ve diğer canlılar açısından bu durum risk teşkil etmektedir. Bu kapsamda çevre kirliliğine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Ülkemizde geniş bir tüketim alanına sahip olmamasına karşın kurbağa bacağı özellikle yurt dışında besin olarak tüketilmektedir. Çalışma konumuz olan *Pelophylax ridibundus* tüketilebilen kurbağa türleri içerisinde yer almaktadır. Yaptığımız çalışmada kurbağa örneklerine ait arka bacak ve karaciğer dokularında ağır metal varlığı tespit edilmiştir. Örneklerle ait dokuların incelemesinin sonucunda toksik değer seviyesine ulaşan örnek bulunmamış olmasına rağmen kurbağa bacağının öğünlerde tercih edilmesi vücuda ağır metal alınımına sebebiyet verecektir. Bu durum uzun vadede sağlık sorunları açısından sorun teşkil edebilir.

Besin olarak tüketilen *Pelophylax ridibundus* üretim çiftliklerinde yetiştirilerek ve doğadan avlanma yöntemiyle toplanarak sofralara sunulmaktadır. Kurbağaların doğadan aşırı avlanması sonucu ilerleyen süreçlerde türün nesli tehlike altına girebilir.

KAYNAKLAR

- Aguillón-Gutiérrez, D.R., Ramírez-Bautista A., Romo-Gómez C. (2018): Spectrochemical analysis of tissues of frog *Dryophytes plicatus* tadpoles (Amphibia: Hylidae) developing under lead and iron pollution. – *Journal of Environmental Science and Management* 21: 74-81.
- Akiyoshi, H. and Inoue, A.M., (2012). Comparative Histological Study of Hepatic Architecture in the Three Orders Amphibian Liver. *Comparative Hepatology*, 11, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-5926-11-2>
- Aliko V, Hajdaraj G, Caci A, Faggio C (2015) Copper induced lysosomal membrane destabilisation in haemolymph cells of Mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Braz Arch Biol Technol* 58:750–756
- Arauco, L.R.R., De Stéfani, M.V., Nakaghi, L.S.O. and Oliveira-Bahia, V.R.L., (2007). Histology of kidney, liver and intestine of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) Fed with diets containing propolis. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.37, n.5, p.1436-1441.
- Bambozzi, A.C., Seixas-Filho, J.T., Thomaz, L.A., Oshiro, L.M. Y., Braga, L.G.T., and Lima, S.L., (2004). Efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.1, n.1, p.1-7
- Baran, İ., Atatür, M. K., 1998. Türkiye Herpetofaunası (Kurbaga ve Sürüngenler). T.C Çevre Bakanlığı, 214s., Ankara.
- Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V, Zivna D, Blahova J, Marsalek P, Zelníckova L, Bartos M, Di Tocco FC, Faggio C (2013) Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinol Lett* 34:102–108
- Başoğlu, M., Özeti, N. ve Yılmaz, Ğ., (1994). Türkiye Amfibileri, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi No:151, s. 221, Bornova/İzmir.
- Berzins, D.W., Bundy, K.J. (2002): Bioaccumulation of lead in *Xenopus laevis* tadpoles from water and sediment. – *Environmental International* 28: 69-77
- Birungi Z, Masola B, Zaranyika MF, Naigaga I, Marshall B (2007) Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. *Phys Chem Earth* 32:1350–1358
- Borković-Mitić SS, Prokić MD, Krizmanić II, Mutić J, Trifković J, Gavrić J, Despotović SG, Gavrilović BR, Radovanović TB, Pavlović SZ, Saičić ZS (2016) Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*). *Environ Sci Pollut Res* 23:9649–9659

- Budak, A. ve Göçmen, B., (2008). Herpetoloji. Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi No:194, s.34
- Burger, J., Snodgrass, J. (2001): Metal levels in Southern Leopard Frogs from the Savannah River site: Location and body compartment effects. – Environmental Research Section A 86: 157-166.
- Burton, T. M. & Likens, G. E., (1975). Salamander populations and biomass in the Hubbard Brook Experimental Forest. *Copeia*, 1975, 541-546.
- Cairns J, McCormick PV, Niederlehner BR (1993): A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia*, 236: 1–44.
- Carey C, Bryant J (1995). Possible interrelations among environmental toxicants,
- Carpenter AI, Dublin H, Lau M, Syed G, McKay JE, Moore RD (2007) Overharvesting. In: Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JR 3th (eds). Amphibian conservation action plan, IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, pp 26–31.
- Castiglione S, Todeschini V, Franchin C, Torrigiani P, Gastaldi D, Ciatelli A, Rinaudo C, Berta G, Biondi S, Lingua G (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: a large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environ Pollut* 157:2108–2117
- Chen, T.H., J.A. Gross and W.H. Karasov, 2007. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 26: 1470-1475.
- Corn, P.S., 1994. USDA Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station. Fort Collins Co., Colorado, pp: 24.
- Cossa, D., 1989. "A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters." *Oceanologica Acta* **12**(4): 417-432.
- Davidson NC (2014): How much wetland has the world lost? Long-term and recent trends in global wetland area. *Mar. Freshwater Res.*, 65 (10): 934-941.
- Devier MH, Augagneur S, Budzinski H, Le Menach K, Mora P, Narbonne JF, Garrigues P (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J Environ Monit* 7:224–240
- Duellman, W. E. & Trueb, L., (1986). *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York. NY.

- Edwards, T.M., K.A, McCoy, T. Barbeau, M.W. McCoy, L.M. Thro and L.J. Jr. Guillette, 2006. Environmental context determines nitrate toxicity in Southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. *Aquat. Toxicol.*, 78: 50-58,
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M., Torralva, M. (2012): Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. – *Ecology and Evolution* 2: 1382-1397.
- Elinder, C.G, and M. Piscator, 1978. Cadmium and Zinc in Horses, In: *Trace Element Metabolism in Man and Animals*, Kirchgessner OÂM. (Ed). Arbeitsgemeinschaft (ofür Tierernährungsforschung, Freising-Weihen-Stephan., pp: 19-22.
- Fazio F, Piccione G, Tribulato K, Ferrantelli V, Giangrosso G, Arfuso F, Faggio C (2014) Bioaccumulation of heavy metals in blood and tissue of striped mullet in two Italian lakes. *J Aquat Anim Health* 26:278–284
- Falfushinska HI, Romanchuk LD, Stolyar OB (2008) Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. *Comp Biochem Physiol* 148:223–229
- Gedik K., R. D. DeLaune, M. Kongchum, and R. P. Gambrell (2016). Physicochemical Factors Controlling Stability of Toxic Heavy Metals and Metalloids in Wetland Soils and Sediments
- Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, M., Müller, E. and Triebkorn, R., (2001). Ultrastructural Biomarkers as Tools to Characterize the Health Status of Fish in Contaminated Streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8, 241-226. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012958804442>
- Gratwicke B, Evans MJ, Jenkins PT, Kusurini MD, Moore RD, Sevin J, Wildt DE (2010) Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens? *Front Ecol Environ* 8:438–442
- Hecnar, S. J., (1995). Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from Southern Ontario. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 2131-2137.
- Hermes-Lima M, Storey KB (1998) Role of antioxidant defences in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol Cell Biochem* 189:79–89
- Hipolito, M., Leme, M.C.M., Bach, E.E., (2001). Lesões anatômico-histopatológicas em rã- touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) associadas à deterioração da ração. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v. 68, n. 1, p. 111-114. n. 2, p. 29-33.
- Hipolito, M., Martins, A.M.C.R.P.F. and Bach, E.E., (2004). Aspectos bioquímicos em fígado de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) sadias e doentes. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v. 71, n. 2, p. 147-153.

- Hoffman, J. and Katz, U., (1998). Glyconeogenesis and Urea Synthesis in the Toad *Bufo viridis* during Acclimation to Water Restriction. *Physiological Zoology*, 71, 85- 92. <http://dx.doi.org/10.1086/515886>
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (2003): Handbook of Ecotoxicology. – Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Houlahan JE, Findlay CS (2000): Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nat.* 404: 752–55.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 1982. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants 26th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series No. 683. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2011a. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants 72nd Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 959. World Health Organization, Rome, Italy. Available at
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2011b. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants 73rd Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 960. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at
- Linder, G., Grillitsch, B. (2000): Ecotoxicology of metals. – In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop C.A. (eds.) Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. SETAC, Pensacola.
- Loumbourdis NS (1997) Heavy metal contamination in a lizard, *Laudakia* (Agama) *Stellio stellio* compared in urban, high altitude and agricultural, low altitude areas of Northern Greece. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:945–95
- Lower WR, Kendall RJ (1990) Sentinel species and sentinel bioassay. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds) Biomarkers of environmental contamination, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 309–331
- Markett B.A., Breure A.M. and Zechmeister H.G (2003). Bioindicators and Biomonitors Principles, Concepts and Applications. Elsevier. ISBN: 0–08–044177–7
- Medina, M.F., González, M.E., Klyver, S.M.R., Aybar-Odstreil, I.M. (2016): Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium. – *Turkish Journal of Biology* 40: 229-238.
- Mouchet, F., L. Gauthier, M. Baudrimont, P. Gonzalez, C. Mailhes, V. Ferrier and A. Devaux, 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the

- comet assay and the micronucleus test. *Environ. Toxicol.*, 22: 422-435
- Neveu, A. 2009. Suitability of European green frogs for intensive culture: Comparison between different phenotypes of the esculenta hybridogenetic complex. *Aquaculture*, 295: 30-37
- Nixdorf, W.L., Taylor, D.H., Isaacson, L.G. (1997): Use of Bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) to examine the mechanisms of lead neurotoxicity. – *American Zoologist* 37: 363-368
- Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., Hiruonen, H., Alanko, T., 2007. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. *Environ. Pollut.* 145, 339–347.
- Özeti, N. ve Yılmaz, İ., 1994. Türkiye Amfibileri. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 151. İzmir, Türkiye, 221 s.
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville M (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat Toxicol* 58:75–98.
- Özogul F., Özogul Y., Olgunoglu A.İ., & Boga E.K., (2008). Comparison of fatty acid, mineral and proximate composition of body and legs of edible frog (*Rana esculenta*)
- Papadimitriou E, Loumbourdis NS (2002) Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: the impact on two biomarkers, the lipid peroxidation and glutathione. *Bull Environ Contam Toxicol* 69:885–891
- Pereira P, de Pablo H, Rosa-Santos F, Pacheco M, Vale C (2009) Metal accumulation and oxidative stress in *Ulva* sp. substantiated by response integration into a general stress index. *Aquat Toxicol* 91: 336–345
- Prokić M, Borković-Mitić S, Krizmanić I, Gavrić J, Despotović S, Gavrilović B, Radovanović T, Pavlović S, Saičić Z (2015) Comparative study of oxidative stress parameters and acetylcholin- esterase activity in the liver of *Pelophylax esculentus* complex frogs. *Saudi J Biol Sci.* doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.003
- Rai N, Pal A (2002) Health hazards of heavy metals. *EnviroNews ISEB India* vol 8 No. 1. In: International conference on plants and environmental pollution (ICPEP-2). Proceedings of the 2nd international conference on plants and environmental pollution, Lucknow, India, 4–9 Feb 2002.
- Ramsar COP7 (1999): 7th Meeting of the Conference of the Contracting Parties to the Convention on Wetlands (Ramsar, Iran, 1971).
- Reimann C, Matschullat J, Birke M, Salminen R (2009) Arsenic distribution in the environment: the effects of scale. *Appl Geochem* 24:1147–1167

- Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD (2011) Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32:116–122
- Rollins-Smith, L.A., B.D. Hopkins and L.K. Reinert, 2004. An amphibian model to test the effects of xenobiotic chemicals on development of the hematopoietic system. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 2863-2867, 180 *J. Environ. Sci. Technol.*, 4 (2) 172-181, 2011
- Schlaepfer PM, Hoover C, Dodd CK (2005) Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience* 55:256–264
- Selvi, M., A. Gul and M. Yilmaz, 2008. Investigation of acute toxicity of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (*Rana ridibunda* Pallas, 1771). *Chemosphere*, 52: 259-268.
- Serbula MS, Miljkovic Dj D, Kovacevic MR, Ilic AA (2012) Assessment of airborne heavy metal pollution using plant parts and topsoil. *Ecotoxicol Environ Saf* 76:209–214
- Sergius Kuzmin, David Tarkhnishvili, Vladimir Ishchenko, Tatjana Dujsebayaeva, Boris Tuniyev, Theodore Papenfuss, Trevor Beebee, Ismail H. Ugurtas, Max Sparreboom, Nasrullah Rastegar-Pouyani, Ahmad Mohammed Mousa Disi, Steven Anderson, Mathieu Denoël, Franco Andreone. 2009. *Pelophylax ridibundus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T58705A11825745.en>.
- Severtsova, E.A., Aguillón-Gutiérrez, D.R. (2013): Postembryonic development of anurans in ponds littered with metal-containing refuse (simulation experiments). – *Biology Bulletin* 40: 738-747
- Shaapera U, Nnamonu LA, Eneji IS (2013) Assessment of heavy metals in *Rana esculenta* organs from River Guma, Benue State Nigeria. *AJAC* 4:496–500
- Sharma, B. and R. Patino, 2008. Exposure of *Xenopus laevis* tadpoles to cadmium reveals concentration-dependent bimodal effects on growth and monotonic effects on development and thyroid gland activity. *Toxicol. Sci.*, 105: 51-58.
- Sheridan CD, Olson DH (2003): Amphibian assemblages in Zeroorder Basins in the Oregon Coast Range. *Can. J. For. Res.*, 33:1452-1477.
- Snodgrass, J.W., W.A. Hopkins, B.P. Jackson, J.A. Balonno and J. Broughton, 2005. Influence of larval period on responses of overwintering green frog (*Kana clamitans*) larvae exposed to contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 1508-1514.
- Sotomayor V, Lascano C, DE D'angelo AMP, Venturino A (2012) Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 31:2052–2058

- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., 2000. Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. SETAC Technical Publications Series, Pensacola, Florida.
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (eds) (2010) Ecotoxicology of amphibians and reptiles, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 916
- Stacy, M., E. James, E.K. Little and R.D. Semlitsch, 2005. Metamorphosis of two amphibian species after chronic cadmium exposure in outdoor aquatic mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 1994-2001.
- Stankovic S, Stankovic RA (2013) Bioindicators of toxic metals. In: Lichtfouse E et al (eds) *Environmental chemistry for a sustainable world*, vol 2, chap 5. Springer, Berlin, p 80
- Stankovic S, Jovic M, Milanov R, Joksimovic D (2011b) Trace elements concentrations (Zn, Cu, Pb, Cd, As and Hg) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and evaluation of mussel quality and possible human health risk from cultivated and wild sites of the southeastern Adriatic Sea, Montenegro. *J Serb Chem Soc* 76(12):1725–1737
- Stolyar OB, Loumbourdis NN, Falfushinska HI, Romanchuk LD (2008) Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of western Ukraine. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:107–113
- Sura, P., M. Wrobel and P. Bronowicka, 2006. Season dependent response of the marsh frog (*Rana ridibunda*) to cadmium exposure. *Folia Biol.*, 54; 159-165.
- Szyczewski P, Siepak J, Niedzielski P, Sobczyn'ski T (2009) Research on heavy metals in Poland. *Pol J Environ Stud* 5:755–768
- Şanlı, Y., 1979. Türkiye'nin Akdeniz sahillerinde avlanan, kıyılarımıza bağımlı ekonomik bazı balık türleri ile karideslerde total civa ve organik civa rezidülerinin araştırılması. *A.Ü. Vet. Fak. Dergisi*. 26, (3-4), 151-176
- Taiwo IE, Amaeze NH, Imbufe AP, Adetoro OO (2014) Heavy metal bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in the wild African tiger frog, *Hoplobatrachus occipitalis*. *Afr J Environ Sci Technol* 8:6–15
- Torre A, Trischitta F, Faggio C (2013) Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in *Mytilus galloprovincialis* digestive cells. *Toxicol in Vitro* 27:1260–1266
- Triquet CA, Leguille CC, Mouneyrac C (2013) Biomarkers of defense, tolerance, and ecological consequences. In: Triquet CA, Amiard JC, Rainbow PS (eds) *Ecological biomarkers, indicators of ecotoxicological effects*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 45-75
- Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr*

Med Chem 12:1161–1208

- Vogiatzis A, Loumbourdis NS (1998) Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:64–68
- Wester, P.W. and Canton, J.H., (1991). The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Comparative Pharmacology and Toxicology*, 100(1-2):115-7. DOI: 10.1016/0742-8413(91)90135
- WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition. Geneva, WHO Library
Cataloguing-in-Publication Data. 541 pp.
- Winston GW, Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19:137–161
- Zhang, Y., D. Huang, D. Zhao, J. Long, G. Song and A. Li, 2007. Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* tadpoles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 79: 178-188.181
- Zhivko M. Zhelev, Georgi S. Popgeorgiev, Mladen V. Angelov, 2013. Investigating the Changes in the Morphological Content of the Blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a Result of Anthropogenic Pollution and Its Use as an Environmental Bioindicator
<https://www.iucnredlist.org/species/58705/11825745>